

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA  
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA**

**RAFAELA OLIVEIRA ROSA**

**SUSCEPTIBILIDADE AOS ANTIMICROBIANOS DE *Staphylococcus  
pseudintermedius* ISOLADOS DE CÃES E SEUS TUTORES**

**UBERLÂNDIA- MG**

**2020**

**RAFAELA OLIVEIRA ROSA**

**SUSCEPTIBILIDADE AOS ANTIMICROBIANOS DE *Staphylococcus*  
*pseudintermedius* ISOLADOS DE CÃES E SEUS TUTORES**

Trabalho de conclusão de curso apresentado à coordenação do curso de graduação em Medicina Veterinária da Universidade Federal de Uberlândia, como requisito à aprovação na disciplina de Trabalho de Conclusão de Curso II.

Orientadora: Profa. Dra. Daise Aparecida Rossi

**UBERLÂNDIA- MG**

**2020**

**RAFAELA OLIVEIRA ROSA**

**SUSCEPTIBILIDADE AOS ANTIMICROBIANOS DE *Staphylococcus*  
*pseudintermedius* ISOLADOS DE CÃES E SEUS TUTORES**

Trabalho de conclusão de curso apresentado à coordenação do curso de graduação em Medicina Veterinária da Universidade Federal de Uberlândia, como requisito à aprovação na disciplina de Trabalho de Conclusão de Curso II.

Banca examinadora

---

Prof (a) Dra. Daise Aparecida Rossi  
Universidade Federal de Uberlândia

---

Prof (a) Dra. Roberta Torres de Melo  
Universidade Federal de Uberlândia

---

Mestranda Fernanda Aparecida Longato dos Santos  
Universidade Federal de Uberlândia

## AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço a Deus, por me proporcionar saúde e por manter viva a disposição e persistência que habita em mim, apesar de todos os obstáculos que foram aparecendo. Agradeço aos que caminharam comigo por essa jornada, como os amigos e família. Em especial a minha mãe, a ilustre Gleides Divina de Oliveira, que sempre me apoiou nas minhas escolhas, e meu pai Reginaldo José Rosa, que além de todo o apoio, me encorajou e motivou a chegar até aqui e almejar sempre além. Aos meus irmãos, Gabriel Adão Oliveira Rosa e Renata Oliveira Rosa, que sempre me incentivaram e me apoiaram em todos os momentos possíveis, me mostrando com alegria que tudo daria certo, ao meu namorado Douglas Oliveira Freitas Andrade, que esteve do meu lado, aguentando meus estresses diários, minhas ansiedades e incertezas, me ajudando inúmeras vezes durante essa trajetória e sempre me acalmando e dizendo que no fim, eu ficaria feliz por todos estes momentos.

Agradeço também a minha orientadora professora Dra. Daise Aparecida Rossi, que tanto me auxiliou durante tudo o percurso e puxou minhas orelhas quando necessário, mas sempre disposta a ajudar, agradeço também a Dra. Roberta Torres Melo e Dra. Christina Resende Martins, por abraçar este projeto de uma forma única e grandiosa, se doando, até mesmo em momentos fora do horário de trabalho, além de toda dedicação, paciência e disponibilidade oferecida, que tornou possível esse processo maravilhoso, que resultou nesse trabalho. Agradeço a mestrandia Fernanda Aparecida Longato, por aceitar meu convite e compor a banca examinadora e abrilhantar com seu conhecimento e experiência.

Sou grata também pela ajuda de todos os técnicos e estagiários do LABIO, pela acolhida, sanando as minhas dúvidas e salvando a minha vida, dando aquela mãozinha ou emprestando algum material que não conseguir preparar em tempo hábil.

Sem todos vocês, eu simplesmente não teria finalizado este trabalho, meu eterno, muito obrigada!

## RESUMO

A resistência aos antimicrobianos é considerada um problema de saúde pública mundial. Este estudo objetivou avaliar a susceptibilidade de 91 cepas *Staphylococcus pseudintermedius* isoladas de cães com otite (4) e piодermite recidivante (43) e de seus tutores (44) aos antimicrobianos oxacilina, gentamicina e cefovecina por dois métodos diagnósticos, a concentração inibitória mínima (CIM) e o teste de difusão em discos, e verificar se os resultados obtidos no teste de difusão podem ser associados aos resultados da CIM (padrão-ouro). As cepas foram originadas de 50 cães e seus tutores. Os resultados foram utilizados para a construção de perfis de resistência para isolados de cães e humanos. Foram observados cinco perfis de resistência aos antimicrobianos, com resistência decrescente de *S. pseudintermedius* à oxacilina, cefovecina e gentamicina, sendo este último, o mais indicado para tratamento de piодermite e otites recidivantes em cães. O perfil com cepas sensíveis aos três antimicrobianos foi o mais prevalente e englobou 53,88% (49/91) das cepas. Observamos fraca associação entre as resistências à oxacilina e cefovecina ( $r=0,392$ ) por cepas de *S. pseudintermedius* isoladas de animais e humanos, caracterizando que a resistência fenotípica de uma não reflete na outra. Não foi possível estabelecer a associação para a gentamicina. A avaliação do teste de difusão em discos para determinar a resistência à oxacilina e cefovecina demonstrou que o método possui baixa sensibilidade para determinar *S. pseudintermedius* resistentes quando comparado ao padrão ouro, a CIM. Desta forma, mesmo sendo considerado um método de baixo custo e de fácil na execução, seu uso não é indicado para estabelecer a resistência de *S. pseudintermedius* a estes dois antimicrobianos.

**Palavras-chave:** CIM. Antibiograma. Infecções estafilocócicas. Resistência antimicrobiana.

## ABSTRACT

Antimicrobial resistance is considered a worldwide public health problem. This study aimed to evaluate the susceptibility of strains of 91 *Staphylococcus pseudintermedius* strains isolated from dogs with otitis (4) and recurrent pyoderma (43) and their guardians (44) to the antimicrobials oxacillin, gentamicin and cefovecin by two diagnostic methods, the minimum inhibitory concentration (CIM) and the disk diffusion test, and check if the results obtained in the diffusion test can be associated with the results of the CIM (gold standard). The strains originated from 50 dogs and their guardians. The results were used to build resistance profiles for isolates from dogs and humans. Five antimicrobial resistance profiles were observed, with decreasing resistance of *S. pseudintermedius* to oxacillin, cefovecin and gentamicin, the latter being the most suitable for the treatment of recurrent pyoderma and otitis in dogs. The profile with strains sensitive to the three antimicrobials was the most prevalent and comprised 53.88% (49/91) of the strains. We observed a weak association between resistance to oxacillin and cefovecin ( $r = 0.392$ ) by strains of *S. pseudintermedius* isolated from animals and humans, characterizing that the phenotypic resistance of one does not reflect in the other. It was not possible to establish the association for gentamicin. The evaluation of the disk diffusion test to determine resistance to oxacillin and cefovecin demonstrated that the method has low sensitivity to determine resistant *S. pseudintermedius* when compared to the gold standard, MIC. Thus, even though it is considered a low-cost and easy method to perform, its use is not indicated to establish the resistance of *S. pseudintermedius* to these two antimicrobials.

**Keywords:** CIM. Antibiogram. Staphylococcal infections. Antimicrobial resistance.

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO.....</b>	<b>8</b>
<b>2. OBJETIVOS.....</b>	<b>9</b>
2.1 Objetivo Geral.....	9
2.2 Objetivos Específicos .....	9
<b>3 REVISÃO DE LITERATURA.....</b>	<b>10</b>
3.1 Microbiota cutânea de cães.....	10
3.2 Piodermite e otite bacteriana canina .....	11
3.3 <i>Staphylococcus pseudintermedius</i> e resistência aos antimicrobianos.....	12
3.4 Antimicrobianos: oxacilina, cefovecina e gentamicina.....	13
3.5 Métodos para determinar a suscetibilidade aos antimicrobianos.....	15
3.5.1 Teste de difusão de disco.....	15
3.5.2 Concentração inibitória mínima- CIM.....	15
<b>4 MATERIAIS E MÉTODOS.....</b>	<b>17</b>
4.1 Amostras.....	17
4.2 Testes de susceptibilidade aos antimicrobianos.....	17
4.3 Teste de difusão em discos .....	18
4.4 Concentração mínima inibitória – CIM.....	18
4.5 Análises dos resultados.....	20
<b>5 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....</b>	<b>21</b>
5.1 Suscetibilidade <i>in vitro</i> a oxacilina.....	21
5.2 Suscetibilidade <i>in vitro</i> a cefovecina.....	22
5.3 Suscetibilidade <i>in vitro</i> a gentamicina.....	23
5.4 Perfil de resistência de <i>S. pseudintermedius</i> isolados de animais e tutores.	24
5.5 Avaliação dos métodos diagnósticos.....	26
<b>6 CONCLUSÃO .....</b>	<b>28</b>
<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>29</b>

## 1. INTRODUÇÃO

A resistência aos antimicrobianos é considerada um problema de saúde pública mundial e no Brasil a realidade não é diferente (ANVISA, 2019). É comum o uso indiscriminado de antibióticos nas práticas veterinárias, incluindo o uso empírico de drogas de última geração, e que ainda assim, nem sempre são eficazes (RIBEIRO; CORTEZI; GOMES, 2018). Na medicina humana, a conscientização dos padrões de uso de drogas estão se tornando cada vez mais necessárias para incentivar o uso racional destes medicamentos. Estes parâmetros são agora amplamente aceitos como um padrão global para a identificação de problemas e têm sido utilizados em vários países em desenvolvimento (GUARDABASSI & KRUSE, 2018).

A irresponsabilidade na utilização de antibióticos exerce pressão de seleção, com agentes etiológicos cada vez mais resistentes e impacta a saúde pública, especialmente quando a resistência está relacionada a bactérias zoonóticas. Um dos pilares para o controle da resistência antimicrobiana é o monitoramento constante, com dados coerentes e precisos. Assim, faz-se necessário o uso de métodos que auxiliem na identificação da emergência da resistência e multirresistência, de forma padronizada e segura, para que medidas de controle e alertas sejam adequadamente utilizados (LOUREIRO et al., 2018).

As patologias dermatológicas são casos rotineiros no cotidiano veterinário que geralmente são de difícil diagnóstico quanto ao agente etiológico e demandam grande utilização de antibióticos, muitas vezes de forma empírica. A piodermite constitui uma das principais causas de indicação de antibioticoterapia em cães (IHRKE, 2005; MAY, 2006; GUARDABASSI et al., 2008) e quando ocorre de forma crônica ou recidivante, se faz necessário o uso prolongado e frequente de antimicrobianos. Outra patologia recorrente na rotina veterinária é a otite, uma inflamação que se não tratada de forma eficaz, pode se tornar crônica ou recidivante (RHODHES & WERNER, 2014).

Queixas dermatológicas representam cerca de 40% do total de atendimentos da clínica médica de pequenos animais, sendo as piodermites bacterianas superficiais a mais frequente dermatose em cães (LARSEN, 2018). Um dos agentes etiológicos mais identificados em piodermite e otites em animais domésticos é *Staphylococcus pseudintermedius* (MILLER et al., 2013).

Nas últimas décadas, linhagens do gênero *Staphylococcus* resistentes aos antimicrobianos beta-lactâmicos vêm crescendo gradualmente, o que reflete nos tratamentos dermatológicos veterinários, já que um dos fármacos de primeira escolha é exatamente desse

grupo. Essas linhagens resistentes são chamadas de *Staphylococcus pseudintermedius* meticilina-resistentes ou MRSP, do inglês *methicillin-resistant Staphylococcus pseudintermedius*. A resistência a meticilina geralmente está relacionada a expressão de vários genes, sendo o principal e mais bem compreendido o gene *mecA* que codifica uma proteína de ligação à penicilina, alterando assim a proteína conhecida como *penicillin-binding protein 2a* (PBP2a), desta forma, confere resistência aos antimicrobianos beta-lactâmicos (BOTONI et al., 2016).

Assim, o monitoramento da resistência aos antimicrobianos em agentes zoonóticos causadores de piodermite e otites em cães torna-se extremamente importante. O investimento em pesquisas e estudos podem contribuir para a melhor terapêutica em cães, e ainda, prevenir a infecção humana e facilitar seu tratamento quando necessário (CASTELA, 2013).

## **2. OBJETIVOS**

### **2.1 Objetivo geral**

Verificar a susceptibilidade de cepas de *S. pseudintermedius* isoladas de cães com otite e piodermite recidivante e de seus tutores para os antimicrobianos oxacilina, gentamicina e cefovecina, por dois métodos diagnósticos, a determinação da concentração inibitória mínima (CIM) e o teste de difusão em discos.

### **2.2 Objetivos específicos**

- Determinar fenotipicamente se as cepas *S. pseudintermedius* podem ser classificadas como MRSP (*S. pseudintermedius* resistentes a meticilina).
- Utilizar a CIM para construir um perfil de resistência de *S. pseudintermedius* aos três antimicrobianos testados;
- Verificar se as resistências observadas em cepas isoladas de animais e humanos podem ser associadas;
- Comparar os resultados obtidos no teste de difusão em discos com o padrão ouro diagnóstico, a concentração inibitória mínima (CIM) para avaliar a sensibilidade/resistência de *S. pseudintermedius* aos antimicrobianos oxacilina, gentamicina e cefovecina.

### 3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

#### 3.1 Microbiota cutânea de cães

Patologias do sistema tegumentar possuem uma enorme importância na clínica de pequenos animais e representam quase 20% dos casos identificados na clínica médica (SCOTT, 2011). A pele dos animais possui diversos mecanismos e barreiras eficientes para proteção e manutenção deste órgão, dentre elas a microbiota residente. Os micro-organismos residentes são aqueles que são adquiridos da mãe no período neonatal e persistem por toda a vida do animal e são capazes de proliferar na pele íntegra (WILLENSE, 2000).

As bactérias simbióticas estão presentes na pele e contribuem para a defesa, estando localizados na epiderme superficial e nos folículos pilosos. A relação micro-organismo e hospedeiro permite que ocupem nichos microbiológicos e dificultem a colonização por patógenos pela competição por nutrientes, produção de metabólitos e modulação do sistema imune (MILLER et al., 2013; HOFFMAN, 2017).

As bactérias mais comumente encontradas colonizando a superfície da pele de cães são dos gêneros *Staphylococcus* e *Streptococcus*, destacando-se *S. pseudintermedius* (PENA, 2007). De acordo com um estudo de Wedly et al. (2014), realizado no Reino Unido nos anos de 2008 e 2009, entre os isoladas *Staphylococcus* coagulase positiva, *S. pseudintermedius* foi a espécie mais comum em animais, representando cerca de 11% do total das espécies de estafilococos encontradas.

Segundo Griffeth et al. (2008) *S. pseudintermedius* é mais associado com colonizações e infecções em cães do que *S. aureus*, sugerindo então que *S. pseudintermedius* é mais adaptado para colonizar pele e mucosas de cães. Apesar de também colonizar cães saudáveis, esta espécie é a principal causa de infecções de pele (piodermite), otites externas, abscessos e feridas infeccionadas.

Os animais portadores podem transmitir *S. pseudintermedius* para outros animais e seres humanos, sendo estes sintomáticos ou assintomáticos, o que facilita a disseminação da resistência, o que demonstra também o relevante potencial zoonótico dessa bactéria (WEDLY, 2014). Zoonoses causadas por *S. pseudintermedius* resistentes a meticilina (MRSP) entre cães e seus tutores têm sido cada vez mais notificadas (KARLEC, 2016). Estudos identificaram que proprietários de cães com piodermite apresentavam estirpes idênticas aos seus cães, sendo também observada resistência aos antibióticos testados (WEESE et al., 2010; PERRETEN et al., 2010).

### 3.2 Piodermite e otite bacteriana canina

Piodermatite bacteriana é uma das doenças dermatológicas mais frequentes na clínica veterinária, acometendo principalmente cães, sendo rara em gatos e outros animais domésticos (HOLMSTRÖM, 2020). A predominância em caninos é provavelmente devido a estes animais possuírem estrato córneo mais fino e compacto do que outras espécies, além de possuir escassez de lipídeos intracelulares, apresentar pH mais elevado e possuir poucas defesas nos pontos de abertura dos folículos pilosos, resultando, assim, na debilidade dos mecanismos de defesa locais, o que permite invasão bacteriana secundária (MILLER et al., 2013). *Streptococcus* spp. e *Staphylococcus* spp. são os agentes etiológicos mais descritos e comumente encontrados em piodermites secundárias (KNEGT, 2019).

O grande número de casos de piodermites recorrentes e as reduzidas opções de tratamento devido à resistência antimicrobiana é uma realidade nas clínicas veterinárias (RAVENS, et al., 2014). Neste contexto, *S. pseudintermedius* resistentes à meticilina (MRSP) tornou-se relevante e importante no cotidiano de clínicas veterinárias, devido sua alta prevalência e resistência, o que favorece infecções recorrentes (DIRIBE et al., 2015). A frequência de resistência ao antibiótico meticilina em estafilococos isoladas de cães tem crescido significativamente ao longo das décadas, e desta forma, é primordial que os clínicos se conscientizem e priorizem o uso responsável de antimicrobianas, tenham critérios para escolha, tempo de uso e dosagem ideais (BARBOSA et al., 2011).

Para isso, é extremamente necessário que se adicione à rotina clínica a realização de métodos diagnósticos, sobretudo nos casos de recorrência de infecções ou tratamento ineficientes (MILLER, 2013). Tais fatores, como uso de forma indiscriminada dos fármacos e a não utilização de técnicas que auxiliam na escolha e dosagem do antibiótico a ser utilizado, predisõem à seleção de bactérias resistentes ou multirresistentes e consequentes falhas terapêuticas (GUARDABASSI et al., 2008).

A otite é a inflamação de tecidos auditivos, sendo uma infecção altamente frequente nos atendimentos veterinários e atinge em grande escala cães e gatos, tendo como sinal clínico específico, prurido, o animal coça, esfrega o ouvido no chão excessivamente ou balança a cabeça demasiadamente, causando extremo estresse, hipersensibilidade e dor no animal (NIBLETT et al., 2017). A fase crônica resultará numa alteração da normalidade do ambiente e tecidos do canal da orelha, com espessamento das dobras do canal, que reduzem a largura do canal devido a calcificação da cartilagem auricular (SMITH, 2003). O diagnóstico da otite é realizado pela anamnese, otoscopia, exame dermatológico e citologia do cerúmen, que é

primordial na avaliação das características da infecção. O tratamento geralmente é realizado com ceruminolíticos e fármacos específicos para o agente causador da patologia (LEHNER et al., 2010).

As bactérias mais comuns associadas com otite são *Staphylococcus pseudintermedius*, *Streptococcus spp* e *Pasteurella multocida*, já *Pseudomonas aeruginosa* e *Escherichia coli* são agentes menos comumente encontrados (YASUMITSU, 2019).

### **3.3 *Staphylococcus pseudintermedius* e resistência aos antimicrobianos**

*S. pseudintermedius* não é um comensal habitual em humanos, porém, isolou-se essa bactéria das narinas de tutores de cães portadores de piodermite estafilocócica, sendo a origem zoonótica confirmada por meio de testes moleculares (PENA, 2007). Esse fator aponta para o risco de transmissão de *S. pseudintermedius*, principalmente para os tutores de animais de estimação, principalmente devido ao contato cada vez mais próximo entre as duas espécies. Como agravante, antimicrobianos utilizados no tratamento de cães são similares àqueles utilizados em seres humanos, e na sua maioria, o uso é indiscriminado (FRANK et al., 2009).

*S. pseudintermedius* é a espécie de *Staphylococcus* coagulase positiva mais recentemente relatada e forma com *S. intermedius* e *S. delphini* o grupo conhecido como SIG (*Staphylococcus intermedius* group) (BANNOEHR et al., 2007). Estes micro-organismos são isolados de várias espécies animais, tanto como agentes de enfermidades como parte da microbiota normal (SASAKI et al., 2007). A diferenciação das espécies só é possível por análise genômica (DEVRIESE et al., 2009). Assim, a identificação correta das espécies envolvidas em afeções nem sempre é realizada, não se conhecendo a real prevalência de *S. pseudintermedius* (BANNOEHR e GUARDABASSI, 2012; BÖRJESSON et al., 2015).

*S. pseudintermedius* são cocos gram positivos e representam cerca de 90% dos estafilococos isolados de cães, sendo isolados de narinas, região perianal, orofaringe, e axilas tanto de animais saudáveis como daqueles com piodermite (VAN DUIJKEREN, et al., 2011). Estes locais são reservatórios da bactéria (VAN DUIJKEREN, et al., 2011), mas quando há um problema subjacente que altera a resistência da pele, pode haver infecção secundária resultando em doenças dermatológicas (SOMAYAJI et al., 2016). *S. pseudintermedius* foi descrita por Devriese e colaboradores (2005) como a bactéria mais isolada e identificada nas patologias de pele em cães, sendo um dos principais agentes etiológicos que requerem o uso de antimicrobianos (DEVRIESE, 2009).

*S. pseudintermedius* possuem temperatura de crescimento ótimo de 35-37°C, sendo,

portanto, mesófilas, são anaeróbias facultativas, catalase positivas, não apresentam motilidade e não forma esporos (QUINN et al., 2002; BOND & LOEFFLER, 2012). Crescem de forma rápida (em torno de 24 horas) na maioria dos meios nutritivos, produzindo colônias redondas, lisas, elevadas e brilhantes, com cerca de 1 a 2 mm e com uma coloração que varia entre branco-acinzentado e amarelado, facilitando assim seu estudo e compreensão (BOND & LOEFFLER, 2012).

Uma das maiores preocupações em clínicas de pequenos animais, principalmente na área da dermatologia, é o número crescente de isolados identificados como *Staphylococcus* spp. resistentes à meticilina, que são causa importante de morbidade em animais, e ainda, risco para seus tutores (SASAKI et al., 2007).

Cabe salientar que os estafilococos resistentes a meticilina são com frequência, resistentes a múltiplas classes de agentes antimicrobianos, incluindo os aminoglicosídeos, clindamicina, macrolídeos, fenicóis, quinolonas, sulfonamidas e tetraciclina. A observação de resistência múltipla deverá indicar a possibilidade de resistência a meticilina. Entretanto, há registros de cepas de *S. aureus* resistentes a meticilina, mas que não apresentam resistência a outras classes de agentes antimicrobianos, isoladas em populações de pacientes ambulatoriais e hospitalizados (TAVARES, 2000).

Considerando que *S. pseudintermedius* só pode ser identificado por métodos moleculares, é possível que grande parte dos *Staphylococcus* spp. sejam *S. pseudintermedius*. Um estudo realizado por PENNA et al. (2010), na cidade do Rio de Janeiro, isolou 151 amostras de animais que apresentavam otite externa, demonstrando a presença de 60,3% de *Staphylococcus* spp., destes 38,4% foram de *S. pseudintermedius*, 15,4% de *S. schleiferi* e 14,3% de *S. aureus*. Outro estudo realizado em Belo Horizonte, demonstrou também alta prevalência de otite por *S. pseudintermedius*, apresentando 59,6% das amostras analisadas (SCHERER et al., 2018).

### **3.4 Antimicrobianos: oxacilina, cefovecina e gentamicina**

Atualmente vários estudos vêm relatando o aumento da disseminação de cepas resistentes aos betalactâmicos, anteriormente eficazes no tratamento das infecções estafilocócicas. Nestes casos a modificação das proteínas ligantes de penicilina, sintetizadas pelo gene *mecA* é um dos principais mecanismos de resistência identificados (AARESTRUP et al., 2001).

A oxacilina é uma droga bastante utilizada em tratamentos por estafilococos, sendo associada ao uso de um aminoglicosídeo por um período de tempo curto (3 a 7 dias), é ativa contra a maioria dos cocos gram-positivos, em especial os estreptococos beta-hemolíticos, pneumococos e estafilococos não-produtores de penicilinase (ANVISA, 2018). Resistência de *Staphylococcus sp* à meticilina e à oxacilina foram relatados já na década de 60, devido principalmente a presença do gene *mecA*. Os estafilococos foram capazes de desenvolver rápida resistência aos antibióticos (TAVARES, 2000).

Atualmente, estafilococos vêm registrando índices de resistência considerados notavelmente altos de 30% a 66%. A resistência é resultado de genes cromossômicos que codificam modificações no receptor de ação dos beta-lactâmicos, as proteínas ligadoras de penicilinas (PBPs), havendo a produção de novas PBPs (PBP2' ou PBP 2a) apresentando baixa afinidade pelos beta-lactâmicos. Em menor frequência os estafilococos podem apresentar um nível baixo de resistência à oxacilina e à meticilina devido à produção de uma PBP estruturalmente modificada ou pela superprodução de beta-lactamases que inativam estes antimicrobianos (NAKANO, 2004). Deve-se salientar que os estafilococos são, igualmente, resistentes às cefalosporinas, embora possa apresentar discrepâncias na sensibilidade demonstrada no antibiograma (WERNICK, 2010).

A cefovecina é classificada como cefalosporina semissintética de terceira geração, indicada no tratamento de infecções de pele e do trato urinário de cães e gatos (STEGEMANN et al., 2006). São classificadas em gerações, seguindo as características cronológicas de sua síntese. Seu diferencial em relação às outras cefalosporinas é sua alta ligação às proteínas plasmáticas, o que lhe confere longo período de ação e, conseqüentemente, um menor número de aplicações facilitando assim a rotina veterinária (PAPP et al., 2010).

A gentamicina pertence ao grupo dos aminoglicosídeos derivados da glicose. O primeiro antimicrobiano deste grupo descoberto e utilizado como medicamento foi a estreptomina, extensamente utilizada no tratamento de algumas doenças, como por exemplo, a tuberculose (NEVES, 2007). O principal mecanismo de resistência dos estafilococos é a inativação das drogas por enzimas celulares modificadoras dos aminoglicosídeos. Vários *loci* distintos codificam estas enzimas modificadoras, sendo a mais conhecida dessas regiões, a que codifica as enzimas acetiltransferase (AAC), adenililtransferase (ANT) e fosfotransferase (APH) (VIVEK, 2000). Alguns destes mecanismos já foram descritos na literatura e incluem a eliminação do antimicrobiano para o exterior da célula (bombas de efluxo) e a redução da permeabilidade celular ao antimicrobiano (LAMBERT, 2012).

### **3.5 Métodos para determinar a suscetibilidade aos antimicrobianos**

#### **3.5.1 Teste de difusão de discos**

O teste de difusão em disco é uma técnica utilizada para determinar a sensibilidade ou resistência bacteriana *in vitro* frente aos agentes antimicrobianos utilizados na terapêutica. No método de difusão em discos são utilizados discos impregnados com concentrações conhecidas dos antimicrobianos em placas contendo meio de cultura (Mueller-Hinton) e concentrações padronizadas da bactéria alvo em cultura pura (CLSI, 2019).

Os testes de sensibilidade são indicados quando se acredita que o organismo causador da infecção pertence a uma espécie capaz de demonstrar alta resistência aos agentes antimicrobianos de uso mais recorrente (CLSI, 2019).

Este método é amplamente utilizado na rotina veterinária, devido ao seu baixo custo, praticidade, eficácia e facilidade de interpretação. O teste é feito com a cultura da bactéria em uma placa de Petri e depois a aplicação de discos contendo os antibióticos. A amostra fica incubada geralmente entre 18 a 24 horas e o resultado pode ser estimado logo em seguida. Cada antibiótico gera uma região de atividade em torno da colônia no formato de um disco ou halo, cujo tamanho permitirá classificar o micro-organismo em sensível, intermediário ou resistente a determinada droga (WINSTANLEY, 2011).

Ao contrário do processo manual de realização do antibiograma, têm surgido a implementação de equipamentos que melhoram as práticas laboratoriais, tendo como vantagens a automatização dos processos. A automatização deste processo confere melhor padronização dos resultados e aumento da qualidade dos dados, reduzindo erros e risco de contaminação, e assim, gerando mais agilidade, segurança e redução de custos (LESTARI, 2008).

#### **3.5.2 Concentração inibitória mínima - CIM**

A CIM é a quantidade mínima de determinado antimicrobiano suficiente para inibir o crescimento visível do micro-organismo (ARENDRUP et al., 2017). A determinação da CIM pode ser realizada por técnicas de diluição em caldo (macrodiluição e microdiluição), sendo a técnica de microdiluição mais utilizada para economizar meios de cultura, reagentes e por utilizar pequena quantidade dos antimicrobianos.

A principal desvantagem do método de macrodiluição prende-se com a morosidade da

preparação das soluções antibióticas para cada teste, da possibilidade de erro na preparação das mesmas e da grande quantidade de reagentes e espaço exigido para cada análise. Já um ponto positivo da técnica é a facilidade em produzir grande quantidade de dados e facilidade em obtenção de resultados definitivos e concretos. (JORGENSEN & FERRARO, 2009).

A miniaturização da técnica, utilizando placas de microdiluição tornaram os testes de diluição em caldo práticos e populares. As vantagens da microdiluição incluem a reprodutibilidade, a conveniência de utilizar painéis previamente preparados, economia de reagentes e espaço reduzido. A principal desvantagem deste método (quando se utiliza painéis pré-preparados) é a inflexibilidade na seleção dos princípios ativos disponíveis no comércio (JORGENSEN & FERRARO, 2009).

O método de diluição em caldo considera a relação entre a proporção de crescimento do micro-organismo desafiado no meio líquido e a concentração da substância ensaiada. A avaliação é comparada frente a um padrão biológico de referência (PINTO et al., 2003). O método fornece resultados quantitativos e não é influenciado pela velocidade de crescimento dos micro-organismos. Sua desvantagem é a dificuldade na detecção de contaminação no caso de teste de materiais clínicos (OSTROSKY, 2008).

## 4. MATERIAIS E MÉTODOS

### 4.1 Amostras

Foram analisadas cepas de *S. pseudintermedius* previamente isoladas por MARTINS (2020) de amostras clínicas de 50 cães de diversas raças, ambos os sexos e várias idades, que apresentavam otite ou piodermite; além de secreção das narinas de seus tutores. Como critério de inclusão no estudo foram utilizados animais que apresentavam otite ou piodermite recidivantes e que não tinham sido submetidos à antibioticoterapia nos últimos dez dias antes da coleta.

Os micro-organismos foram isolados e identificados como pertencentes ao gênero *Staphylococcus* por métodos tradicionais de cultivo e identificados a espécie *S. pseudintermedius* pela técnica de PCR. As cepas puras foram armazenadas (em ultrafreezer -80°C) na bacterioteca do Laboratório de Epidemiologia Molecular da Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade Federal de Uberlândia.

Para este estudo foram utilizados todos os 91 isolados identificados como *S. pseudintermedius* pelo método molecular, sendo 47 (51,64%) cepas provenientes de animais e 44 (48,36%) isoladas de humanos. Em algumas coletas, mais de uma cepa foi isolada. Das 91 estirpes em estudo, quatro (4,39%) foram isoladas de otites de cães, 43 (47,25%) de piodermites e 44 (48,36%) de narinas de tutores.

Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética na Utilização de Animais (CEUA) protocolo nº 055/18 e Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos (CEPSH), sob o número de parecer 2.980.894.

### 4.2 Testes de susceptibilidade aos antimicrobianos

As cepas foram submetidas a dois testes diagnósticos para avaliar a susceptibilidade a gentamicina, cefovecina e oxacilina, o teste de difusão em discos e a concentração inibitória mínima. Os antimicrobianos foram selecionados pela sua relevância no seu uso cotidiano em clínicas veterinárias.

Para as análises, as cepas foram descongeladas em temperatura ambiente por alguns minutos e reativadas em caldo infusão de cérebro e coração – BHI (Oxoid®) por 24 horas a 37°C, em seguida, foram semeadas na superfície de Tryptic Soy agar- TSA (BD®) e incubadas por 24 horas a 37 °C.

Para os testes, a concentração do inóculo foi padronizado, introduzindo duas a três colônias puras diluídas em NaCl 0,85% estéril até a turvação equivalente a 0,5 na escala de MacFarland, que corresponde a aproximadamente  $1,0 \times 10^4$  UFC/mL (CLSI, 2020).

### 4.3 Teste de difusão em discos

Todos os procedimentos foram realizados conforme protocolo descrito no CLSI (2019). Para isso, foram preparadas placas de ágar Mueller-Hinton (Oxoid®) estéril em uma camada uniforme com aproximadamente 4 mm do meio e semeado em sua superfície, a suspensão bacteriana previamente preparada e padronizadas. A semeadura foi realizada com auxílio de *swab* estéril de forma suave em todas as direções da placa (cinco direções), procurando abranger toda a superfície existente.

Após repouso por cinco minutos para absorção do inóculo foram depositados na superfície do ágar os discos de gentamicina (10µg-Cefar®), cefovecina (30µg- Oxoid®) e oxacilina (1µg-Cefar®). Após aproximadamente 15 minutos de repouso, as placas foram incubadas em temperatura a 35°C, por um período de 16 a 20 horas, em posição invertida.

A leitura e interpretação dos resultados foram realizadas pela medição dos halos de inibição com o auxílio de régua milimetrada e comparação com os pontos de corte indicados pelo CLSI veterinário e humano (2019), não possuindo divergência entre os valores para classificação das cepas de cães e tutores como sensível, com resistência intermediária ou resistente (tabela 1).

**Tabela 1.** Tamanho dos halos (mm) para classificação da susceptibilidade de *S. pseudintermedius* aos antimicrobianos.

Antimicrobiano	Sensível	Resistência Intermediária	Resistente
<b>Oxacilina</b>	≥ 18	-	≤ 17
<b>Gentamicina</b>	≥ 15	13-14	≤ 12
<b>Cefovecina</b>	≥ 24	21-23	≤ 20

CLSI Veterinário (2019), CLSI humano (2019)

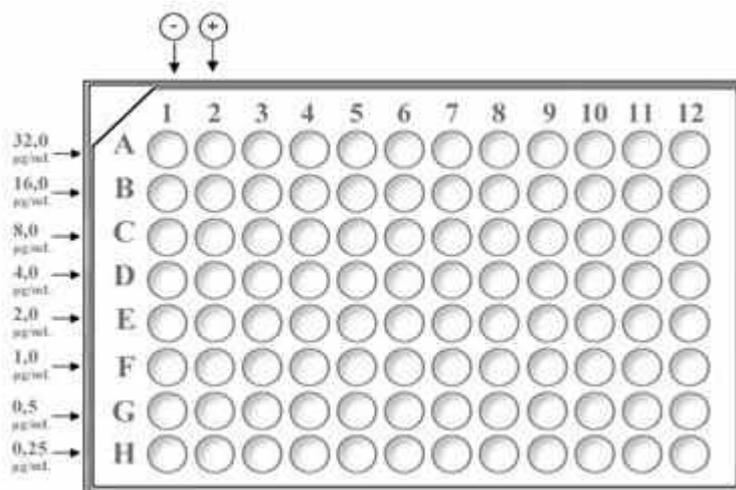
### 4.4 Concentração inibitória mínima - CIM

Foi utilizada a técnica da microdiluição em caldo conforme protocolo padronizado pelo *Clinical Laboratory Standards Institute* (CLSI, 2019). Foram testados os antimicrobianos oxacilina, cefovecina e gentamicina, de acordo com a sua revelância na rotina veterinária.

Foram utilizadas microplacas estéreis de 96 poços, individuais para cada antimicrobiano. Inicialmente foi ajustado o caldo Mueller-Hinton (MH) com adição de 0,37g/100 mL de  $\text{Ca}^{2+}$  e 0,835g/100 mL de  $\text{Mg}^{2+}$  na concentração final de 32 $\mu\text{g/mL}$ . Em sequência, 180 $\mu\text{L}$  da solução antibiótica foi adicionada nos poços da linha 1 de cada microplaca e os poços 2 a 8 foram preenchidos com 100 $\mu\text{L}$  de caldo MH ajustado.

A diluição em série foi realizada transportando 100  $\mu\text{L}$  do poço da primeira linha para a segunda, da segunda para a terceira, e assim sucessivamente, até o oitavo poço, como não há linha I, depois de homogeneizar a linha H, os últimos 100  $\mu\text{L}$  foram descartados. Após isso, foram acrescentados 80  $\mu\text{L}$  de caldo MH suplementado a todos os poços da microplaca e 20  $\mu\text{L}$  da suspensão bacteriana anteriormente preparada (padronizada em NaCl 0,85% estéril para a escala de 0,5 de MacFarland), obtendo-se as concentrações finais de 0,25, 0,5, 1, 2, 4, 8, 16 e 32  $\mu\text{g/mL}$ .

Como controle negativo foi utilizado meio MH sem o acréscimo de bactérias na linha 1 e como controle positivo foi utilizado uma cepa de *S. pseudintermedius* na linha 2 e. A figura número 1 ilustra o arranjo das microdiluições e concentrações nas microplacas.



**Figura 1:** Esquema adaptado de TAVARES (2020), demonstrando a disposição das microdiluições dos antimicrobianos nas microplacas. 1: controle negativo sem bactérias. 2: controle positivo. A, B, C, D, E, F, G e H: diluições seriadas do antimicrobiano ( $\mu\text{g/mL}$ ). Números 3 a 12: cepas a serem testadas.

As microplacas foram incubadas em aerobiose a 37°C por 18 horas para testar a

susceptibilidade a gentamicina e cefovecina e por 24 horas para a oxacilina e após esse período foi realizada a leitura visual. A CIM foi definida como a menor concentração do antibiótico, na qual não foi observado crescimento visível da bactéria pela ausência de turvação do meio. Os pontos de corte para classificar a susceptibilidade de *S. pseudintermedius* estão descritos na tabela 2.

**Tabela 2.** Pontos de corte ( $\mu\text{g}$ ) para classificação da susceptibilidade de *S. pseudintermedius* aos antimicrobianos pela CIM.

Antimicrobiano	Sensível	Resistência Intermediária	Resistente
<b>Oxacilina</b>	$\leq 0,25$	-	$\geq 0,5$
<b>Gentamicina</b>	$\leq 4,0$	8	$\geq 16$
<b>Cefovecina</b>	$\leq 0,5$	1	$\geq 2$

CIM: concentração inibitória mínima. CLSI veterinário (2019), CLSI humano (2019)

#### 4.5 Análise dos resultados

Os dados foram tabulados e submetidos a estatística descritiva. Os índices de sensibilidade, especificidade, valor preditivo positivo e negativo foram calculados considerando os valores da CIM como padrão ouro com o auxílio do programa *Graphpad Prism 8.3*.

Para realizar a comparação entre os resultados da CIM e teste de difusão em discos para os antimicrobianos e a mensuração da associação entre os resultados obtidos na concentração inibitória mínima para oxacilina, cefovecina e gentamicina em cães e tutores foi utilizado Teste de Pearson ( $p < 0,05$ ). A classificação dessa associação foi determinada de acordo com o valor de  $r$  Mukaka (2012), que estabelece como uma associação muito muito forte (0,9 a 1,0), uma associação forte (0,7 a 0,9), uma associação moderada, (0,5 e 0,7), uma associação fraca (0,3 a 0,5), e por fim para ser considerada uma associação fraca insignificante ou inexistente (0,3 a 0,0). Para estabelecer o nível de significância entre os isolados de animais e tutores classificados como MRSP, resistentes pela CIM à cefovecina e gentamicina, foi utilizado o Teste Exato de Fischer ( $\sigma=0,05$ ), considerando significativo o valor de  $p < 0,05$ , IC =95%.

## 5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 Susceptibilidade *in vitro* a oxacilina

A determinação precisa da resistência à oxacilina (metecilina) de *S. pseudintermedius* causadores de infecções é extremamente importante (ANAND et al., 2009), já que influencia diretamente na escolha da antibioticoterapia, e pode também contribuir no controle da sua disseminação (BROEKEMA et al., 2009; PRAMODHINI et al., 2011).

As resistências a oxacilina determinadas pela CIM e teste de difusão em discos, discriminados pelo local de isolamento estão na tabela 3.

**Tabela 3.** Resistência à oxacilina por *S. pseudintermedius* isolados de tutores e cães, identificando o local de isolamento.

Local de isolamento (N)	Resistência N (%)	
	CIM	Difusão de discos
Otite de cães	2/4 (4,25%)	0/4 (0%)
Piodermite de cães	12/43 (25,53%)	11/43 (23,40%)
Tutores	22/44 (50%)	5/44 (11,36%)
Tutores e cães*	11/91 (12,08%)	5/91 (5,49%)

\* Isolados concomitantes do cão e seu tutor.

*S. pseudintermedius* é uma bactéria de alta prevalência nas clínicas veterinárias como agentes etiológicos de otites e piodermites (BOTONI, 2016). Quando esta espécie é classificada como MRSP (*S. pseudintermedius* resistente a metecilina), a importância é ainda maior, considerando as dificuldades que representam para a terapêutica (DEVESA, 2015) e o potencial zoonótico (ROSSI, 2011). A resistência ao antimicrobiano em cepas isoladas de animais, também representam perigo à saúde humana, pois estudo determinou que o contato e a presença de cães na residência foram fatores de risco para a infecção humana (SOMAYAJI, 2016).

Em nosso estudo, considerando a CIM como padrão ouro, MRSP foi identificada fenotipicamente em 37/91 (40,65%) das cepas analisadas o que concorda com estudos semelhantes (BOURGUIGNON, 2016; SOMAYAJI, 2016; BOTONI, 2016; PERRETEN et

al., 2010). Cepas MRSP são especialmente importantes devido seu envolvimento em infecções graves em várias espécies, com destaque para animais domésticos como cães e gatos (SASAKI, 2007; MILLER, 2013).

Botoni (2016) analisou na cidade de Belo Horizonte, *S. pseudintermedius* isolados de 43 cães com piodermite superficial entre os meses de março e julho de 2013, observando assim que 21/62 amostras (34%) eram resistentes à oxacilina, semelhante ao observado em nosso estudo.

Outro estudo realizado em 103 isolados de MRSP na América do Norte e Europa, mostrou que 90% das cepas possuía resistência a antimicrobianos além dos  $\beta$ -lactâmicos, que incluía a ciprofloxacina, clindamicina, eritromicina, kanamicina, estreptomicina e trimetropim, sendo observada também resistência a gentamicina e tetraciclina em 70% dos casos, e em 57% ao cloranfenicol (PERRETEN et al., 2010).

A associação entre a resistência das cepas de cães e tutores à oxacilina determinada pelo teste de Pearson  $r=0,4098$  ( $p= 0,0057$ ) é classificada como fraca por MUKAKA (2012). Essa baixa correlação indica que a resistência das cepas isoladas de animais não reflete na resistência de isolados de humanos, e vice-versa. Apesar de não ter sido realizada análises para verificar a relação epidemiológica entre os isolados de animais e humanos, é possível inferir, que mesmo que tenha havido a transferência de *S. pseudintermedius* entre as espécies, pressão de seleção distintas podem ter definido o fenótipo das cepas (HARTMANN, 2005).

## 5.2 Susceptibilidade *in vitro* a cefovecina

A cefovecina é um antimicrobiano betalactâmico, classificado como cefalosporina de terceira geração e de longa ação, de uso exclusivo veterinário, utilizado especialmente em cães e gatos domésticos. Relatos e estudos anteriores apontam boa sensibilidade em cepas de *S. pseudintermedius* a este antimicrobiano (IYORI, 2013; HARIHARAN, 2014), assim como observado em nosso estudo (tabela 4).

Hariharan (2014) estudou ao longo de um período de dois anos, 66 casos de piodermite canina em Granada, Índias Ocidentais. Do total de 116 isolados bacterianos, a maioria eram espécies Gram-positivas, e o organismo mais comumente identificado foi *S. pseudintermedius*. Diferente de nosso estudo, todos os isolados de estafilococos foram suscetíveis à cefovecina, e a outros beta-lactâmicos como amoxicilina-ácido clavulânico, cefoxitina, cefpodoxima e cefalotina. A multirresistência foi evidente apenas entre isolados de *S. pseudintermedius* (6/28) e isolados de *S. hominis* (3/6).

**Tabela 4.** Resistência à cefovecina por *S. pseudintermedius* isolados de tutores e cães, identificando o local de isolamento.

Local de isolamento (N)	Resistência N (%)	
	CIM	Difusão de discos
Otite de cães (X)	0/4 (0%)	0/4 (0%)
Piodermite de cães	11/43 (23,40%)	1/43 (2,12%)
Tutores	16/44 (36,36%)	3/44 (6,81%)
Tutores e cães*	4/91 (4,39%)	1/91 (1,09%)

\*Isolados concomitantes do cão e seu tutor com resistência a cefovecina.

Os índices de resistência determinados neste estudo 27/91 (29,67%) são considerados preocupantes, especialmente os observados em cepas isoladas de humanos (36,36%), já que é um antimicrobiano de uso exclusivo em animais, principalmente cães e gatos. De outro lado, a ceftriaxona, que também é uma cefalosporina de terceira geração é amplamente utilizada no tratamento de infecções de pele e otites em humanos e é um dos antimicrobianos de eleição para o tratamento pediátrico (STEFANI et al., 2018). É provável então, que haja resistência cruzada entre a cefovecina e a ceftriaxona.

Quando os resultados para a resistência a cefovecina nos testes CIM e difusão em discos foram comparados, o valor de  $r = -0,094$  ( $p = 0,534$ ), demonstrou que não há associação (MUKAKA, 2012). Assim, é provável que laboratórios veterinários, que utilizam majoritariamente o teste de difusão em disco para determinar a resistência bacteriana, estejam indicando erroneamente a susceptibilidade a esta droga, o que reforça a necessidade de utilização de métodos adequados para o diagnóstico e determinação da resistência de *S. pseudintermedius* a cefovecina e outros antimicrobianos.

### 5.3 Susceptibilidade *in vitro* a gentamicina

Os menores índices de resistência de *S. pseudintermedius* foram observados para a gentamicina (tabela 5). Na CIM, considerada o padrão ouro para o diagnóstico, somente 5/91 (5,49%) isolados de *S. pseudintermedius* apresentaram resistência a esse fármaco (tabela 5).

Outros estudos relatam que em testes *in vitro* a gentamicina teve um bom

desempenho nos tratamentos de otites e piodermites, quando a CIM foi o método de classificação da susceptibilidade das cepas (OSLAND, 2012; METINER, 2015; BOTONI, 2016). Em concordância nosso estudo, um trabalho semelhante realizado por Neves (2007) na cidade de Jaboticabal no estado de São Paulo, demonstrou que apenas 4% das 50 cepas de estafilococos analisadas apresentaram resistência a gentamicina.

**Tabela 5.** Resistência à gentamicina por *S. pseudintermedius* isolados de tutores e cães, identificando o local de isolamento.

Local de isolamento (N)	Resistência N (%)	
	CIM	Difusão de discos
Otite de cães	0/4 (0%)	0/4 (0%)
Piodermite de cães	1/43 (2,12%)	0/43 (0%)
Tutores	4/44 (9,09%)	2/44 (4,54%)
Tutores e cães	0/91 (0%)	0/91 (0%)

\*Isolados concomitantes do cão e seu tutor com resistência a gentamicina.

Não houve associação entre a resistência à gentamicina determinadas nos testes de difusão em discos e CIM ( $r=0,1089$ ;  $p=0,4817$ ) (MUKAKA, 2012).

#### 5.4 Perfil de resistência de *S. pseudintermedius* isolados de animais e tutores

O perfil de resistência de *S. pseudintermedius* isoladas de cães e seus tutores aos antimicrobianos oxacilina, cefovecina e gentamicina, utilizando a CIM como método diagnóstico está na tabela 6.

Somente uma cepa isolada de humano (perfil 1) apresentou resistência concomitante aos três antimicrobianos. Apesar disso, por se tratar de fármacos considerados as últimas opções terapêuticas para infecções por patógenos resistentes, este resultado é preocupante.

**Tabela 6.** Perfis de resistência determinada pela CIM de *S. pseudintermedius* isoladas de piodermites e otites de cães e das narinas de seus tutores.

Perfis de virulência	Cães (%)	Humanos (%)	N (%)
	N=47	N=44	N=91
P1: OXA, CEF, GEN	0 (0%)	1 (2,28%)	1 (1,09%)
P2: OXA, CEF	11 (23,40%)	14 (31,83%)	25 (27,47%)
P3: OXA	3 (6,38%)	8 (18,19%)	11 (12,08%)
P4: CEF	0 (0%)	1 (2,28%)	1 (1,09%)
P5: GEN	1 (2,12%)	3 (6,81%)	4 (4,39%)
P6: Sensível a OXA, CEF e GEN	32 (68,0%)	17 (38,62%)	49 (53,88%)
<b>Total</b>	47 (100,0)	44 (100,0)	91 (100,0)

OXA= oxacilina; CEF= cefovecina; GEN = gentamicina. Cálculo realizado pelo Teste Pearson ( $p < 0,05$ ).

Dos isolados de animais, 14/47 (29,78%) e de humanos, 23/44 (52,27%) (perfis 1, 2 e 3) foram classificadas fenotipicamente como MRSP. Houve maior significância de cepas isoladas de humanos com este fenótipo quando comparado a isolados de animais ( $p = 0,0346$ ).

Cepas resistentes à oxacilina (metilina) comumente apresentam resistência a outros beta-lactâmicos, aminoglicosídeos, clindamicina, macrolídeos, fenicóis, sulfonamidas, quinolonas e tetraciclina (TAVARES, 2000; PERRETEN et al., 2010). Neste estudo, das 37/91 (40,66%) cepas classificadas como MRSP, 26/91 (28,57%) foram também resistentes a cefovecina, um betalactâmico exclusivo para animais. Houve fraca associação entre as resistências à oxacilina e cefovecina por cepas de *S. pseudintermedius* isoladas de animais e humanos,  $r = 0,392$  ( $p = 0,0045$ ), caracterizando que a resistência fenotípica de uma não reflete na outra.

A percentagem de cepas de *S. pseudintermedius* classificadas como resistentes pela CIM à cefovecina não foi significativa em isolados de tutores 16/44 (36,36%) e de cães 11/47 (23,40%) ( $p = 0,2509$ ), pelo Teste exato de Fischer, sendo este um teste comparativo, que demonstra que não houve diferença nos percentuais de resistência, quando comparamos as cepas de humanos e animais. Relatos anteriores apontam boa sensibilidade em cepas de *S. pseudintermedius* a cefovecina (IYORI, 2013; HARIHARAN, 2014). Porém, estudos em dermatologia veterinária, sugerem que estafilococos patogênicos adquiriram lentamente resistência às cefalosporinas (SCHERER, 2018).

A cefovecina é um fármaco prescrito para animais, principalmente cães e gatos, mas estudos mostraram sua resistência em cepas de humanos, algumas hipóteses podem explicar estes resultados encontrados, como a resistência cruzada com outras drogas semelhantes e disponíveis para o tratamento humano, como por exemplo a cefotaxima, cefpodoxima, ceftazidima e ceftriaxona (GUIMARÃES, 2010) ou que a resistência observada em cepas

humanas seja por serem originadas de cães (BOURGUIGNON, 2016).

Somente uma cepa isolada de animais e quatros de humanos apresentaram resistência a gentamicina, indicando que este medicamento é uma opção no tratamento de infecções por *S. pseudintermedius* resistentes, o que concorda com outros estudos em *S. pseudintermedius* isolados de infecções caninas (OSLAND, 2012; METINER, 2015; BOTONI, 2016).

O perfil 6, onde as cepas apresentavam sensibilidade a todos os antimicrobianos foi o mais frequente, representando 53,88% (49/91) isolados, mostrando que estes antimicrobianos, possuem uma boa atividade farmacológica perante estas cepas.

Não foi significativo a associação entre cepas resistentes isoladas de cães e humanos ( $p=0,3504$ ) à gentamicina, ou seja, as cepas resistentes isoladas de cães, não eram a mesma de isolados de animais, não havendo assim uma associação.

### 5.5 Avaliação dos métodos diagnósticos

Os métodos diagnósticos utilizados para determinar a susceptibilidade aos antimicrobianos foram avaliados quanto a sensibilidade, especificidade, valor preditivo positivo e valor preditivo negativo considerado como “padrão ouro” a CIM (tabela 7).

**Tabela 7.** 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

\*Classificação de 0-1. Cálculos realizados pelo programa *Graphpad Prism* 8.3.

Os valores obtidos determinaram baixa sensibilidade, não sendo capaz de detectar as cepas verdadeiramente resistentes no teste de difusão em discos, para determinar a resistência a oxacilina e cefovecina quando comparado à determinação da CIM. O baixo número de resultados positivos impediu o cálculo deste índice para a gentamicina. Isso indica que, provavelmente, os profissionais prescrevam erroneamente estes antimicrobianos em infecções

estafilocócicas, já que o teste de difusão em discos é o mais utilizado em laboratórios veterinários. Esta baixa sensibilidade irá comprometer a terapêutica, provocar recidivas, e ainda, selecionará cepas resistentes facilitando sua disseminação no ambiente e para outros hospedeiros (SILVA, 2014).

De outro lado, a especificidade para os três antimicrobianos foi considerada adequada, o que demonstra que o teste de difusão em discos é capaz de excluir as cepas verdadeiramente não são resistentes. Porém, considerando a baixa sensibilidade e o consequente número de falsos negativos (SEJAS, 2003), o teste de difusão em discos não é indicado para avaliar a susceptibilidade a cefovecina e oxacilina.

O valor preditivo positivo indica a probabilidade do resultado positivo (resistência) apresentado pelo teste de difusão em discos ser realmente positivo (KAWAMURA, 2002). Os resultados obtidos para a resistência a oxacilina e cefovecina de 78% e 86%, respectivamente, foram intermediários e não foi possível o cálculo para gentamicina em função da baixa resistência a este antimicrobiano.

O valor preditivo negativo define a probabilidade do resultado negativo, indicando que a cepa é sensível, apresentado no teste de difusão em discos ser realmente negativo (KAWAMURA, 2002). A capacidade de identificar os verdadeiros suscetíveis foi de 68% para oxacilina, 75% para cefovecina e 92% para gentamicina, indicando que para oxacilina e cefovecina há um perigo razoável de o teste indicar isolados resistentes como sensíveis.

O conjunto dos resultados demonstra que o método de difusão de discos não é o mais indicado para avaliar a susceptibilidade de *S. pseudintermedius* à oxacilina e cefovecina, sendo necessário analisar um maior número de isolados à gentamicina para uma melhor conclusão. Assim, o uso do teste de difusão em discos, mesmo apresentando algumas vantagens como a facilidade de execução e baixo custo em relação à CIM, pode resultar em um maior número de falsos negativos e classificação errônea de cepas resistentes como sensíveis (LESTARI, 2008).

Em laboratórios veterinários, o uso da CIM para a avaliação da susceptibilidade aos antimicrobianos é pouco utilizada, principalmente por ser mais laboriosa. O ideal é que métodos diagnósticos para determinar a susceptibilidade aos antimicrobianos tenham alta sensibilidade, e no mínimo, boa especificidade, gerando resultados confiáveis para a implementação da terapêutica, com menor número de recidivas e menor seleção e disseminação de cepas resistentes (JONES, 2005).

## 6. CONCLUSÃO

Das 91 cepas de *S. pseudintermedius* isoladas de cães e seus tutores, 37/91 (40,65%) foram classificadas fenotipicamente como MRSP, resultado preocupante, considerando sua importância para a saúde pública.

Foram observados cinco perfis de resistência aos antimicrobianos, com resistência decrescente de *S. pseudintermedius* à oxacilina, cefovecina e gentamicina, sendo este último, o mais indicado para tratamento de piodermites e otites recidivantes em cães. O perfil em que as cepas eram sensíveis a todos os antimicrobianos foi o mais frequente.

Houve fraca associação entre as resistências à oxacilina e cefovecina por cepas de *S. pseudintermedius* isoladas de animais e humanos, caracterizando que a resistência fenotípica de uma não reflete na outra.

A avaliação do teste de difusão em discos para determinar a resistência à oxacilina e cefovecina demonstrou que o método possui baixa sensibilidade para determinar *S. pseudintermedius* resistentes quando comparado ao padrão ouro, a CIM. Desta forma, mesmo sendo considerado um método de baixo custo e de fácil na execução, seu uso não é indicado para estabelecer a resistência de *S. pseudintermedius* a estes dois antimicrobianos.

São necessárias outras pesquisas e estudos complementares com maior número de cepas para avaliar o uso dos testes de difusão em discos para indicar a resistência de *S. pseudintermedius* à gentamicina.

## REFERÊNCIAS

- ANAND, K.B. AGRAWAL, P. KUMAR, S. KAPILA, K. Comparison of cefoxitin disc diffusion test, oxacillin Screen Agar, and PCR for *mecA* gene for detection of MRSA. *Indian J Med Microbiol.* 2009.
- ANDRADE, S. F. 2002. Manual de terapêutica veterinária. Roca, São Paulo.
- ANDREWS, J.M. Determination of minimum inhibitory concentrations. *Journal of antimicrobial chemotherapy*, Oxford, v. 48. 2001.
- ANVISA. Disponível em: [http://www.anvisa.gov.br/servicosaude/controlere\\_rm/cursos/atm\\_racional/modulo2/metodos2.htm](http://www.anvisa.gov.br/servicosaude/controlere_rm/cursos/atm_racional/modulo2/metodos2.htm). Acesso em 15 de novembro de 2018.
- AQUINO, D. S. Por que o uso racional de medicamentos deve ser uma prioridade? *Ciênc. saúde coletiva*, Rio de Janeiro, v. 13, supl. p. 733-736, abr. 2008.
- BABAEI, M. R. et al. Extremely high prevalence of antiseptic resistant Quaternary Ammonium Compound E gene among clinical isolates of multiple drug resistant *Acinetobacter baumannii* in Malaysia. *Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials*, p. 1–5, 2015.
- BANNOEHR, J.; GUARDABASSI, L. *Staphylococcus pseudintermedius* in the dog: taxonomy, diagnostics, ecology, epidemiology and pathogenicity. *Vet Dermatol.* v. 23, 2012.
- BOTONI L.S. et al. Piodermite Superficial Canina por *Staphylococcus Pseudintermedius* Resistente à Meticilina (MRSP) - Revisão de Literatura. *Med vep Dermato - Revista de Educação Continuada em Dermatologia e Alergologia Veterinária*, Curitiba, Medvep, 2014; 270-277.
- BOURGUIGNON, E. VIÇOSA, G.N. CORSINI, C.M.M. MOREIRA, MAS. NERO, L.A. CONCEIÇÃO, L.G, 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>
- BRASIL ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resistência antimicrobiana e ameaça mundial. RDC 17. Disponível em: [http://portal.anvisa.gov.br/noticias/-/asset\\_publisher/FXrpx9qY7FbU/content/resistencia-antimicrobiana-e-ameaca-global](http://portal.anvisa.gov.br/noticias/-/asset_publisher/FXrpx9qY7FbU/content/resistencia-antimicrobiana-e-ameaca-global). Acesso em 17 de janeiro de 2020.

BRASIL ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resistência antimicrobiana e ameaça mundial. RDC 18. Disponível em: <http://portal.anvisa.gov.br/documents/33852/271855/Plano+Nacional+para+a+Preven%C3%A7%C3%A3o+e+o+Controle+da+Resist%C3%Aancia+Microbiana+nos+Servi%C3%A7os+de+Sa%C3%BAde/9d9f63f3-592b-4fe1-8ff2-e035fcc0f31d>. Acesso em 15 de março de 2020.

BROEMEKA, N. M.; VAN, T.T.; MONSON, T.A.; MARSHALL, S.A.; WARSHAUER, D. M. Comparison of cefoxitin and oxacilin disks diffusion methods for detectation of mecA-mediated resistance in *Staphylococcus aureus* in large-scale study. *Journal of Clinical Microbiology*, v. 47, n.1, p 217-219, 2009.

CASTELA, H. A. G. B. Contribuição para o estudo da utilização terapêutica de antibióticos na clínica de animais de companhia na clínica de animais de companhia. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) - Universidade Técnica de Lisboa, Lisboa, 2013.

CLSI. - Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing: twenty-third informational supplement. CLSI M100-S23, Wayne, 2017. CLSI. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Twenty-Second Informational Supplement. CLSI document M100-S22. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2019.

CONTE, A.P. Demodicose canina generalizada: relato de caso. 12f. Monografia (Curso de Especialização *Latu Sensu* em Clínica Médica e Cirúrgica de Pequenos Animais) Curitiba, 2008.

COSTA, L. F. R. Método automático para identificação da região de inibição e de rótulos alfanuméricos de antibióticos posicionados em antibiogramas por disco-difusão, 2014.

DAKSHINKAR, N. P., KALOREY, D. R., GANORKAR, A. G. & HARNE, S. D. 1992. In vitro sensitivity pattern of bacterial isolates from cases of canine otitis. *Indian Veterinary Journal*, 69, 1075-1076.

DEVESA, J. S. P. Resistência a antibióticos em *staphylococcus pseudintermedius* de isolados cutâneos de cães com piodermite superficial. Dissertação de Mestrado. Universidade Lusófona de Humanidades e Tecnologias, 2015. Disponível em: <https://recil.grupolusofona.pt/handle/10437/6798>. Acesso em 15 de setembro de 2020.

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

DEVRIESE, L.A., HERMANS, K., BAELE, M., & HAESEBROUCK, F. (2009). *Staphylococcus pseudintermedius* versus *Staphylococcus intermedius*. *Vet Microbiol*, 133(1–2), 206–207.

DIRIBE, O.; THOMAS, S.; ABUOUN, M.; FITZPATRICK N.; RAGIONE R. Genoty picrelatedness and characterization of *Staphylococcus pseudintermedius* associated with post-operative surgical infections in dogs. *Journal of Medical Microbiology*, v. 64, 2015.

ETTINGER, S. & FELDMAN, E. 2004. *Tratado de medicina interna veterinária: doenças do cão e do gato*. Guanabara Koogan, Rio de Janeiro.

FAGRA. Disponível em: Higienização do pavilhão auricular. Disponível em: <http://www.fagra.com.br/index.php>. Acesso em 20 de janeiro de 2020.

GRIFFETH, GC; MORRIS, DO; ABRAHAM, JL et al. Screening for skin carriage of methicillin-resistant coagulase-positive staphylococci and *Staphylococcus schleiferi* in dog with healthy and inflamed skin. *Vet Dermatol.*, v.19, p. 142-149, 2008.

Guardabassi, L., Damborg, P., Stamm, I., Kopp, P. A., Broens, E. M., Toutain, P. L., & ESCMID Study Group for Veterinary Microbiology. (2017). *Diagnostic microbiology in veterinary dermatology: present and future*. *Advances in Veterinary Dermatology*, 8.

GUARDABASSI, L.; KRUSE, H. *Princípios da Utilização Prudente e Racional de Antimicrobianos em Animais*. 2018. Disponível em: <<https://s3.amazonaws.com/academia.edu.documents/38474445/Antimicrobianos.pdf?AWSAKIAIOWYYGZ2Y53UL3A&Expires=1517962661gAGGZu85L54rQA%3D&response-content-disposition=inline%3B%20filename%3D>> Acesso em: 16 ago 2018.

GUIMARÃES, Denise Oliveira; MOMESSO, Luciano da Silva; PUPO, Mônica Tallarico. Antibióticos: importância terapêutica e perspectivas para a descoberta e desenvolvimento de novos agentes. *Quím. Nova*, São Paulo, v. 33, n. 3, p. 667-679, 2010. Acesso em 26 Novembro 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/S0100-40422010000300035>.

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. Disponível em <https://doi.org/10.1155/2014/850126>

HARMON, R. J., EBERHART, R. J., JASPER, D. E. et al. Microbiological Procedures for the diagnosis of bovine udder infection. Arlington: National Mastitis Council, 1990.

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.* <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15917140>

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

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

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.

HOLMSTRÖM, T. C. N., DAVID, L. A., MOTTA, C. C., SANTOS, T. H., COELHO, I. S., COELHO, S. M. O., MELO, D. A., & SOUZA, M. M. S. (2020). Methicillin-resistant *Staphylococcus pseudintermedius*: an underestimated risk at pet clinic. *Brazilian Journal of Veterinary Medicine*, 42, e107420. doi: 10.29374/2527-2179.bjvm107420

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.* <https://onlinebrary.wiley.com/doiabs/10.1111/j.13653164.2012.01100.x>

JONES, R. D; KANIA, S. A; ROHRBACH, B.W. et al. Prevalence of oxacillin- and multidrug resistant staphylococci in clinical samples from dogs: 1,772 samples (2001- 2005).

JONES, T. C; HUNT, R. D. *Patologia veterinária*. Editora manole, São Paulo, 6ª edição; 2000.

KADLEC, K. Characterization of canine and feline methicillin-resistant *Staphylococcus*

pseudintermedius (MRSP) from Thailand. *Veterinary microbiology*, vol.194, 2016.

KAWAMURA, Takao. Interpretação de um teste sob a visão epidemiológica: eficiência de um teste. *Arq. Bras. Cardiol.*, São Paulo , v. 79. Oct. 2002 . Available from <[http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0066-782X2002001300015](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0066-782X2002001300015) &lng=en&nrm=iso>. Acesso em 26 Novembro 2020. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1590/S0066-782X2002001300015>

KISS, G., RADVANYI, S. Z. & SZIGETI, G. 1997. New combination for the therapy of canine otitis externa I Microbiology of otitis externa. *Journal of Small Animal Practice*, 38, 51-56.

KNEGT, F. T. G. Aspectos epidemiológicos e microbiológicos da espécie *Staphylococcus pseudintermedius* nas piодermites caninas: uma revisão da literatura. Publicado em 15 de março 2019. Acesso: 14 de setembro de 2020. Disponível em: [https://repositorio.ufmg.br/bitstream/1843/30997/1/FERNANDA%20DE%20KNEGT%](https://repositorio.ufmg.br/bitstream/1843/30997/1/FERNANDA%20DE%20KNEGT%20)

LARSEN, R. F. et al. Diversity of *Staphylococcus pseudintermedius* in carriage sites and skin lesions of dogs with superficial bacterial folliculitis: potential implications for diagnostic testing and therapy. *Veterinary Dermatology*, mai. 2018; 29: 291–e100.

LEHNER, G., LOUIS, C. S., MUELLER, R. S., 2010. Reproducibility of ear cytology in dogs with otitis externa. *The Veterinary Record*, 167(1), 23.

LEITE, C. A. L.; ABREU, V. L. V.; COSTA G. M. Frequência de *Malasseziapachy dermatis* em otite externa de cães. *Arquivos Brasileiros de Medicina Veterinária e Zootecnia*, v. 55, n. 1, p. 102-104, 2003.

LOUREIRO, R. J.; ROQUE, F.; RODRIGUES, A. T., HERDEIRO, M.T.; RAMALHEIRA, E. O uso de antibióticos e as resistências bacterianas: breves notas sobre a sua evolução. *Rev. Port. Sau. Pub.* vol.34 no.1 Lisboa mar. 2016. Acesso em: 05 de novembro de 2020. Disponível em: [http://www.scielo.mec.pt/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0870-90252](http://www.scielo.mec.pt/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0870-90252)

ARENDRUP, M. C.; MELETIADIS, J.; MOUTON, K. LAGROU. Guinea and the Subcommittee on Antifungal Susceptibility Testing (AFST) of the ESCMID European Committee for Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST), 2017. Disponível em: <http://brcast.org.br/wp-content/uploads/2020/03/TSA-fungos-filamentosos-E.Def-9.3.1.pdf>

Acesso em 12 de outubro de 2020.

MARTINS, Christina Resende. Infecções estafilocócicas em cães: prevalência, resistência antibacteriana, fatores de risco e de virulência. Tese (Doutorado em Ciências Veterinárias)-Universidade Federal de Uberlândia, 2020. Disponível em: <http://doi.org/10.1493/ufu.te.2020.199>. Acesso em 20 de setembro de 2020.

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.

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

MULLER, G.H.; KIRK, R.W. Dermatologia de pequenos animais. Rio de Janeiro: Interlivros, 2003.

MURRAY, P.R.; ROSENTHAL, K.S.; KOBAYASHI, G.S. et al. Medical microbiology. 4.ed. Mosby, 2002.

36. NAKANO, V.; AVILA-CAMPOS, M.J. Survey of antimicrobial susceptibility patterns of the bacteria of the *Bacteroides fragilis* group isolated from the intestinal tract of children. Mem. Inst. Oswaldo Cruz., 99:319-324, 2004.

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

NEVES, O.D.; ROSSI, J.; ALVES, M.V.F. Detecção de genes de resistência antimicrobiana em cromossomos e plasmídeos de staphylococcus SPP.M.C.Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Departamento de Biologia Aplicada à Agropecuária, Jaboticabal, São Paulo, 2007. Disponível em: [http://www.biologico.sp.gov.br/uploads/docs/arq/v74\\_3/neves.pdf](http://www.biologico.sp.gov.br/uploads/docs/arq/v74_3/neves.pdf). Acesso em 23 de setembro de 2020.

NIBBLETT, B.M.D.; PEREIRA, M.M.; SITHOLE, F.; ORCHARD, P.A.D.; BAUMAN, E.B.

Design and validation of a three-dimensional printed flexible canine otoscopy teaching model. *Empirical Investigations*, v.12, n.2, 2017.

OSLAND AM, VESTBY LK, FANUELSSEN H, SLETTEMEAS JS, SUNDE M. 2012. Clonal diversity and biofilm-forming ability of methicillin-resistant *Staphylococcus pseudintermedius*. *J Antimicrob Chemother* 67: 841–848. Disponível em: <https://academic.oup.com/jac/article/67/4/841/860745>. Acesso em 23 de setembro de 2020.

OSTROSKY, Elissa A. et al . Métodos para avaliação da atividade antimicrobiana e determinação da Concentração Mínima Inibitória (CMI) de plantas medicinais. *Rev. bras. farmacogn.*, João Pessoa , v. 18, n. 2, p. 301-307, jun. 2008 .

PAPP, R.; POPOVIC, A.; KELLY, N.; TSCHIRRET-GUTH, R. Pharmacokinetics of cefovecin in squirrel monkey (*Saimiri sciureus*), rhesus macaques (*Macaca mulatta*), and cynomolgus macaques (*Macaca fascicularis*). *Journal of the American Association for Laboratory Animal Science*, Memphis, v. 49, n. 6, p. 805-808, 2010.

PENA, S.B. Frequência de dermatopatias infecciosas, parasitárias e neoplásicas em cães na região de Graça, São Paulo – Brasil, 2009. 12f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da UNESP, São Paulo.

PENNA, Bruno; VARGES, Renato; MEDEIROS, Luciana; MARTINS, Gabriel et al. Species distribution and antimicrobial susceptibility of staphylococci isolated from canine otitis externa. *Veterinary dermatology*, vol.21, p-292-296, 2010.

PINTO, T.J.A; KANEKI, T.M.; OHARA, M.T. Controle Biológico de Qualidade de Produtos Farmacêuticos, Correlatos e Cosméticos. 2.ed. São Paulo: Atheneu Editora, 2003.

PRAMODHINI, S.; THENMOZHIVALLI, P. R.; SELVI, R.; DILLIRANI, V.; VASUMATHI, A.; AGATHA, D. Comparison of various phenotypic methods and *mecA* based PCR the detection of MRSA. *Journal of and Diagnostic Research* , v. 5, n.7, p.1359-1362, Nov, 2011.

QUINN, P. J. et al. *Microbiologia veterinária e doenças infecciosas*. 1. ed. Porto Alegre: Artmed, 2005.

QUINN, P.J, MARKEY, B.K., CARTER, M.E., DONNELLY, W.J, & LEONARD, F.C. (2002) *Veterinary Microbiology and Microbial Disease* (1ª Ed., pp. 43-45). Blackwell

Publishing, Iowa, USA.

RAVENS, P.A. et al.: Canine superficial bacterial pyoderma: evaluation of skin surface sampling methods and antimicrobial susceptibility of causal Staphylococcus isolates. Australian Veterinary Journal, v. 92, n. 5, Mai. 2014.

RHODES, K. H. Dermatologia De Pequenos Animais consulta em 5 minutos, editora reinter, Rio de Janeiro, 2002.

RIBEIRO, R.C.N.; CORTEZI, A. M.; GOMES, D. E. Utilização racional de antimicrobianos na clínica veterinária. Revista Científica Unilago, v.1, n.1. Publicado 09 de novembro de 2018. Disponível em: <http://revistas.unilago.edu.br/index.php/revista-cientifica/article/view/127>

ROSA, C. S.; MARTINS, A. A.; SANTIN, R.; FARIA, R. O.; NOBRE, M. O.; MEIRELES, M. C. A.; MADRID, I. M.; NASCENTE, P. S. Malasseziapachy dermatitis no tegumento cutâneo e meato acústico externo de felinos hípidos, otopatas e dermatopatas, no município de Pelotas, RS, Brasil. Acta Scientiae Veterinariae, v. 34, 2006.

ROSSI, F. The Challenges of Antimicrobial Resistance in Brazil. Antimicrobial Resistance, v. 52, 2011.

ROSYCHUK, Rod A. W.; LUTTGEN, P. Doenças dos ouvidos. In: ETTINGER, Stephen J.; FELDMAN, Edward C. Tratado de medicina interna veterinária. 5. ed. 2. vol. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2004. 1048-1053 p.

SÁ, I. S.; ALMEIDA, L.F. SOUSA, C.P; BATISTA, R. M. O. B.; LIMA, D.A.S.; PEREIRA, A. P.; BENVENUTTI, M. E. M.; MACHADO, F.C.; FARIAS, M.P.P Piodermite canina: Revisão de literatura e estudo da prevalência de casos no Hospital Veterinário Universitário da UFPI, Bom Jesus . Pubvet, v. 12 No. 06 p. 131, 2018. Disponível em: <http://www.pubvet.com.br/artigo/4692/piodermite-canina-revisatildeo-de-literatura-e-estudo-de-casos-no-hospital-veterinaacuterio-universitaacuterio-da-ufpi-bom-jesus-ndash-brasil>. Acesso em 20 de julho de 2020.

SÁNCHEZ, M. A. et al. Evaluation of the osiris video reader system for disk diffusion susceptibility test reading. In: Clin. Microbiol. Infect. [S.l.: s.n.], 2001. v. 7.

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. Reclassification of phenotypically identified Staphylococcus intermedius

strains. *Journal of clinical Microbiology*, v.45, 2007.

SCHERER, C.B; BOTONI, L.S; COURA, F.; SILVA, R.O.; SANTOS, R.D.; HEINEMANN, M.B. Frequency of *Staphylococcus* spp. and profile of antimicrobial resistance in dogs with otitis externa, *Ciência Rural*, v. 48, p. e20177838, 2018.

SCHUBACH, T.M.P.; SCHUBACH, A.; OKAMOTO, T. et al. Canine sporotrichosis in Rio de Janeiro, Brazil: clinical presentation, laboratory diagnosis and therapeutic response in 44 cases (1998- 2003). *Med. Mycol.*, v.44, 2006.

SCHWARZ, S.; NOBLE, W.C. Aspects of bacterial resistance to antimicrobials used in veterinary dermatology practice. *Vet. Dermatol.*, v.10, p.163-176, 1999.

SCOTT, D., MILLER, W. & GRIFFIN, C. 2011. *Small animal dermatology* (6a.ed.). Saunders, Philadelphia.

SEJAS, Lilian M. et al . Avaliação da qualidade dos discos com antimicrobianos para testes de disco-difusão disponíveis comercialmente no Brasil. *J. Bras. Patol. Med. Lab.*, Rio de Janeiro, v. 39, n. 1, p. 27-35, 2003. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/S1676-24442003000100006>. Acesso em: 26 Novembro de 2020.

SILVA, A. C. R.; REZENDE, L. V.; CUNHA, G.N. CONDIÇÕES CLÍNICAS DO CONDUTO AUDITIVO EXTERNO E DA MEMBRANA TIMPÂNICA POR MEIO DE OTOSCOPIA EM CÃES. *Ciência Animal*, v.29, n.3, p.1-10, 2019. Disponível em: <http://www.uece.br/cienciaanimal/dmdocuments/01.%202019%20-%20ARTIGO%20>. Acesso em 16 de outubro de 2020.

SILVA, A. P da et al . Suscetibilidade antimicrobiana de *Staphylococcus* spp. isolados de cães com pioderma superficial. *Pesq. Vet. Bras.*, Rio de Janeiro , v. 34, n. 4, p. 355-361. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/S0100-736X2014000400010>. Acesso em 26 de Novembro de 2020.

SOMAYAJI, R.; PRIYANTHA, M.A.R.; RUBIN, J.E.D. Human infections dueto *Staphylococcus pseudintermedius*, anemerging zoonosis of canine origin: report of 24 cases. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, v.85, p.475– 478, 2016.

STEFANI, L. M.; NEVES, G. B.; BRISOLA, M. C.; CRECENCIO, R. B.; PICK, E. C.; ARAUJO, D. N. Salmonella Heidelberg resistant to ceftiofur and disinfectants routinely used in poultry. Semina: Ciências Agrárias, Londrina, v. 39, n. 3, p. 1029-1036, maio/jun. 2018.

STEGEMANN, M. R.; PASSMORE, C. A.; SHERINGTON, J.; LINDEMAN, C. J.; PAPP, G.; WEIGEL, D. J.; SKOGERBOE, T. L. Antimicrobial activity and spectrum of cefovecin, a new extended-spectrum cephalosporin, against pathogens collected from dogs and cats in Europe and North America. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 2006.

STEIN, C. Avaliação dos Critérios Interpretativos de Oxacilina em Isolados Clínicos de Staphylococcus pseudintermedius. 2020. Dissertação (Mestrado em Epidemiologia Experimental Aplicada às Zoonoses) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, University of São Paulo, São Paulo, 2020. doi:10.11606/D.10.2020.tde-10082020-124509. Acesso em 08 de outubro de 2020.

TAVARES, A.A Perfil de virulência e resistência antimicrobiana de *Salmonella heidelberg* isoladas de carcaças e camas de frangos. Universidade Federal de Uberlândia, 2020. Disponível em: <https://repositorio.ufu.br/handle/123456789/30129>. Acesso em: 12 de novembro 2020.

TAVARES, W. Bactérias gram-positivas problemas: resistência do estafilococo, do enterococo e do pneumococo aos antimicrobianos Rev. Soc. Bras. Med. Trop. vol.33 n.3, Uberaba, 2000. Disponível: <https://doi.org/10.1590/S0037-86822000000300008>. Acesso em 14 de setembro de 2020.

TILLEY, L. P; F. W. K. Consulta veterinária em 5 minutos. Editora Manole, São Paulo 2ª edição; 2003.

TORTORA, G.J.; FUNKE, B. R.; CASE, C. L. Microbiologia. 8. ed. Porto Alegre: Artmed, 2005.

VIVEK, K. et al. (2000). Efficacy of ampicillin plus arbekacin in experimental rabbit endocarditis caused by an Enterococcus faecalis strain with high-level gentamicin resistance. Antimicrob. Agents Chemother., 44.

WATANABE E, TANOMARU JMG, NASCIMENTO AP, MATOBAJUNIOR F,

TANOMARU-FILHO M, ITO IY. Determination of the maximum inhibitory dilution of cetylpyridinium chloride based mouthwashes against *Staphylococcus*. 1995.

WEDLY, A.L.; DAWSON, S., MADDOX, W.T.; COYNE, K.P; PINCHBECK, G.L.; CLEGG, P.; JAMROZY, D; FIEDLER, M; DONOVAN, D; NUTTALL; WILLIAMS, N. Carriage of *Staphylococcus* species in the veterinary visiting dog population in mainland UK: Molecular characterization of resistance and virulence. *Vet microbial*, n.170, p. 81-88, 2014.

WERNICK, M. B.; MÜNTENER, C. R. Cefovecin: a new long-acting cephalosporin. *Journal of Exotic Pet Medicine*, New York, v. 19, n. 4, p. 317-322, 2010.

WINSTANLEY, P. C. T. Expert systems in clinical microbiology. *CLINICAL MICROBIOLOGY REVIEWS*, 2011.

WOODS, G.L., WASHINGTON, J.A. Antibacterial susceptibility tests: dilution and disk diffusion methods. In: MURRAY, P.R., BARON, E.J., PFALLER, M.A. et al. (Ed.) *Manual of clinical microbiology*. Washington: American Society for Microbiology Press, 1995.

YASUMITSU, C. Y.; NICOLIM, T. C.; BARÉA, T. N. C.; STECANELLA, V. G.; ROMANI, I.; MOLINARI, B. L. D. Estudo retrospectivo da etiologia e sensibilidade antibiótica de agentes microbianos associados à otite externa em cães. *revista Uningá*, v.34, s.1, 2019. Disponível em: <http://34.233.57.254/index.php/uningareviews/article/view/3056>