

UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS  
ESCOLA DE VETERINÁRIA E ZOOTECNIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL

**ISOLAMENTO DE *Staphylococcus* spp. MULTIRRESISTENTES DA  
PELE DE CÃES SAUDÁVEIS E COM PIODERMITE**

Greyciele Rodrigues de Almeida  
Orientador: Prof. Dr. Olízio Claudino da Silva

GOIÂNIA  
2011



## Termo de Ciência e de Autorização para Disponibilizar as Teses e Dissertações Eletrônicas (TE-DE) na Biblioteca Digital da UFG

Na qualidade de titular dos direitos de autor, autorizo a Universidade Federal de Goiás–UFG a disponibilizar gratuitamente através da Biblioteca Digital de Teses e Dissertações – BDTD/UFG, sem ressarcimento dos direitos autorais, de acordo com a Lei nº 9610/98, o documento conforme permissões assinaladas abaixo, para fins de leitura, impressão e/ou download, a título de divulgação da produção científica brasileira, a partir desta data.

1. Identificação do material bibliográfico:  Dissertação  Tese

### 2. Identificação da Tese ou Dissertação

Autor: **Greyciele Rodrigues de Almeida** E-mail: **greyci\_almeid@hotmail.com**

Seu e-mail pode ser disponibilizado na página?  Sim  Não

Vínculo Empregatício do autor: \_\_\_\_\_ Agência de fomento: \_\_\_\_\_

País: **Brasil** UF: **Goiás** CNPJ: \_\_\_\_\_ Sigla: \_\_\_\_\_

Título: **ISOLAMENTO DE Staphylococcus spp. MULTIRRESISTENTES DA PELE DE CÃES SAUDÁVEIS E COM PIODERMITE** Palavras-chave: **estafilococos, inflamação cutânea, oxacilina, resistência antimicrobiana**

Título em outra língua: **MULTIRESISTANT Staphylococcus spp. ISOLATION FROM THE SKIN OF HEALTHY DOGS AND WITH PYODERMA**

Palavras-chave em outra língua: **staphylococci, multidrug resistant, oxacillin, pyoderma**

Área de concentração: **Patologia, Clínica e Cirurgia** Data defesa: (dd/mm/aaaa) **01/03/2011**

Programa de Pós-Graduação: **Ciência Animal**

Orientador(a): **Olízio Claudino da Silva** E-mail: **olizio@vet.ufg.br**

Co-orientador(1): **Maria Auxiliadora Andrade** E-mail: **maa@vet.ufg.br**

Co-orientador(2): **Adilson Donizeti Damasceno** E-mail: **addamasceno@vet.ufg.br**

### 3. Informações de acesso ao documento:

Liberação para disponibilização?<sup>1</sup>  total  parcial

Em caso de disponibilização parcial, assinale as permissões:

[  ] Capítulos. Especifique: \_\_\_\_\_

[  ] Outras restrições: \_\_\_\_\_

Havendo concordância com a disponibilização eletrônica, torna-se imprescindível o envio do(s) arquivo(s) em formato digital PDF ou DOC da tese ou dissertação.

O Sistema da Biblioteca Digital de Teses e Dissertações garante aos autores, que os arquivos contendo eletronicamente as teses e ou dissertações, antes de sua disponibilização, receberão procedimentos de segurança, criptografia (para não permitir cópia e extração de conteúdo, permitindo apenas impressão fraca) usando o padrão do Acrobat.

Goiânia 12 de julho de 2011

Assinatura do(a) autor(a)

<sup>1</sup> Em caso de restrição, esta poderá ser mantida por até um ano a partir da data de defesa. A extensão deste prazo suscita justificativa junto à coordenação do curso. Todo resumo e metadados ficarão sempre disponibilizados.

GREYCIELE RODRIGUES DE ALMEIDA

**ISOLAMENTO DE *Staphylococcus* spp. MULTIRRESISTENTES DA  
PELE DE CÃES SAUDÁVEIS E COM PIODERMITE**

Dissertação apresentada para obtenção  
do grau de Mestre em Ciência Animal  
junto à Escola de Veterinária e Zootecnia  
da Universidade Federal de Goiás

**Área de Concentração:**

Patologia, Clínica e Cirurgia

**Linha de Pesquisa:**

Alterações Clínicas Metabólicas e Toxêmicas  
dos Animais e Meios Auxiliares de Diagnóstico

**Orientador:**

Prof. Dr. Olízio Claudino da Silva - UFG

**Comitê de Orientação:**

Prof. Dr.<sup>a</sup> Maria Auxiliadora Andrade - UFG

Prof. Dr. Adilson Donizeti Damasceno - UFG

GOIÂNIA  
2011

**Dados Internacionais de Catalogação na Publicação na (CIP)  
GPT/BC/UFG**

A447i Almeida, Greyciele Rodrigues de.  
Isolamento de Staphylococcus Spp. multirresistentes da pele de cães saudáveis e com piodermite [manuscrito] / Greyciele Rodrigues de Almeida. - 2011.  
xv, 58 f. : figs., tabs.

Orientador: Prof. Dr. Olízio Claudino da Silva; Co-orientadora: Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Maria Auxiliadora Andrade.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Goiás, Escola de Veterinária e Zootecnia, 2011.

Bibliografia.

Inclui lista de figuras e tabelas.

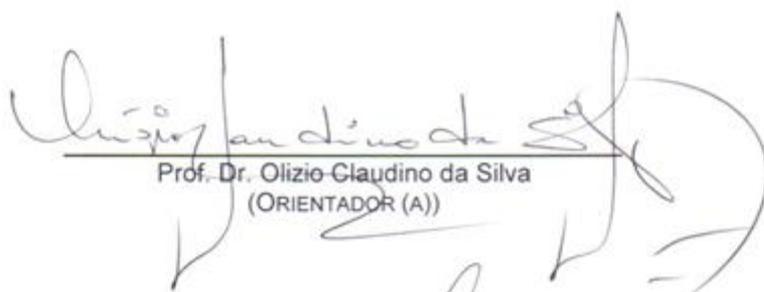
Anexos.

1. Estafilococos 2. Resistência antimicrobiana 3. Oxacilina 4. Inflamação cutânea I. Título.

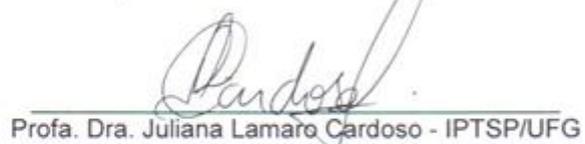
CDU: 574.62

**GREYCIELE RODRIGUES DE ALMEIDA**

Dissertação defendida e aprovada em **01/03/2011**, pela Banca Examinadora constituída pelos professores:



Prof. Dr. Olizio-Glaudino da Silva  
(ORIENTADOR (A))



Profa. Dra. Juliana Lamaro Cardoso - IPTSP/UFG



Profa. Dra. Rosângela de Oliveira Alves Carvalho

*Você ganha forças, coragem e confiança a cada experiência em que você enfrenta o medo. Você tem que fazer exatamente aquilo que acha que não consegue. Você precisa fazer aquilo que não é capaz de fazer.*

– Eleanor Roosevelt

## AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Deus, por ter me proporcionado sabedoria para ingressar no curso de Pós-graduação em Ciência Animal da Escola de Veterinária e Zootecnia (EVZ) da Universidade Federal de Goiás (UFG) e concluí-lo com a realização deste trabalho;

Ao meu orientador Prof. Dr. Olízio Claudino da Silva, por ter aceitado orientar-me, pela paciência e dedicação e por ter me acompanhado nessa trajetória;

À minha querida co-orientadora Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Maria Auxiliadora Andrade, por ceder não apenas o laboratório como também todo material necessário aos isolamentos e ter me acompanhado na parte experimental. Aprendi muito ao seu lado que nunca poupou esforços ou paciência para transmitir-me seus ensinamentos;

Ao Prof. Dr. André Kipnis, do Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública da UFG, por ter cedido as cepas de *Staphylococcus* spp. controle-positivo e a oxacilina e por sempre sanar as inúmeras dúvidas que foram surgindo ao longo deste trabalho;

Ao Prof. Dr. Guido F. C. Linhares, por ceder o laboratório e grande parte do material necessário à realização da técnica da PCR, também por dispender tempo e paciência em meu auxílio, não poupando esforços para me ensinar;

À funcionária do departamento de Medicina Veterinária Preventiva da EVZ-UFG, Maria A. Leão (Dorinha), pela ajuda e convivência agradável;

A todos os colegas e amigos do curso de pós-graduação, Juliana Bonifácio, Januária, Rafael Gustavo, Marcelo Sales, Hérika Xavier, Ana Caroline, Karine Louise, obrigada por estarmos juntos nessa jornada que se chama mestrado, por toda a ajuda e paciência, por compartilharmos muitos bons momentos e outros tantos de desespero e dúvidas, por ouvirem minhas reclamações frequentes, pela amizade;

Ao programa de Pós-graduação em Ciência Animal da EVZ/UFG, e aos professores que o compõe pela disponibilização do conhecimento;

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Capes, pela concessão da bolsa de estudos;

A todos que direta ou indiretamente também contribuíram para a concretização deste trabalho, todo o meu respeito e agradecimento;

Aos meus pais, Geraldo Alves Rodrigues, e especialmente agradeço a minha mãe, Marlene Carmo de Almeida. Obrigada pela vida e por terem me proporcionado todos os meios para meu crescimento pessoal e intelectual.

À Vida. Pelos bons momentos que nos alegram e pelos maus momentos que nos transformam.

## RESUMO

Muitas terapias antimicrobianas são usadas para o tratamento das piодermite, inflamação cutânea piогênica associada à infecção bacteriana, sendo o *Staphylococcus pseudintermedius* a principal espécie envolvida. As infecções estafilocócicas se tornam mais graves quando a cepa envolvida na doença é multirresistente, acarretando dificuldade adicional para o controle de infecções causadas por esse agente. O presente estudo pesquisou a presença de *Staphylococcus* spp. multirresistentes e verificou o perfil de suscetibilidade a antimicrobianos de isolados de cães sadios e com piодermite. As amostras foram colhidas com suabes estéreis da pele de 50 cães sadios e de 40 cães apresentando quadro clínico de piодermite (não importando a etiologia). Foram realizados cultura bacteriológica do material colhido e isolamento das cepas de *Staphylococcus* spp. para identificação das espécies de acordo com suas características fenotípicas. Posteriormente, os isolados foram testados quanto ao perfil de suscetibilidade aos antimicrobianos por meio de antibiograma. Realizou-se ainda, teste fenotípico de resistência à oxacilina e técnica de reação em cadeia da polimerase (PCR) para detecção de cepas de *Staphylococcus* spp. multirresistentes, portadoras do gene *mecA*. A resistência à oxacilina (prova fenotípica e identificação do gene *mecA*) foi apresentada por 23,6% (17/72) dos isolados e a multirresistência por 29,7% (21/72). As maiores suscetibilidades foram verificadas para os seguintes antimicrobianos: Cefalexina (84,7%); Amoxicilina (75%); Oxacilina (72,2%); Cefoxitina (79,2%). As maiores resistências: Tetraciclina (40,3%); Eritromicina (34,7%); Clindamicina (33,3%); Ciprofloxacina (26,4%); Oxacilina (23,6%); Sulfametazol-trimetoprim (22,2%). Apesar do isolamento de cepas multirresistentes, os resultados indicaram um alto nível de suscetibilidade das mesmas aos antimicrobianos normalmente utilizados no tratamento de infecções estafilocócicas. O isolamento de *Staphylococcus* spp. resistentes à meticilina (MRS), em espécimes clínicos e sadios, demonstrou que os cães podem atuar como reservatórios e posteriormente disseminarem esses patógenos na comunidade.

**Palavras-chave:** estafilococos, inflamação cutânea, oxacilina, resistência antimicrobiana

## SUMÁRIO

|                  |    |
|------------------|----|
| CAPÍTULO 1 ..... | 1  |
| CAPÍTULO 2 ..... | 9  |
| CAPÍTULO 3 ..... | 28 |
| CAPÍTULO 4 ..... | 48 |

## CAPÍTULO 1

### CONSIDERAÇÕES GERAIS

Os estafilococos são bactérias gram-positivas, anaeróbias facultativas e esféricas do gênero *Staphylococcus* que normalmente compõem a microbiota da pele íntegra e das mucosas de mamíferos e aves (GRIFFETH et al., 2008). De cerca de 41 espécies e 24 subespécies, dez são de importância veterinária e podem causar doenças em animais: *S. aureus*, *S. intermedius*, *S. pseudintermedius*, *S. epidermidis*, *S. hyicus* spp. *hyiicus*, *S. schleiferi* spp. *coagulans*, *S. sciuri*, *S. lentus*, *S. caprae* e *S. gallinarum* (LEME, 2001; BIBERSTEIN & HIRSH, 2003; GRIFFETH et al., 2008; EUZÉBY, 2009).

O gênero *Staphylococcus* pertence à família *Micrococaceae*, que agrupa os cocos Gram-positivos catalase-positivos que atacam carboidratos por oxidação e fermentação. Microscopicamente, os estafilococos são células esféricas, com 0,5 a 1,5 µm de diâmetro, ocorrendo isolados, em pares, tétrades, cadeias curtas ou como agrupamentos irregulares característicos em forma de cachos de uvas. São imóveis, não-esporulados, anaeróbios facultativos, as colônias geralmente são opacas, com coloração variável do branco ao creme e algumas vezes do amarelo ao laranja (LEME, 2001; BIBERSTEIN & HIRSH, 2003).

Os estafilococos resistem à dessecação por semanas, a aquecimento de até 60°C por 30 minutos, a concentrações de pH entre 4,0 e 9,5 e a concentrações salinas de 7,5% utilizadas nos meios seletivos para isolá-los (BIBERSTEIN & HIRSH, 2003). Alguns estafilococos, por possuírem enzimas que lhes conferem a capacidade de coagular plasma, são divididos em coagulase-positivos e coagulase-negativos, sendo essa característica de suma importância na identificação das espécies de estafilococos patogênicos em humanos e animais pelos laboratórios.

Para a diferenciação de espécies e subespécies do gênero *Staphylococcus*, as principais características utilizadas são: diâmetro da colônia em mm (> 5mm), pigmento carotenóide da colônia, crescimento aeróbico, crescimento anaeróbico em tioglicolato, crescimento em ágar contendo 10 e 15%

de cloreto de sódio (NaCl), crescimento a 15 e 45°C, teste de oxidase (detecção do citocromo C), produção de ácido láctico a partir de L(+)-isômeros e D(-) – isômeros, produção de acetoína, teste da aldolase, produção de ácidos a partir de diversos substratos, presença de enzima hialuronidase, redução de nitrato, teste da fosfatase alcalina, coagulase (sangue de coelho), hemólise, produção de DNase, resistência à novobiocina (concentração inibitória mínima  $\geq 1,6 \mu\text{g/mL}$ ) e testes de catalase, dentre outros (BIBERSTEIN & HIRSH, 2003).

Os estafilococos são encontrados normalmente como comensais da pele e membranas mucosas do homem e outros mamíferos, embora as espécies produtoras de coagulase (*S. aureus*, *S. hyicus*, *S. intermedius* e *S. schleiferi subsp. coagulans*) sejam potencialmente patogênicas para uma grande variedade de animais, assim como para os seres humanos (WERCKENTHIN et al., 2001; WEESE et al., 2006).

A espécie *S. intermedius* é encontrada na pele de cães saudáveis, enquanto que no ser humano a mais frequente é a *S. aureus*, podendo ocorrer ainda, a transmissão de *S. aureus* entre humanos e cães (COX et al., 1988; LEE et al., 2003; LOEFFLER et al., 2005; WEESE et al., 2006). O *S. intermedius* é o principal agente piogênico de cães e também ocorre em infecções respiratórias, genitais, hemolinfáticas, ósseas, articulares, auriculares, palpebrais, conjuntivais e em feridas (BIBERSTEIN & HIRSH, 2003).

As infecções piogênicas mistas acometem todos os mamíferos e todos os sistemas orgânicos e a piodermite que pode ser definida como uma condição infecciosa, produtora de pus (ou piogênica), de origem bacteriana que acomete o tegumento em qualquer nível de profundidade, tem como a principal espécie envolvida o *S. intermedius*, embora *S. aureus* e *S. schleiferi* possam ser a origem em casos de infecções recorrentes (BIBERSTEIN & HIRSH, 2003; GUARDABASSI et al., 2010).

Quando a cepa envolvida na doença é multirresistente (resistência a três ou mais classes diferentes de antimicrobianos), as infecções estafilocócicas se tornam mais graves. Atualmente, mesmo com um maior controle dessas infecções e com o uso de antibióticos e associações terapêuticas em várias formas de administração, infecções estafilocócicas continuam sendo causa comum de bacteremia adquirida na comunidade ou em ambientes hospitalares, tanto por animais quanto por humanos (LEME, 2001).

A expressão meticilino-resistente é empregada para designar as cepas de estafilococos que não respondem ao tratamento com meticilina e, por extensão, as isoxazolilpenicilinas (oxacilina) e as cefalosporinas devido à resistência cruzada aos antibióticos  $\beta$ -lactâmicos. A meticilina (2,6-dimetoxifenilpenicilina) foi a primeira penicilina introduzida na medicina, resistente à ação inativadora de betalactamases produzidas por estafilococos (PENTEADO FILHO et al., 2007). A proteína que se liga à penicilina (*penicillin-binding protein - PBP2a* ou *PBP2'*) codificada pelo gene *mecA* é a responsável pela resistência à meticilina (NIEMEYER et al., 1996; CHAMBERS, 1997; GORTEL et al., 1999; WAYNE, 2003).

A resistência aos antimicrobianos é um fenômeno genético, relacionado à existência de genes no microrganismo que codificam diferentes mecanismos bioquímicos que impedem a ação das drogas. Uma das origens da resistência é a importação dos genes causadores do fenômeno, consistindo na resistência transferível ou horizontal (CUNHA, 1998; TAVARES, 2000; ALTERTHUM, 2005). A transferência horizontal do gene *mecA* em *Staphylococcus* spp. tem contribuído para a circulação mundial de clones meticilina-resistentes e multidroga-resistentes (AARESTRUP et al., 2001) e tem sido apontada como mecanismo comum de resistência a fármacos (TRAMPER-STRANDERS et al., 2007).

*Staphylococcus* spp. resistentes à meticilina isolados de animais domésticos têm sido documentados desde a década de 70 (DEVRIESE et al., 1972) e, mais recentemente, essas cepas têm sido reportadas em isolados cultivados a partir de infecções de tecidos moles de animais domésticos acometidos (DUQUETTE & NUTTALL, 2004; WEESE, 2005). MORRIS e colaboradores (2006) conseguiram isolar em cães, cepas de *S. aureus*, *S. intermedius* e *S. schleiferi* resistentes à meticilina. Na Eslovênia, em um estudo realizado com cães e equinos saudáveis, foram isolados estafilococos coagulase-negativos resistentes à meticilina (MRCoNS) e *S. intermedius* resistentes à meticilina (MRSI) (VENGUST et al., 2006). Na Dinamarca, foram isoladas cepas de MRCoNS de cães e equinos (BAGCIGIL et al., 2007).

No Brasil, MALUTA e colaboradores (2008) conseguiram isolar duas cepas de estafilococos MRCoNS de cães (4%) e 18 cepas de MRCoNS de seres humanos (36%) em um hospital veterinário de ensino, porém não isolaram cepas

de *S. aureus* e *S. intermedius* resistentes à metilina (MRSA e MRSI, respectivamente). Outro estudo detectou resistência em 48,6% dos isolados de *Staphylococcus* spp. de diferentes sítios infecciosos de animais de companhia (PEREIRA et al., 2009). TUNON e colaboradores (2008) isolaram cepas de *Staphylococcus* spp. em otites caninas e encontraram 83% de cepas resistentes a pelo menos um dos antibióticos utilizados.

A resistência fenotípica é variável e depende da expressão do gene *mecA*. Embora a resistência mediada pelo gene *mecA* esteja presente em todas as células da subpopulação de estafilococos (da ordem de uma subpopulação em 100.000 UFC com CIM entre 4 e 8 mg/mL), esta pode ser expressa somente por uma pequena porcentagem delas, levando à heterorresistência fenotípica, isto é, duas subpopulações (uma sensível e outra resistente) que podem coexistir dentro de uma mesma cultura de estafilococos (LINCOPAN & MAMIZUKA, 2007). Os estafilococos que expressam heterorresistência crescem mais lentamente que a população sensível à oxacilina e assim, os testes de sensibilidade convencionais, como o método de difusão em disco, nem sempre são sensíveis o suficiente para detectar essas populações heterorresistentes. O grande problema desse fenômeno de resistência reside na evolução de uma terapêutica desfavorável com o surgimento de resistência logo após a exposição ao antibiótico. Atualmente, o teste de triagem para essas cepas é feito por meio da verificação da sensibilidade à oxacilina e à determinação da presença do gene *mecA* por técnicas moleculares utilizando a reação em cadeia da polimerase (PCR) (PENTEADO FILHO et al., 2007).

O aumento da prevalência de *Staphylococcus* spp. resistentes à metilina (MRS) e multidroga-resistentes tem se tornado uma dificuldade adicional para o controle de infecções causadas por esse agente. As quinolonas e cefalosporinas são amplamente utilizadas tanto em medicina quanto em medicina veterinária, entretanto, cepas de MRS são muitas vezes resistentes a estes e a outros antimicrobianos dificultando o tratamento das infecções causadas por esses microrganismos. A vancomicina é muitas vezes a última opção para combater essas infecções (MALUTA et al., 2008).

Devido à transmissão de estafilococos resistentes à metilina entre os animais e o homem (WEESE et al., 2006), o papel dos animais de companhia como reservatório de resistência antimicrobiana deve ser pesquisado em

profundidade. Essa transmissão é estimulada pelo contato físico e pelo fato de que drogas antimicrobianas utilizadas na clínica de pequenos animais são praticamente as mesmas utilizadas em medicina. A disseminação de bactérias multidroga-resistentes aponta para a necessidade da avaliação da atividade antimicrobiana para selecionar o fármaco mais indicado e, assim, minimizar falhas terapêuticas na conduta clínica veterinária.

O risco tanto à saúde humana quanto à do animal, associado à possibilidade do surgimento de bactérias resistentes em animais de companhia, tem sido até agora considerado insignificante. No entanto, há cada vez mais provas de que está surgindo resistência relevante do ponto de vista clínico em bactérias isoladas de pequenos animais, sobretudo cães (GUARDABASSI et al., 2004). As principais razões para preocupação são, em ordem de importância, *S. aureus* resistente a meticilina (MRSA) e *S. intermedius* resistente a meticilina (MRSI) (GUARDABASSI et al., 2010).

A presença de estudos relacionados à prevalência de MRS em animais de companhia no Brasil ainda é pequeno, o que torna relevante o presente trabalho com o objetivo de isolar estafilococos resistentes à meticilina e/ou multirresistentes da pele de cães saudáveis e com piodermite, bem como verificar seus respectivos perfis de suscetibilidade a diversos antimicrobianos.

## REFERÊNCIAS

1. AARESTRUP, F. M.; SEYFARTH, A. M.; EMBORG, H.; PEDERSEN, K.; HENDRIKSEN, R. S.; BAGER, F. Effect of abolishment of the use of antimicrobial agents for growth promotion on occurrence of antimicrobial resistance in fecal enterococci from food animals in Denmark. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy - American Society for Microbiology**, Maryland, v.45, n.7, p. 2054-2059, 2001.
2. ALTERTHUM, F. Mecanismo de ação dos antibacterianos e mecanismos de resistência. In: TRABULSI, L. R.; ALBERTHUM, F. **Microbiologia**. 4.ed. São Paulo: Atheneu, 2005. cap.11. 79-84p.
3. BAGCIGIL, F. A.; MOODLEY, A.; BAPTISTE, K. E.; JENSEN, V. F.; GUARDABASSI, L. Occurrence, species distribution, antimicrobial resistance and clonality methicillin- and erythromycin-resistant staphylococci in the nasal cavity of domestic animals. **Veterinary Microbiology**, Amsterdam, v.121, n.3-4, p.307-315, 2007.

4. BIBERSTEIN, E. L.; HIRSH, D. C. In: HIRSH, D. C.; ZEE, Y. C. **Microbiologia Veterinária**. 2.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2003. cap.21. 108-112p.
5. CHAMBERS, H. F. Methicillin resistance in staphylococci: molecular and biochemical basis and clinical implications. **Clinical Microbiology**, Washington, v.10, n.4, p.781-791, 1997.
6. COX H. U.; HOSKINS J. D.; NEWMAN S. S. Temporal study of staphylococcal species on healthy dogs. **American Journal of Veterinary Research**, Chicago, v.49, n.6, p.747, 1988.
7. CUNHA, B. A. Antibiotic resistance. **Drugs of Today**. Barcelona, v.34, n.8, p.691-698, 1998.
8. DEVRIESE, L. A.; VANDAMME, L. R.; FAMEREE, L. Methicillin (cloxacillin)-resistant *Staphylococcus aureus* strains isolated from bovine mastitis cases. **Zentralblatt Fur Veterinarmedizin Riehe B**, Berlim, v.19, n.7, p.598-605, 1972.
9. DUQUETTE, R. A.; NUTTALL, T. J. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in dogs and cats: an emerging problem? **Journal of Small Animal Practice**, Oxford, v.45, n.12, p.591–597, 2004.
10. EUZÉBY, J. P. List of bacterial names with standing in nomenclature. Disponível em: <http://www.bacterio.cict.fr/s/staphylococcus.html> . Acesso em: 06 dez. 2010.
11. GORTEL, K.; CAMPBELL, K.L.; KAKOMA, I.; WHITTEM, T.; SCHAEFFER, D.J.; WEISIGER, R.M. Methicillin resistance among staphylococci isolated from dogs. **American Journal of Veterinary Research**, Chicago, v.60, n.12, p.1526-1530, 1999.
12. GRIFFETH, G. C.; MORRIS, D. O.; ABRAHAM, J. L.; SHOFER, F. S.; RANKIN, S. C. Screening for skin carriage of methicillin-resistant coagulase-positive staphylococci and *Staphylococcus schleiferi* in dogs healthy and inflamed skin. **Veterinary Dermatology**, Oxford, v.19, n.3, p.142-149, 2008.
13. GUARDABASSI, L.; SCHWARZ, S.; LLOYD, D. H. Pet animals as reservoirs of antimicrobial-resistant bacteria. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, Oxford. v.54, n.2, p.321-322, 2004.
14. GUARDABASSI, L.; HOUSER, G. A.; FRANK, L. A.; PAPICH, M. G. Orientações para o uso de antimicrobianos em cães e gatos. In: GUARDABASSI, L.; JENSEN, L. B.; KRUSE, H. **Guia de antimicrobianos em veterinária**. 1.ed. Porto Alegre: Artmed, 2010. cap.11. 224-246p.
15. LEE P. K.; ZIPOLI M.T.; WEINBERG A. N. Pyodermas: *Staphylococcus aureus*, streptococcus, and other gram-positive bacteria. In: FREEDBERG I. M., EISEN A. Z., WOLFF K. **Fitzpatrick's Dermatology in General Medicine**. 6 ed. New York: McGraw Hill Professional, 2003. 1856p.

16. LEME, I. L. Estafilococcias. In: FERREIRA, A. W.; ÁVILA, S. L. **Diagnóstico Laboratorial das Principais Doenças Infecciosas e Auto-Imunes**. 2.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2001. cap 12. 147-159p.
17. LINCOPAN, N.; MAMIZUKA, E. M. Resistência Bacteriana a Antimicrobianos. In: NETO, V. A.; NICODEMO, A. C.; LOPES, H. V. In: **Antibióticos na Prática Médica**. 6.ed. São Paulo: Sarvier, 2007. cap 4. 45-46p.
18. LOEFFLER A.; BOAG A. K.; SUNG J.; LINDSAY, J. A.; GUARDABASSI, L.; DALSGAARD, A.; SMITH, H.; STEVENS, K. B.; LLOYD, D. H. Prevalence of methicillinresistant *Staphylococcus aureus* among staff and pets in a small animal referral hospital in the UK. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, Londres, v. 56, N.4, p.692–697, 2005.
19. MALUTA, R. P.; STELLA, A. E.; OLIVEIRA, A. C.; RIGOBELLO, E. C.; LEMOS, M. V. F.; AVILA, F. A.. isolamento de estafilococos resistentes a meticilina e perfil de suscetibilidade a antimicrobianos de cepas isoladas em um hospital veterinário de ensino no Brasil. In: Congresso Brasileiro de Iniciação Científica, 2008, Gramado. **Anais eletrônicos...**[online]. Disponível em: [www.sovergs.com.br/conbravet2008/anais/cd/resumos/R0200-3.pdf](http://www.sovergs.com.br/conbravet2008/anais/cd/resumos/R0200-3.pdf). Acesso em: 17 mai. 2009.
20. MORRIS, D. O.; ROOK, K. A.; SHOFER F. S. Screening of *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus intermedius*, and *Staphylococcal schleiferi* isolates obtained from small companion animals for antimicrobial resistance: a retrospective review of 749 isolates (2003–2004). **Veterinary Dermatology**, Oxford, v.17, n.5, p.332–337, 2006.
21. NIEMEYER D. M.; PUCCI, M.J.; THANASSI, J.A.; SHARMA, V.K.; ARCHER, V.L. Role of *mecA* transcriptional regulation in the phenotypic expression of methicillin resistance in *Staphylococcus aureus*. **Journal of Bacteriology**, Washington, v.178, n.18, p.5464-5471, 1996.
22. PENTEADO FILHO, S. R.; LOPES, H. V.; LEVI, G. C.. Antibióticos clássicos: principais características e uso terapêutico. In: NETO, V. A.; NICODEMO, A. C.; LOPES, H. V.. **Antibióticos na Prática Médica**. 6.ed. São Paulo: Sarvier, 2007. cap 4. 94-96p.
23. PEREIRA, I. A.; SOARES, L. C.; COELHO, S. M. O.; PRIBUL, B. R.; SOUZA, M. M. S. Suscetibilidade à Azitromicina de Isolados Bacterianos de Processos Infecciosos em Cães e Gatos. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, Rio de Janeiro, v.29, n.2, p.153-156, 2009.
24. TAVARES, W. Bactérias gram-positivas problemas: resistência do estafilococo, do enterococo e do pneumococo aos antimicrobianos. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Uberaba, v.33, n.3, p.281-301, 2000.
25. TRAMPER-STRANDERS, G. A.; VAN DER ENT, G. K.; GERRITSEN, S. A. M.; FLEER, A.; KIMPEN, J. L. L.; WOLFS, T. F. W. Macrolide-Resistent *Staphylococcus aureus* Colonization in Cystic Fibrosis Patients: Is There Transmission to Household Contacts? **Journal of Antimicrobial and**

**Chemotherapy - American Society for Microbiology**, Maryland, v.60, n.3, p.665-668, 2007.

26. TUNON, G. I. L.; SILVA, E. P.; FAIERSTEIN, C. C.. Isolamento de Estafilococos Multirresistentes de Otites em Cães e sua Importância para a Saúde Pública. **Boletim Epidemiológico Paulista**, São Paulo, v.58, n.5, 2008.
27. VENGUST, M.; ANDERSON, M. E.; ROUSSEAU, J.; WEESE, J. S. Methicillin-Resistant staphylococcal colonization in clinically normal dogs and horses in the community. **Letters in Applied Microbiology**, Oxford, v.43, n.6, p.602-606, 2006.
28. WAYNE, P. A. Performance standards for antimicrobial disk susceptibility tests; Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically. **National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS)**. Approved Standard, M2-A8. 2003.
29. WEESE, J. S. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: an emerging pathogen in small animals. **Journal of the American Animal Hospital Association**, Lakewood, v. 41, n.3, p.150-157, 2005.
30. WEESE, J. S.; DICK, H.; WILLEY, B. M. Suspected transmission of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* between domestic pets and humans in veterinary clinics and in the household. **Veterinary Microbiology**, Amsterdam, v.115, n.1-3, p.148-155, 2006.
31. WERCKENTHIN, C.; CARDOSO, M.; MARTEL, J. L.; SCHWARZ, S. Antimicrobial resistance in staphylococci from animals with particular reference to bovine *Staphylococcus aureus*, porcine *Staphylococcus hyicus*, and canine *Staphylococcus intermedius*. **Veterinary Research**, Les Ulis, v.32, n.3-4, p.341-362, 2001.

## CAPÍTULO 2

### PERFIL DE ISOLAMENTO E SUSCETIBILIDADE A ANTIMICROBIANOS DE *Staphylococcus* spp. DA PELE DE CÃES SAUDÁVEIS E COM PIODERMITE

GREYCIELE RODRIGUES DE ALMEIDA<sup>1</sup>, MARIA AUXILIADORA ANDRADE<sup>2</sup>,  
OLÍZIO CLAUDINO DA SILVA<sup>3</sup>

Laboratório de Microbiologia, Escola de Veterinária e Zootecnia da UFG, Campus II Cx postal 131 CEP: 74001-970.

Goiânia – GO, Brasil. (062) 3521-1520

e-mail: [greyci\\_almeid@hotmail.com](mailto:greyci_almeid@hotmail.com)

1. Mestranda em Ciência Animal – Patologia, Clínica e Cirurgia, UFG
2. Professora Associada da Escola de Veterinária e Zootecnia da UFG
3. Professor Adjunto da Escola de Veterinária e Zootecnia da UFG

## RESUMO

No presente estudo, foram colhidas 40 amostras de suabes estéreis da pele de cães com piodermite e 50 amostras da pele de cães saudáveis para pesquisar a presença de *Staphylococcus* spp. multirresistentes, identificar e verificar o perfil de suscetibilidade a antimicrobianos dos isolados. Ao todo, obteve-se 72 isolados de *Staphylococcus* spp. de cães, sendo 36 a partir de amostras da pele com quadro clínico de piodermite e 36 isolados da pele sadia. No grupo de sadios foram isolados: *S. pseudintermedius* (50%); *S. epidermidis* (38,9%); Outros estafilococos coagulase-negativo (OSCoN) (8,3%) e *S. schleiferi sub. coagulans* (2,8%). No grupo de cães com piodermite foram isolados: *S. pseudintermedius* (58,3%); *S. epidermidis* (25%); *S. aureus* (11,1%) e OSCoN (5,6%). Em ambos os grupos, a espécie isolada com maior frequência foi *S. pseudintermedius* (54,2%). As medidas dos halos de inibição observadas nos antibiogramas revelaram que os antibacterianos que mostraram maior inibição do crescimento bacteriano (70% ou mais), foram: Cefalexina (84,7%); Cefoxetina (79,2%); Enrofloxacina (79,2%); Amoxicilina (75%); Oxacilina (72,2%) e Gentamicina (70,8%). O maior e menor nível de resistência encontrado foi de 40,3% e 9,7% para a tetraciclina e cefalexina, respectivamente. A multirresistência (resistência a três ou mais classes de antibióticos) foi verificada em 29,7% dos isolados. Apesar do isolamento de cepas multirresistentes, os resultados indicaram um alto nível de suscetibilidade das mesmas aos antimicrobianos normalmente utilizados no tratamento de infecções estafilocócicas.

**Palavras-chave:** estafilococos, pioderma, suscetibilidade antimicrobiana

## ABSTRACT

In this study, 40 samples of dog skin with pyoderma and 50 skin samples from healthy dogs were collected by sterile swabs to look for the presence of *Staphylococcus* spp. multiresistant, identify and verify the antimicrobial susceptibility profile of isolates. Altogether, 72 isolates of *Staphylococcus* spp. were obtained from dogs, being 36 from samples of skin with clinical isolates of pyoderma and 36 from healthy skin. *S. pseudintermedius* (50%), *S. epidermidis* (38.9%), other coagulase negative (OCoN) (8.3%) and *S. schleiferi* sub. *coagulans* (2.8%) were isolated in the healthy group. In the group of dogs with pyoderma *S. pseudintermedius* (58.3%), *S. epidermidis* (25%), *S. aureus* (11.1%) and OCoNS (5.6%) were isolated. In both groups *S. pseudintermedius* (54.2%) was the most frequently isolated species. Measurements of the inhibition halos revealed that the antibacterial that showed higher growth inhibition (70% or more) were cephalexin (84.7%), ceftiofur (79.2%), enrofloxacin (79.2%), amoxicillin (75%), oxacillin (72.2%) and gentamicin (70.8%). The highest and lowest resistance levels found were 40.3% and 9.7% to tetracycline and cephalexin, respectively. The multidrug resistance (resistance to three or more classes of antibiotics) was observed in 29.7% of the isolates. Despite the isolation of multidrug-resistant strains, our results indicated a high degree of susceptibility to the antimicrobial agents commonly used to treat staphylococcal infections.

**Keywords:** staphylococci, pyoderma, antimicrobial susceptibility

## 1. INTRODUÇÃO

A piodermite canina é a principal razão para o uso de antimicrobianos pelos clínicos que tratam pequenos animais. De acordo com a profundidade das lesões patológicas as piodermites podem ser definidas como superficiais ou profundas, e no geral, em ambas, a espécie *Staphylococcus intermedius* está associada, embora *S. aureus* e *S. schleiferi* possam ser a origem em casos de infecções recorrentes (PIANTA et al., 2006; GUARDABASSI et al., 2010).

A patogenia da piodermite apresenta três pontos importantes: (a) a superfície da pele dos cães é colonizada por bactérias comensais que estão adaptadas ao microambiente tanto da camada córnea superficial como do folículo piloso, sendo o *S. intermedius* a espécie bacteriana mais frequentemente encontrada; (b) o cão apresenta uma camada córnea mais delgada e compacta em comparação à camada córnea de outras espécies, o infundíbulo do folículo piloso canino é aberto e não apresenta tampão sebáceo e (c) uma pele inflamada com escoriação ou seborréia (alergias, endocrinopatias) é colonizada por estafilococos coagulase-positivos mais rapidamente do que a pele sadia (PIANTA et al., 2006).

O *S. intermedius* é um comensal normal do cão, e a infecção é secundária a causas subjacentes de naturezas diferentes, sobretudo defeitos de cornificação, alergias (atopia, dermatites imunológicas, etc.), ectoparasitismo e endocrinopatias (HAJEK, 1976; HOEKSTRA & PAULTON, 2002; GANIÈRE et al., 2005; JONES et al., 2007; HAUSCHILD & WÓJCIK, 2007; SASAKI et al., 2007a; GUARDABASSI et al., 2010). Porém, relatórios recentes indicaram que as cepas identificadas fenotipicamente como *S. intermedius* podem incluir não só o *S. intermedius* propriamente dito, como também duas novas espécies de estafilococos coagulase-positivo, *S. pseudintermedius* e *S. delphini*. De fato, a maioria deles foram identificados como linhagens de *S. pseudintermedius* e não *S. intermedius*, mostrando que aquele é a causa comum de piodermite canina e não este (BANNOEHR et al., 2007; SASAKI et al., 2007b). Assim, o patógeno canino pode ser reclassificado como *S. pseudintermedius* (GUARDABASSI et al., 2010).

Devido à complexa etiologia, a terapia da piodermite é um desafio, e a prevenção de infecções recorrentes exige a identificação e a eliminação das

principais causas subjacentes. A piodermite pode ser controlada com terapia antimicrobiana e muitos antimicrobianos, como as cefalosporinas de primeira geração (cefalexina e cefadroxil), amoxicilina associada a ácido clavulânico e fluorquinolonas (enrofloxacina, marbofloxacina, difloxacina e orbifloxacina), possuem atividade eficiente contra *S. intermedius* e excelente distribuição na pele. Esses agentes antimicrobianos são muito eficazes no tratamento de piodermite canina e com frequência são utilizados para tratamento empírico. No entanto, tendo em vista o crescente risco de resistência, esses agentes só devem ser utilizados quando a resistência a outros agentes é provável. Uma vez que infecções primárias são raramente associadas com estafilococos multirresistentes, outros agentes antimicrobianos podem ser escolhidos de modo empírico nesses casos (GANIÈRE et al., 2005; INTORRE et al., 2007; JONES et al., 2007; LYSKOVA et al., 2007; PEDERSEN et al., 2007; GUARDABASSI et al., 2010).

Alguns estudos demonstraram que os estafilococos multirresistentes (resistentes a três ou mais classes de antimicrobianos) estão cada vez mais presentes nas piodermites caninas. Essa multirresistência aos antimicrobianos tem causado falhas terapêuticas na clínica médica de pequenos animais e, potencialmente, problemas zoonóticos devido ao contato físico entre o homem e animais de companhia (cães e gatos). No entanto, existem poucas publicações recentes sobre suscetibilidade antimicrobiana de *Staphylococcus* sp. isolados de cães no Brasil (KANIA et al., 2004; SASAKI et al., 2005; JONES et al., 2007; SASAKI et al., 2007b; HANSELMAN et al., 2008; WEESE & VAN DUIJKEREN, 2010).

O objetivo deste estudo foi verificar a frequência de isolamento e o perfil de suscetibilidade a diversos antimicrobianos de *Staphylococcus* spp. provenientes da pele de cães saudáveis e com piodermite.

## **2. MATERIAL E MÉTODOS**

### **2.1 Local, período e colheita das amostras**

A etapa de colheita de material foi realizada no Hospital Veterinário da Escola de Veterinária e Zootecnia (EVZ) da Universidade Federal de Goiás (UFG)

no período de setembro a novembro de 2010, empregando-se animais atendidos na rotina hospitalar e após aprovação do Projeto de Pesquisa pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal de Goiás (protocolo Nº: 103/10) (Anexo 1).

Ao total, foram realizadas 90 colheitas de suabes estéreis a partir da pele de 90 cães distintos, todos da idade adulta e independente de raça ou sexo, assim distribuídos: 40 cães com quadro clínico de piодermite e 50 cães saudáveis.

Após a colheita, os suabes identificados eram acondicionados em tubos esterilizados e imediatamente encaminhados ao Laboratório de Microbiologia da EVZ/UFG.

## 2.2 Isolamento e identificação

O isolamento de *Staphylococcus* spp. foi realizado de acordo com TERNES (2010) com pequenas modificações, onde as amostras foram semeadas em manitol ágar salgado (*Mannitol Salt Agar*), ágar nutriente (*Nutriente Agar - NA*), ágar *screening* (Mueller-Hinton) acrescido de 5 µg/mL de oxacilina e NaCl (5%) e em ágar caldo TSB (*Trypticase Soy Broth*) acrescido de oxacilina (5 µg/mL) e NaCl (5%), com posterior incubação a 37°C por 24 a 48 hs.

As colônias que apresentaram crescimento com borda bem delimitada, com coloração branca, acinzentadas a transparentes, foram transferidas para ágar nutriente (AN) e incubadas a 37°C por 24 horas. Posteriormente, todos os isolados foram submetidos à coloração de Gram, sendo selecionados aqueles que apresentaram-se sob a forma de cocos Gram-positivos isolados, em pares e/ou dispostos em cachos e positivos.

Os cocos Gram-positivos isolados foram submetidos ao teste da catalase, utilizado para diferenciar os gêneros *Staphylococcus* e *Streptococcus*. Sobre uma lâmina depositou-se uma alçada de cultivo bacteriano puro e adicionou-se uma gota de peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) a 2% verificando-se o rápido aparecimento de bolhas de gás ou efervescência, que se considera prova positiva para *Staphylococcus/Micrococcus* (TERNES, 2010).

A prova de suscetibilidade à bacitracina foi realizada para diferenciar o gênero *Micrococcus* do *Staphylococcus*, haja vista que ambos possuem as mesmas características fenotípicas com relação às provas da catalase e

coagulase. Para a realização desta prova foi preparada uma suspensão bacteriana com turvação equivalente ao padrão 0,5 da escala de McFarland ( $1,5 \times 10^8$  UFC/mL). Essa suspensão foi semeada sobre a superfície do ágar Mueller-Hinton e um disco de bacitracina de 0,04U foi depositado sobre a superfície do meio. A placa foi incubada a 37°C por 24 horas e posteriormente o diâmetro do halo de inibição foi medido. *Staphylococcus* são resistentes à bacitracina e crescem até a borda do disco, enquanto que *Micrococcus* são sensíveis e apresentam halo de 10 mm ou maiores (TERASAWA, 2006).

Para caracterizar os *Staphylococcus* spp. em coagulase positivo ou negativo foi realizada a pesquisa da enzima coagulase por meio da metodologia em tubo, utilizando plasma de coelho liofilizado (*Newprov*<sup>®</sup>). Uma alçada de colônia pura, repicada em AN e incubada por 24 horas a 37°C foi inoculada em 0,3 mL de plasma reconstituído em solução salina estéril. As leituras foram realizadas em duas, quatro, seis e 24 horas de incubação. A formação de coágulo para qualquer tempo analisado foi considerado como prova positiva (TERNES, 2010).

Outra prova utilizada para caracterizar as espécies do gênero *Staphylococcus* foi a prova da DNase. A enzima DNase foi detectada semeando-se, em forma de estria densa, colônias do microrganismo em meio para DNase, preparado segundo especificações do fabricante. Após o período de incubação de 24 horas a 37°C, observou-se a formação de um halo claro ao redor da semeadura (prova positiva), indicando a hidrólise do DNA.

Para a realização do teste de Voges-Proskauer (VP), uma alçada de cada colônia isolada foi depositada em tubos de hemólise com tampas de algodão estéreis contendo 1mL de meio de Clark e Lubs (caldo glicose tamponado) esterilizado. Os tubos inoculados com o repique foram incubados a 37°C por 24 horas, após esse tempo foram destampados e adicionou-se 0,6mL de solução alcoólica 5% de  $\alpha$ -naftol e 0,2mL de solução 40% de KOH, nessa ordem. Os tubos foram agitados para expor o meio ao oxigênio e mantidos em repouso por 15 minutos. O desenvolvimento de uma linha avermelhada na parte superior do tubo foi considerado resultado positivo, indicando a presença de diacetina, o produto de oxidação da acetoína (MAC FADDIN, 1976; KONEMAN et al., 2001).

A fermentação da maltose e trealose foi outra prova realizada; neste caso os carboidratos foram incorporados a um meio básico, sendo a

concentração final de 1%. Foi verificada a capacidade de fermentar: a mudança de cor do meio para o vermelho/rosa foi considerado como prova positiva e sem alterações como prova negativa (TERASAWA, 2006).

As provas descritas anteriormente permitiram o isolamento e identificação das espécies de *Staphylococcus* spp. (*S. aureus*; *S. pseudintermedius*; *S. schleiferi* sub. *coagulans*; *S. epidermidis*; *S. schleiferi* sub. *schleiferi* e outros estafilococos coagulase-negativo) segundo uma chave de identificação feita por TERASAWA (2006), as amostras foram identificadas e congeladas em duplicata em TSB suplementado com 20% glicerol e estocados a  $-70^{\circ}\text{C}$ .

### 2.3 Testes de sensibilidade a antimicrobianos

O método de disco-difusão foi utilizado para testar a suscetibilidade dos isolados frente aos seguintes antimicrobianos: oxacilina (1 $\mu\text{g}$ ), cefoxitina (30 $\mu\text{g}$ ), amoxicilina (10 $\mu\text{g}$ ), cefalexina (30 $\mu\text{g}$ ), clindamicina (2 $\mu\text{g}$ ), ciprofloxacina (5 $\mu\text{g}$ ), eritromicina (15 $\mu\text{g}$ ), enrofloxacina (5 $\mu\text{g}$ ), gentamicina (10 $\mu\text{g}$ ), sulfametazol-trimetoprim (25 $\mu\text{g}$ ) e tetraciclina (30 $\mu\text{g}$ ).

De acordo com as recomendações do *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI, 2010), uma suspensão bacteriana de cada isolado, com turvação equivalente à escala 0,5 de MacFarland ( $1,5 \times 10^8$ UFC/mL), foi inoculada na superfície do ágar Mueller-Hinton. Os discos de antimicrobianos utilizados foram depositados na superfície do meio com auxílio de uma pinça estéril. A leitura foi realizada após 18-24h de incubação das placas a  $37^{\circ}\text{C}$ , pela medida dos halos de inibição, com a utilização de régua milimetrada. Os diâmetros obtidos em milímetros foram comparados com uma tabela (CLSI, 2010).

## 3. RESULTADOS

Ao todo, obteve-se 72 isolados de *Staphylococcus* spp. da pele de cães, sendo 36 a partir de amostras da pele com quadro clínico de piodermite (Grupo 1) e 36 isolados da pele sadia (Grupo 2) (Tabela 1).

No grupo de sádios foram isolados: *S. pseudintermedius* 50% (18/36); *S. epidermidis* 38,9% (14/36); outros estafilococos coagulase-negativo (OSCoN) 8,3% (3/36) e *S. schleiferi sub. coagulans* 2,8% (1/36). No grupo de cães com piodermite foram isolados: *S. pseudintermedius* 58,3% (21/36); *S. epidermidis* 25% (9/36); *S. aureus* 11,1% (4/36) e outros estafilococos coagulase-negativo (OSCoN) 5,6% (2/36) (Tabela 1).

O programa utilizado para análise dos dados foi SPSS versão 15.0 for Windows. O teste qui-quadrado ( $\chi^2$ ) (nível de significância  $\alpha < 0,05$ ) foi utilizado para comparar a frequência dos *Staphylococcus* spp. entre os dois grupos, porém não houve diferença significativa ( $p=0,164$ ).

**TABELA 1** – Frequência das espécies de *Staphylococcus* isoladas da pele de cães com piodermite e aparentemente saudáveis

| <b>Isolado</b>                          | <b>Grupo 1<br/>n(%)</b> | <b>Grupo 2<br/>n(%)</b> | <b>Total<br/>n(%)</b> |
|---|-------------------------|-------------------------|-----------------------|
| <i>S. pseudintermedius</i>              | 21 (58,3)               | 18 (50)                 | 39 (54,2)             |
| <i>S. epidermidis</i>                   | 9 (25)                  | 14 (38,9)               | 23 (31,9)             |
| OSCoN                                   | 2 (5,6)                 | 3 (8,3)                 | 5 (6,9)               |
| <i>S. aureus</i>                        | 4 (11,1)                | 0 (0)                   | 4 (5,6)               |
| <i>S. schleiferi sub.<br/>coagulans</i> | 0 (0)                   | 1 (2,8)                 | 1 (1,4)               |
| <b>Total n(%)</b>                       | <b>36 (100)</b>         | <b>36 (100)</b>         | <b>72 (100)</b>       |

Grupo 1 - isolados de cães com piodermite; Grupo 2 - isolados de cães com pele saudável; OSCoN - outros estafilococos coagulase-negativo

A suscetibilidade a antimicrobianos foi avaliada pelo método de difusão em ágar estabelecido pelo CLSI (CLSI, 2010), observando os seguintes resultados: Cefalexina 84,7% (61/72); Enrofloxacina 79,2% (57/72); Cefoxitina 79,2% (57/72); Amoxicilina 75% (54/72); Oxacilina 72,2% (52/72); Gentamicina 70,8% (51/72); Ciprofloxacina 61,1% (44/72); Sulfametazol-trimetoprim 61,1% (44/72); Tetraciclina 55,6% (40/72); Clindamicina 54,2% (39/72); Eritromicina 52,8% (38/72) (Tabela 2).

Para a resistência: Tetraciclina 40,3% (29/72); Eritromicina 34,7% (25/72); Clindamicina 33,3% (24/72); Ciprofloxacina 26,4% (19/72); Oxacilina

23,6% (17/72); Sulfametazol-trimetoprim 22,2% (16/72); Cefoxitina 20,8% (15/72); Gentamicina 15,3% (11/72); Amoxicilina 12,5% (9/72); Enrofloxacin 12,5% (9/72); Cefalexina 9,7% (7/72) (Tabela 2).

A suscetibilidade a antimicrobianos por grupo é apresentada na Tabela 2. Não houve diferença significativa entre os grupos para cada antibiótico testado, exceto para sulfametazol-trimetoprim (SUT) ( $p=0,014$ ).

**TABELA 2** – Perfil de suscetibilidade aos antimicrobianos dos isolados de *Staphylococcus* spp. por grupo

| Antibiótico | Sensível             |                      | Intermediário        |                      | Resistente           |                      |
|-------------|----------------------|----------------------|----------------------|----------------------|----------------------|----------------------|
|             | Grupo 1<br>36 (100%) | Grupo 2<br>36 (100%) | Grupo 1<br>36 (100%) | Grupo 2<br>36 (100%) | Grupo 1<br>36 (100%) | Grupo 2<br>36 (100%) |
| <b>OXA</b>  | 28 (77,8)            | 24 (66,7)            | 2 (5,6)              | 1 (2,8)              | 6 (16,7)             | 11 (30,6)            |
| <b>AMO</b>  | 29 (80,6)            | 25 (69,4)            | 3 (8,3)              | 6 (16,7)             | 4 (11,1)             | 5 (13,9)             |
| <b>CFE</b>  | 31 (86,1)            | 30 (83,3)            | 2 (5,6)              | 2 (5,6)              | 3 (8,3)              | 4 (11,1)             |
| <b>CFO</b>  | 30 (83,3)            | 27 (75)              | 0 (0)                | 0 (0)                | 6 (16,7)             | 9 (25)               |
| <b>CLI</b>  | 21 (58,3)            | 18 (50)              | 2 (5,6)              | 7 (19,4)             | 13 (36,1)            | 11 (30,6)            |
| <b>CIP</b>  | 20 (55,6)            | 24 (66,7)            | 3 (8,3)              | 6 (16,7)             | 13 (36,1)            | 6 (16,7)             |
| <b>ERI</b>  | 20 (55,6)            | 18 (50)              | 4 (11,1)             | 5 (13,9)             | 12 (33,3)            | 13 (36,1)            |
| <b>ENO</b>  | 25 (69,4)            | 32 (88,9)            | 5 (13,9)             | 1 (2,8)              | 6 (16,7)             | 3 (8,3)              |
| <b>GEN</b>  | 23 (63,9)            | 28 (77,8)            | 7 (19,4)             | 3 (8,3)              | 6 (16,7)             | 5 (13,9)             |
| <b>SUT</b>  | 16 (44,4)            | 28 (77,8)            | 9 (25)               | 3 (8,3)              | 11 (30,6)            | 5 (13,9)             |
| <b>TET</b>  | 21 (58,3)            | 19 (52,8)            | 3 (8,3)              | 0 (0)                | 12 (33,3)            | 17 (47,2)            |

Grupo 1 - isolados de cães com piodermite; Grupo 2 - isolados de cães com pele saudável; OXA - oxacilina; AMO - amoxicilina; CFE - cefalexina; CFO - cefoxetina; CLI - clindamicina; CIP - ciprofloxacina; ERI - eritromicina; ENO - enrofloxacin; GEN - gentamicina; SUT - sulfametazol-trimetoprim; TET - tetraciclina

A multirresistência (resistência a três ou mais classes de antibióticos) foi verificada em 29,7% (21/72) dos isolados (Quadro 1). Um isolado de *S. pseudintermedius* apresentou resistência a quase todos os antibióticos testados (Quadro 1). O percentual de resistência aos antibióticos  $\beta$ -lactâmicos testados, dentro dos isolados multirresistentes, foi de 71,4% (15/21). Entre as cepas que apresentaram multirresistência (29,7%), 43% (9/25) foram resistentes a uma classe dos antibióticos de escolha nas piodermites (penicilinas, fluoroquinolonas e

cefalosporinas), 14,3% (3/21) foram resistentes a duas classes e 43% (9/21) às três classes, concomitantemente.

**QUADRO 1** – Perfil de resistência a múltiplos antimicrobianos em 25 isolados de *Staphylococcus* spp.

| Nº | Grupo | Espécie do isolado de <i>Staphylococcus</i> spp. | Antibióticos  |
|----|-------|--|---|
| 1  | 1     | <i>S.aureus</i>                                  | OXA <sup>a</sup> , CFE <sup>b</sup> , CFO <sup>c</sup> , CLI <sup>d</sup> , CIP <sup>e</sup> , ERI <sup>f</sup> |
| 2  | 1     | <i>S. epidermidis</i>                            | CLI, CIP, ERI   |
| 3  | 1     | <i>S. epidermidis</i>                            | OXA, CFE, CFO, CLI, CIP, GEN <sup>g</sup>   |
| 4  | 1     | <i>S. pseudintermedius</i>                       | CLI, ERI, SUT <sup>h</sup>  |
| 5  | 1     | <i>S. pseudintermedius</i>                       | OXA, AMO <sup>i</sup> , CFO, CLI, CIP, GEN  |
| 6  | 1     | <i>S. pseudintermedius</i>                       | OXA, CFO, CLI, CIP  |
| 7  | 1     | <i>S. pseudintermedius</i>                       | OXA, CFO, CLI, CIP, ERI, GEN, TET <sup>j</sup>  |
| 8  | 1     | <i>S. pseudintermedius</i>                       | CLI, CIP, ERI, ENO <sup>k</sup>   |
| 9  | 1     | <i>S. pseudintermedius</i>                       | CLI, CIP, ERI, ENO, TET   |
| 10 | 1     | <i>S. pseudintermedius</i>                       | OXA, CFE, CFO, CLI, CIP, ENO, SUT, TET  |
| 11 | 1     | <i>S. pseudintermedius</i>                       | AMO, ERI, SUT, TET  |
| 12 | 2     | <i>S. epidermidis</i>                            | OXA, CLI, TET   |
| 13 | 2     | <i>S. epidermidis</i>                            | OXA, CFO, GEN, TET  |
| 14 | 2     | <i>S. epidermidis</i>                            | CLI, CIP, ERI, GEN  |
| 15 | 2     | <i>S. epidermidis</i>                            | AMO, CLI, ERI, GEN, SUT, TET  |
| 16 | 2     | <i>S. pseudintermedius</i>                       | CLI, CIP, SUT   |
| 17 | 2     | <i>S. pseudintermedius</i>                       | AMO, CLI, CIP, ERI, TET   |
| 18 | 2     | <i>S. pseudintermedius</i>                       | OXA, CFO, CLI, CIP, ERI, ENO, SUT, TET  |
| 19 | 2     | <i>S. pseudintermedius</i> *                     | OXA, AMO, CFE, CFO, CLI, CIP, ERI,<br>ENO, GEN, SUT, TET  |
| 20 | 2     | <i>S. pseudintermedius</i>                       | OXA, CFE, CFO, ERI, GEN   |
| 21 | 2     | <i>S. pseudintermedius</i>                       | OXA, CFO, ERI, ENO, TET   |
| 22 | 2     | OSCoN**  | OXA, CFO, CLI   |
| 23 | 2     | OSCoN**  | OXA, CFE, CFO   |
| 24 | 2     | <i>S. pseudintermedius</i> **                    | OXA, CFE, CFO, TET  |
| 25 | 2     | <i>S. pseudintermedius</i> **                    | OXA, CFO, CIP   |

Número 1-21: isolados multirresistentes; Grupo 1 - isolados de cães com piodermite; Grupo 2 - isolados de cães com pele saudável; OSCoN - outros estafilococos coagulase negativo; <sup>a</sup>oxacilina; <sup>b</sup>cefalexina; <sup>c</sup>cefoxetina; <sup>d</sup>clindamicina; <sup>e</sup>ciprofloxacina; <sup>f</sup>eritromicina; <sup>g</sup>gentamicina; <sup>h</sup>sulfametazol-trimetoprim; <sup>i</sup>amoxicilina; <sup>j</sup>tetraciclina <sup>k</sup>enrofloxacina; \*resistência a todos os antibióticos testados; \*\*isolados sem perfil de multirresistência

#### 4. DISCUSSÃO

No presente estudo, a espécie de bactéria mais frequentemente isolada da pele dos cães foi a *S. pseudintermedius* (54,2%). Tanto no grupo de animais sadios (50%) quanto no grupo de animais com piodermite (58,3%), esta espécie apresentou a maior frequência, podendo ser considerada, seguramente, como a principal espécie envolvida nos processos inflamatórios da pele nos cães. Estes resultados vão ao encontro das afirmações de COX et al. (1988), BIBERSTEIN & HIRSH (2003), LEE et al. (2003), LOEFFLER et al. (2005), SASAKI et al. (2005), PIANTA et al. (2006) WEESE et al. (2006), BANNOEHR et al. (2007), SASAKI et al. (2007b), GRIFFETH et al. (2008), VANNI et al. (2009) e GUARDABASSI et al. (2010), que apresentaram o *S. pseudintermedius* como sendo a espécie de maior prevalência encontrada na pele de cães saudáveis e o principal agente bacteriano responsável pelo desenvolvimento de piodermite canina.

A espécie *S. aureus* é encontrada como um comensal da pele de seres humanos, porém no presente trabalho foram isolados quatro (11,1%) desta espécie no grupo de cães com piodermite. O fato de terem sido isolados *S. aureus* em cães, sugere a possibilidade de ter ocorrido uma transmissão horizontal, porém os dados não são suficientes para que se confirme essa transmissão. Em contrapartida, no grupo de cães sadios não conseguiu-se nenhum isolado da espécie em questão. Essa frequência está próxima da encontrada por GRIFFETH e colaboradores (2008), que isolaram 12% de *S. aureus* em cães com pele inflamada, enquanto SASAKI e colaboradores (2007a) isolaram dos pacientes (cães) de um hospital veterinário de ensino no Japão cinco linhagens (8,8%) de *S. aureus* e BOOST e colaboradores (2007) encontraram 8,8% de *S. aureus* em cães.

Outra espécie de estafilococos coagulase-positivo isolada foi o *S. schleiferi subsp. coagulans*, porém apenas um isolado da espécie foi identificado no grupo de animais sadios (2,8%). Embora *S. aureus* e *S. schleiferi* estejam mais envolvidos em casos de infecções recorrentes conforme afirmaram BIBERSTEIN & HIRSH (2003) e GUARDABASSI et al. (2010), a espécie *S. schleiferi* foi isolada em um animal saudável, provavelmente vivendo como um comensal da pele do mesmo. Já as espécies de *S. aureus* foram encontradas no grupo de animais que

apresentaram piodermite. Provavelmente, esses quatro animais (Tabela 1) adquiriram essas cepas de seus proprietários ou até mesmo, na comunidade em que vivem. Pelo fato de *S. aureus* não ser um comensal comumente encontrado na pele de cães, evidencia-se uma possível transmissão bacteriana humano-animal.

Segundo MANIAN (2003), VAN DUIJKEREN e colaboradores (2005), WEESE e colaboradores (2006) e GUARDABASSI e colaboradores (2010), a transmissão para animais de estimação tem sido associada a casos de infecção por *S. aureus* em proprietários de animais de companhia e veterinários. A transmissão da infecção do animal para o homem também tem sido documentada por VAN DUIJKEREN e colaboradores (2003) e VITALE e colaboradores (2006). De uma forma geral, esses dados indicam que, embora o *S. aureus* em cães possa ter origem em humanos, esses animais podem atuar como reservatórios para a disseminação dos patógenos na comunidade.

Em contrapartida, GOODACRE e colaboradores (1997) observaram pessoas como portadoras assintomáticas de *S. intermedius* devido ao contato físico com cães e correlacionaram a cepa identificada de cada pessoa com a do seu respectivo animal de estimação. Em outro estudo, GUARDABASSI e colaboradores (2004) verificaram a transmissão de *S. intermedius* entre cães que sofriam de pioderma profunda e seus proprietários, o que resultou em humanos assintomáticos que serviam de carreadores dessa bactéria. Esse estudo também constatou que o isolamento de *S. intermedius* de proprietários de cães foi significativamente maior do que de um grupo controle (pessoas que não possuíam animais de companhia). O primeiro caso de transmissão zoonótica patogênica de *S. intermedius* foi confirmado por TANNER e colaboradores (2000), por meio da análise do gene 16S rRNA de culturas isoladas tanto da infecção do proprietário quanto da orelha e microbiota natural do seu cão. VAN HOOVELS e colaboradores (2006) reportaram uma infecção estafilocócica em humano causada por *S. pseudintermedius*, evidenciando o caráter zoonótico destas bactérias.

O percentual total de estafilococos coagulase-negativo (*S. epidermidis* e OSCoN) isolado foi de 38,9% (28/72). A espécie de SCoN mais frequentemente isolada foi a *S. epidermidis* 31,9% (23/72). O *S. epidermidis* foi isolado com maior porcentagem a partir da pele dos cães saudáveis 38,9% (14/36) do que da pele dos

cães com piodermite 25% (9/36). MACHADO (2007) afirmou que, embora presente, esta espécie de SCoN não é a mais comumente relacionada como agente causal das piodermite caninas e nos humanos é mais associada a infecções em geral. Entretanto, os resultados obtidos neste estudo sugerem que o *S. epidermidis* mostrou-se como o mais importante patógeno envolvido nas piodermite caninas depois do *S. pseudintermedius*.

No presente trabalho não foi isolado o *S. schleiferi* subsp. *schleiferi*, outra espécie de estafilococos coagulase-negativo (SCoN). Apesar de lhes faltarem muitos dos fatores de virulência que são associados aos estafilococos coagulase-positivo (SCoP), os SCoN também podem ser patogênicos e causarem infecções. SCoN, particularmente o *S. schleiferi* subsp. *schleiferi*, foram isoladas de piodermite e infecções de feridas em animais por FRANK e colaboradores (2003), KANIA e colaboradores (2004) e VENGUST e colaboradores (2006).

O percentual de SCoP (*S. aureus*, *S. pseudintermedius* e *S. schleiferi* subsp. *coagulans*) foi maior que o de SCoN (*S. epidermidis* e OSCoN), respectivamente, 61,1% e 38,9%. O maior número de isolados SCoP também foi verificado dentro de cada grupo, porém, nos cães afetados com piodermite esse percentual foi relativamente maior, 69,4% contra 52,7% do grupo dos sadios. Estes dados corroboram com a literatura, onde vários trabalhos, cita-se LOEFFLER et al. (2005), SASAKI et al. (2005), PIANITA et al. (2006) WEESE et al. (2006), BANNOEHR et al. (2007), SASAKI et al. (2007a), GRIFFETH et al. (2008), MALUTA et al. (2008) e VANNI et al. (2009), mostraram um perfil de isolamento maior de SCoP (principalmente o *S. pseudintermedius*) envolvidos nos processos infecciosos de pele em cães.

As medidas dos diâmetros de inibição observadas nos antibiogramas revelaram que os antibacterianos que mostraram maior inibição do crescimento bacteriano (70% ou mais), foram: Cefalexina (84,7%); Cefoxitina (79,2%); Enrofloxacina (79,2%); Amoxicilina (75%); Oxacilina (72,2%) e Gentamicina (70,8%). Para todos os antibióticos testados o nível de suscetibilidade foi superior a 50%. O maior e menor nível de resistência encontrado foi de 40,3% e 9,7% para a tetraciclina e cefalexina, respectivamente. Este dado é importante, pois a cefalexina é, dentre as cefalosporinas, a de escolha no tratamento das piodermite, conforme afirmaram GUARDABASSI e colaboradores (2010).

O nível de resistência dos *Staphylococcus sp.* neste estudo frente à amoxicilina (12,5%) foi menor em relação ao trabalho realizado somente com isolados de cães com piodermite (52,4%) por FUKATA e colaboradores (2010) e, embora não demonstre alta resistência, causa preocupação, pois esse  $\beta$ -lactâmico, muitas vezes associado ao ácido clavulânico, tem sido amplamente utilizado na prática veterinária. A diminuição na sua eficiência pode comprometer o tratamento das doenças de origem bacteriana (piodermite), além disso, juntamente com as cefalosporinas e quinolonas (também muito utilizadas), poderiam auxiliar a seleção e o consequente aparecimento de MRS ou multirresistentes, segundo conclusões de LOEFFLER e colaboradores (2005).

O fato de terem sido observadas diferenças significativas na sensibilidade ao antimicrobiano sulfametazol-trimetoprim ( $p < 0,05$ ) e estafilococos multirresistentes (29,7%) entre as cepas isoladas nos dois grupos de cães, sugere a importância da realização de testes de suscetibilidade antimicrobiana nas piodermite caninas.

## 5. CONCLUSÃO

*S. pseudintermedius* é a espécie bacteriana de maior frequência nos casos de piodermite canina estudados.

O isolamento de cepas multirresistentes neste estudo indicam evidente suscetibilidade das mesmas aos antimicrobianos normalmente utilizados no tratamento de infecções estafilocócicas.

## REFERÊNCIAS

1. BANNOEHR, J.; BEN ZAKOUR, N. L.; WALLER, A. S.; GUARDABASSI, L.; THODAY, K. L.; VAN DEN BROEK, A. H.; FITZGERALD, J. R. Population genetic structure of the *Staphylococcus intermedius* group: insights into agr diversification and the emergence of methicillin-resistant strains. **The Journal of Bacteriology**, Washington DC, v.189, n.23, p.8685-8692, 2007.
2. BIBERSTEIN, E. L.; HIRSH, D. C. In: HIRSH, D. C.; ZEE, Y. C. **Microbiologia Veterinária**. 2.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2003. cap.21. 108-112p.
3. BOOST, M. V.; O'DONOGHUE, M. M.; SIU, K. H. Characterisation of methicillin-resistan *Staphylococcus aureus* isolates from dogs and their

- owners. **Clinical Microbiology and Infection**, Marseille, v.13. , n.7, p.731-733, 2007.
4. COX H. U.; HOSKINS J. D.; NEWMAN S. S. Temporal study of staphylococcal species on healthy dogs. **American Journal of Veterinary Research**, Chicago, v.49, n.6, p.747, 1988.
  5. CLSI. **Clinical and Laboratory Standards Institute**. Table 2C. Zone Diameter and MIC Interpretative Standards for *Staphylococcus* spp., 2010.
  6. FRANK, L. A.; KANIA, S. A.; HNILICA, K. A.; WILKES, R. P.; BEMIS, D. A. Isolation of *Staphylococcus schleiferi* from dogs with pyoderma. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, Schaumburg, v.222, n.4, p.451-4, 2003.
  7. FUKATA, T.; KAWAKAMI, T.; SHIBATA, S.; MURAYAMA, N.; NAGATA, M.; NISHIFUJI, K.; IWASAKI, T. Antimicrobial Susceptibility and Methicillin Resistance in *Staphylococcus pseudintermedius* and *Staphylococcus schleiferi* subsp. *coagulans* Isolated from Dogs with Pyoderma in Japan. **The Journal of Veterinary Medical Science**, Tokio, v.72. n.12. p.1615-1619, 2010.
  8. GANIÈRE, J. P.; MÉDAILLE, C.; MANGION, C. Antimicrobial drug susceptibility of *Staphylococcus intermedius* clinical isolates from canine pyoderma. **Journal of Veterinary Medicine B, Infectious Diseases and Veterinary Public Health**, Berlin, v.52, n.1, p.25–31, 2005.
  9. GOODACRE, R.; HARVEY, R.; HOWELL, S. A.; GREENHAM, L. W.; NOBLE, W. C. An epidemiological study of *Staphylococcus intermedius* strains isolated from dogs, their owners and veterinary surgeons. **Journal of Analytical and Applied Pyrolysis**, Ravenna, v.44, n.1, p.49-64, 1997.
  10. GORTEL, K.; CAMPBELL, K. L.; KAKOMA, I.; WHITTEM, T.; SCHAEFFER, D. J.; WEISIGER, R. M. Methicillin resistance among staphylococci isolated from dogs. **American Journal of Veterinary Research**, Chicago, v. 60, n. 12, p. 1526-1530, 1999.
  11. GRIFFETH, G. C.; MORRIS, D. O.; ABRAHAM, J. L.; SHOFER, F. S.; RANKIN, S. C. Screening for skin carriage of methicillin-resistant coagulase-positive staphylococci and *Staphylococcus schleiferi* in dogs healthy and inflamed skin. **Veterinary Dermatology**, Oxford, v.19, n.3, p.142-149, 2008.
  12. GUARDABASSI, L.; HOUSER, G. A.; FRANK, L. A.; PAPICH, M. G. Orientações para o uso de antimicrobianos em cães e gatos. In: GUARDABASSI, L.; JENSEN, L. B.; KRUSE, H. **Guia de antimicrobianos em veterinária**. 1.ed. Porto Alegre: Artmed, 2010. cap.11. 224-246p.
  13. 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**, Amsterdam, v.98, n.1, p.23-27, 2004.

14. HAJEK, V. *Staphylococcus intermedius*, a new species isolated from animals. **International Journal of Systematic Bacteriology**, Spencers Wood, v.26. p.401–408, 1976.
15. HANSELMAN, B. A.; KRUTH, S.; WEESE, J. S. Methicillin-resistant staphylococcal colonization in dogs entering a veterinary teaching hospital. **Veterinary Microbiology**, Amsterdam, v.126, n.1-3, p.277-281, 2008.
16. HAUSCHILD, T.; WÓJCIK, A. Species distribution and properties of staphylococci from canine dermatitis. **Research in Veterinary Science**, Roma, v.82, n.1, p.1–6, 2007.
17. HOEKSTRA, K. A.; PAULTON, R. J. L. Clinical prevalence and antimicrobial susceptibility of *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus intermedius* in dogs. **Journal of Applied Microbiology**, Northern Ireland, v.93. p.406–413, 2002.
18. INTORRE, L.; VANNI, M.; DI BELLO, D.; PRETTI, C.; MEUCCI, V.; TOGNETTI, R.; SOLDANI, G.; CARDINI, G.; JOUSSON, O. Antimicrobial susceptibility and mechanism of resistance to fluoroquinolones in *Staphylococcus intermedius* and *Staphylococcus schleiferi*. **Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics**, v.30, n.5, p.464–469, 2007.
19. JONES, R. D.; KANIA, S. A.; ROHRBACH, B. W.; FRANK, L. A.; BEMIS, D. A. Prevalence of oxacillin- and multidrug-resistant staphylococci in clinical samples from dogs: 1772 samples (2001–2005). **Journal of the American Veterinary Medical Association**, Schaumburg, v.230, n.2, p.221–227, 2007.
20. KANIA, S. A.; WILLIAMSON, N. L.; FRANK, L. A.; WILKES, R. P.; JONES, R. D.; BEMIS, D. A. Methicillin resistance of staphylococci isolated from the skin of dogs with pyoderma. **American Journal of Veterinary Research**, Schaumburg, v.65, n.9, p.1265-1268, 2004.
21. KONEMAN, E. W.; ALLEN, S. D.; JANDA, W. M.; SCHRECKENBERGER, P. C.; WINN JR., W. C. **Diagnóstico Microbiológico**. 5.ed. Rio de Janeiro: MEDSI, 2001. 1465p.
22. LEE P. K.; ZIPOLI M. T.; WEINBERG A. N. Pyodermas: *Staphylococcus aureus*, streptococcus, and other gram-positive bacteria. In: FREEDBERG I. M., EISEN A. Z., WOLFF K. **Fitzpatrick's Dermatology in General Medicine**. 6.ed. New York: McGraw Hill Professional, 2003. 1856p.
23. LOEFFLER A.; BOAG A. K.; SUNG J. Prevalence of methicillin resistant *Staphylococcus aureus* among staff and pets in a small animal referral hospital in the UK. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, Londres, v. 57, p.461–465, 2005.
24. LYSKOVA, P.; VYDRZALOVA, M.; MAZUROVA, J. Identification and antimicrobial susceptibility of bacteria and yeasts isolated from healthy dogs and dogs with otitis externa. **Journal of Veterinary Medicine Series A**, v.54, n.10, p.559–563, 2007.

25. MACHADO, A. B. M. P. **Resistência à meticilina mediada pelo gene mecA nos *Staphylococcus* spp coagulase negativo**. Rio Grande do Sul, 2007. 162f. Dissertação (Mestrado em Ciências Médicas) – Faculdade de Medicina, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RGS.
26. MAC FADDIN, J. F. **Biochemical tests for identification of medical bacteria**. Baltimore: Williams & Wilkins Company, 1976. 312p.
27. MALUTA, R. P. **Isolamento e perfil de suscetibilidade a antimicrobianos de cepas de estafilococos resistentes à em um hospital veterinário de ensino no Brasil**. Jaboticabal, 2008. 44f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agropecuária) – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, SP.
32. MALUTA, R. P.; STELLA, A. E.; OLIVEIRA, A. C.; RIGOBELLO, E. C.; LEMOS, M. V. F.; AVILA, F. A.. Isolamento de estafilococos resistentes a meticilina e perfil de suscetibilidade a antimicrobianos de cepas isoladas em um hospital veterinário de ensino no Brasil. In: Congresso Brasileiro de Iniciação Científica, 2008, Gramado. **Anais eletrônicos...**[online]. Disponível em: [www.sovergs.com.br/conbravet2008/anais/cd/resumos/R0200-3.pdf](http://www.sovergs.com.br/conbravet2008/anais/cd/resumos/R0200-3.pdf). Acesso em: 17 mai. 2009.
28. MANIAN, F. A. Asymptomatic nasal carriage of mupirocin-resistant, methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) in a pet dog associated with MRSA infection in household contacts. **Clinical Infectious Diseases**, Oxford, v.36, n.2, p26-28, 2003.
29. PEDERSEN, K.; PEDERSEN, K.; JENSEN, H.; FINSTER, K.; JENSEN, V. F.; HEUER, O. E. Occurrence of antimicrobial resistance in bacteria from diagnostic samples from dogs. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, Londres, v .60. n.4. p.775-781, 2007.
30. PIANTA, C.; OLIVEIRA, J.; FALLAVENA, L. C. B.; ESMERALDINO, A. T.; SILVA Jr, V. B. Pioderma estafilocócico canino: identificação das espécies e sensibilidade aos antimicrobianos. **Revista de Ciências Agroveterinárias**, Lage. v.5. p.60-63, 2006.
31. SASAKI, T.; KIKUCHI, K.; TANAKA, Y.; TAKAHASHI, N.; KAMATA, S.; HIRAMATSU, K. Methicillin-resistant *Staphylococcus pseudintermedius* in a veterinary teaching hospital. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington DC. v.45. n.4. p.1118-1125, 2007a.
32. SASAKI, T.; KIKUCHI, K.; TANAKA, Y.; TAKAHASHI, N.; KAMATA, S.; HIRAMATSU, K. Reclassification of phenotypically identified *Staphylococcus intermedius* strains. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington DC, Estados Unidos. v.45. p.2770-2778, 2007b.
33. SASAKI, A.; SHIMIZU, A.; KAWANO, J.; WAKITA, Y.; HAYASHI, T.; OOTSUKI, S. Characteristics of *Staphylococcus intermedius* isolated from diseased and healthy dogs. **The Journal of Veterinary Medical Science**, Tokio, v.67, n.1, p.103–106, 2005.

34. TANNER, M. A.; EVERETT, C. L.; YOUVAN, D. C. Molecular phylogenetic evidence for noninvasive zoonotic transmission of *Staphylococcus intermedius* from a canine pet to a human. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington DC, v.38. p.1628-1631, 2000.
35. TERASAWA, L. B. **Caracterização da resistência à oxacilina em estafilococos coagulase negativa isolados no Hospital de Clínicas de Curitiba**. Paraná, 2006. 109f. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas e da Saúde) – Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, PR.
36. TERNES, Y. M. F. **Epidemiologia molecular de *Staphylococcus coagulase negativa (SCon)* isolados da cavidade nasal de neonatos internados em uma unidade de tratamento intensivo de Goiânia**. Goiás, 2010. 75f. Dissertação (Mestrado em Medicina Tropical) – Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública da Universidade Federal de Goiás, Goiânia, GO
37. VANNI, M.; TOGNETTI, R.; PRETTI, C.; CREMA, F.; SOLDANI, G.; MEUCCI, V.; INTORRE, L. Antimicrobial susceptibility of *Staphylococcus intermedius* and *Staphylococcus schleiferi* isolated from dogs. **Research in Veterinary Science**, Pisa, Itália. v.87. n.2. p.192-195, 2009.
38. VAN DUIJKEREN, E.; BOX, A. T.; HECK, M. E.; WANNET, W. J.; FLUIT, A. C. Methicillin-resistant staphylococci isolated from animals. **Veterinary Microbiology**, Amsterdam, v. 103, n. 1-2, p. 91-97, 2004.
39. VAN DUIJKEREN, E.; BOX, A. T. A.; MULDER, J.. Methicillin resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) infection in a dog in the Netherlands. **Tijdschrift voor Diergeneeskunde**, Bezoekadres, v.128, n.10, p.314-315, 2003.
40. VAN DUIJKEREN, E.; WOLFHAGEN, M. J.; HECK, M. E.; WANNET, W. J. Transmission of a Pantone-Valentine leucocidin-positive, methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strain between humans and a dog. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington DC, v.43, n.12, p.6209-6211, 2005.
41. VAN HOOVELS, L.; VANKEERBERGHEN, A.; BOEL, A.; VAN VAERENBERGH, K.; DE BEENHOUWER, H. First case of *Staphylococcus pseudintermedius* infection in a human. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington DC, v.44, n.12, p.4609-4612, 2006.
42. VENGUST, M.; ANDERSON, M. E. C.; ROUSSEAU, J.; WEESE, J. S. Methicillin-resistant staphylococcal colonization in clinically normal dogs and horses in the community. **Letters in Applied Microbiology**, Oxford, v.43, n.1-3, p.602-6, 2006.
43. VITALE, C. B.; GROSS, T. L.; WEESE, J. S. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in cat and owner. **Emerging Infectious Diseases**, Atlanta, v.12. p.1998-2000, 2006.

44. WEESE, J. S. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: an emerging pathogen in small animals. **Journal of the American Animal Hospital Association**, Lakewood, v. 41, n.3, p.150–157, 2005.
45. WEESE, J. S.; DICK, H.; WILLEY, B. M. Suspected transmission of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* between domestic pets and humans in veterinary clinics and in the household. **Veterinary Microbiology**, Amsterdam, v.115, n.1-3, p.148–155, 2006.
46. WEESE, J. S.; VAN DUIJKEREN, E. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus pseudintermedius* in veterinary medicine. **Veterinary Microbiology**, Amsterdam. v.140. p.418-429, 2010.

## CAPÍTULO 3

# IDENTIFICAÇÃO MOLECULAR DE *Staphylococcus* spp. RESISTENTES À METICILINA ISOLADOS DA PELE DE CÃES SAUDÁVEIS E COM PIODERMITE

GREYCIELE RODRIGUES DE ALMEIDA<sup>1</sup>, GUIDO FONTGALLAND COELHO LINHARES<sup>2</sup>, OLÍZIO CLAUDINO DA SILVA<sup>3</sup>

Laboratório de Biologia Molecular, Escola de Veterinária e Zootecnia da UFG, Campus II Cx postal 131 CEP: 74001-970.  
Goiânia – GO, Brasil. (062) 3521-1595  
e-mail: [greyci\\_almeid@hotmail.com](mailto:greyci_almeid@hotmail.com)

1. Mestranda em Ciência Animal – Patologia, Clínica e Cirurgia, UFG
2. Professor Adjunto da Escola de Veterinária e Zootecnia da UFG
3. Professor Adjunto da Escola de Veterinária e Zootecnia da UFG

## RESUMO

No ano de 2010 foram estudadas 72 amostras de *Staphylococcus* spp. obtidas de cães atendidos no Hospital Veterinário da Escola de Veterinária e Zootecnia da UFG, 36 isolados de piodermite em variadas fases de evolução e extensão e 36 isolados de pele sadia. Os estafilococos isolados dos animais foram selecionados para a resistência à meticilina (MR) por triagem em agar oxacilina (n=17). Cepas resistentes à oxacilina foram testadas para a presença do gene *mecA* pela reação em cadeia da polimerase (PCR), e sua sensibilidade aos antimicrobianos foi testada usando um método de difusão em agar. Os resultados obtidos mostraram que *Staphylococcus pseudintermedius* resistentes à meticilina (MRSP) (64,7%; 11/17) foi a espécie mais prevalente. Uma cepa de *S. aureus* resistente à meticilina (MRSA) foi isolada da pele de um cão com piodermite. Os antibiogramas revelaram que o antibacteriano mais eficaz, por apresentar mais de 70% de sensibilidade, foi amoxicilina. A multirresistência (resistência a três ou mais classes de antibióticos) foi verificada em 70,6% (12/17) dos isolados. A expressão do gene *mecA* em isolados de *Staphylococcus* spp. oxacilina e multidroga-resistentes pode reduzir a eficiência de outros antibióticos quando esses agentes estão envolvidos na etiologia dos processos infecciosos de pele nos cães. O isolamento de uma cepa de MRSA em um cão com piodermite demonstrou que os cães podem atuar como reservatórios e posteriormente disseminarem esses patógenos na comunidade.

**Palavras-chave:** estafilococos, multirresistência, oxacilina, pioderma

## ABSTRACT

A total of 72 strains of *Staphylococcus* spp. obtained from dogs in the Veterinary Hospital of the School of Veterinary and Animal Science of UFG were studied in 2010, being 36 isolates of pyoderma in varied stages of development and extension and 36 isolates from healthy skin. *Staphylococci* sp. isolated from the animals were screened for methicillin resistance (MR) by oxacillin screening agar (n = 17). Oxacillin-resistant strains were tested for the presence of *mecA* gene by polymerase chain reaction (PCR), and their antimicrobial susceptibility was tested using an agar diffusion method. The results showed that methicillin-resistant *Staphylococcus pseudintermedius* (MRSP) (64.7%) was the most prevalent species. A strain of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) was isolated from the skin of a dog with pyoderma. The antibiograms showed that amoxicillin was the most effective antibacterial, because it presented more than 70% sensitivity. The multidrug resistance (resistance to three or more classes of antibiotics) was observed in 70.6% (12/17) of isolates. The expression of *mecA* in *Staphylococcus* spp. oxacillin and multidrug-resistant strains may reduce the effectiveness of other antibiotics when these agents are involved in the etiology of infectious processes in dog skin. The isolation of a strain of MRSA from the skin of a dog with pyoderma showed that dogs can act as reservoirs and then disseminate these pathogens in the community.

**Keywords:** staphylococci, multidrug resistant, oxacillin, pyoderma

## 1. INTRODUÇÃO

A piodermite pode ser definida como uma inflamação cutânea piogênica associada a infecção bacteriana, onde o *Staphylococcus intermedius* é o agente etiológico mais comumente isolado. É a dermatopatia mais frequentemente diagnosticada na clínica canina, podendo ser classificada como superficial, quando o processo infeccioso não atinge a camada basal da epiderme, ou profunda, quando há destruição dessa camada (PIANTA et al., 2006).

Apesar do *S. intermedius* ser o principal agente etiológico envolvido nas piodermites, outros estafilococos coagulase-positivo (CoPS) tais como *S. schleiferi* e *S. aureus* já foram isolados a partir da pele de cães acometidos por piodermas (BES et al., 2002; FRANK et al., 2003; JONES et al., 2007), embora, estejam mais envolvidos em casos de piodermites recorrentes (GUARDABASSI et al., 2010).

O tratamento da piodermite canina geralmente envolve a terapia antimicrobiana. Os antimicrobianos mais utilizados são as fluoroquinolonas (enrofloxacina, marbofloxacina, difloxacina e orbifloxacina), cefalosporinas de primeira geração (cefalexina e cefadroxil) e amoxicilina associada a ácido clavulânico devido à excelente atividade contra *S. intermedius* e à distribuição na pele (GUARDABASSI et al., 2010). Acima de tudo, a cefalexina tem sido recomendada como primeira escolha na terapia da piodermite canina (MASON & KIETZMANN, 1999).

A terapia sistêmica é recomendada para ambos os casos de piodermites, superficiais e profundas. O tratamento tópico antibacteriano funciona como uma terapia adjuvante, mas a sua eficácia como terapia única também tem sido demonstrada em casos de piodermites superficiais caninas. Os animais que sofrem de infecção estafilocócica na pele têm muitas doenças concomitantes (defeitos de cornificação, alergias, ectoparasitismo, endocrinopatias) que predispõem a persistência da infecção bacteriana ou infecções recorrentes que exigem grandes quantidades de drogas antimicrobianas (IHRKE, 1986; LOEFFLER et al., 2007).

O uso clínico prolongado de antimicrobianos acaba selecionando bactérias resistentes, incluindo o *S. intermedius* (SCHWARZ & NOBLE, 1999;

GUARDABASSI et al., 2004). Atualmente, os microrganismos multirresistentes apresentam particular interesse em medicina humana e veterinária. COOMBS e colaboradores (2004) definiram a multirresistência quando o microrganismo apresenta resistência *in vitro* a pelo menos três diferentes classes de antimicrobianos, além de antibióticos  $\beta$ -lactâmicos.

Ao longo dos últimos anos, alguns estudos realizados em vários países relataram aumento da resistência antimicrobiana entre os estafilococos isolados de infecções caninas, incluindo resistência à meticilina, fluoroquinolonas e vários outros agentes antimicrobianos (COOMBS et al., 2004; MORRIS et al., 2006b; JONES et al., 2007). A resistência *in vitro* à meticilina (ou oxacilina) é usada como um marcador para a alta resistência de *S. aureus* em humanos nas infecções hospitalares. Em estafilococos, essa resistência é conferida por uma baixa afinidade de ligação da proteína que se liga à penicilina (*penicillin-binding protein - PBP2a* ou *PBP2'*) codificada pelo gene *mecA* (NIEMEYER et al., 1996; CHAMBERS, 1997; GORTEL et al., 1999; WAYNE, 2005).

A amplificação de DNA a partir de “primers” ou iniciadores específicos é muito útil para se estabelecer o perfil de resistência das linhagens mediante o uso de diversos antimicrobianos por meio da detecção de genes de resistência em microrganismos isolados de amostras clínicas. Os testes moleculares, dentre eles a reação em cadeia da polimerase (PCR), podem ser usados como referência, inclusive para se avaliar novas técnicas que determinam a referida resistência (TENOVER et al., 1995; NEVES et al., 2007).

A ocorrência de *S. aureus* resistentes à meticilina (MRSA) cada vez mais tem sido documentada em cães e gatos (O'MAHONY et al., 2005; MORRIS et al., 2006a; MORRIS et al., 2006b; BOOST et al., 2007; GRIFFETH et al., 2008). A resistência desse patógeno é preocupante em medicina devido à elevada morbidade e mortalidade em todo o mundo. Os animais, assim como humanos, podem ser portadores assintomáticos de MRSA na superfície da pele e mucosas. Além de apresentarem resistência a todas as penicilinas e cefalosporinas, essas bactérias são, com frequência, resistentes a fluoroquinolonas, aminoglicosídeos, tetraciclina, macrolídeos e lincosaminas (GUARDABASSI et al., 2010).

*S. intermedius* resistentes à meticilina (MRSI) tem sido detectado em cães e gatos de vários países (Eslovênia, Estados Unidos, Canadá, Alemanha e Suécia) (AUTHIER et al., 2006; LOEFFLER et al., 2007; BOOST et al., 2007;

GRIFFETH et al., 2008; GUARDABASSI et al., 2010). De surgimento recente, os *S. intermedius* resistentes a fluorquinolonas ou cefalosporinas ainda são pouco frequentes. Cepas com alto nível de resistência às cefalosporinas podem ser consideradas como MRSI, desde que a resistência seja mediada pelo mesmo gene (*mecA*) encontrado em MRSA (GORTTEL et al., 1999; JONES et al., 2007).

Alguns patógenos emergentes associados a otite externa e piodermite recorrente, como o *S. schleiferi* em cães, têm sido relatados por apresentarem resistência à meticilina. No entanto, *S. schleiferi* apresenta menor resistência aos antimicrobianos de outras classes, em comparação com *S. intermedius* e *S. aureus*. A resistência à meticilina foi também descrita em *S. pseudintermedius*, uma nova espécie associada a pequenos animais. Relatórios recentes indicaram que as cepas identificadas fenotipicamente como *S. intermedius* podem incluir não só o *S. intermedius* propriamente dito, como também duas novas espécies de estafilococos coagulase-positivo, *S. pseudintermedius* e *S. delphini*. De fato, a maioria deles foi identificada como estirpes de *S. pseudintermedius* e não *S. intermedius*, demonstrando que aquele é a causa comum de piodermite canina e não este. Assim, o patógeno canino pode ser reclassificado como *S. pseudintermedius* (BANNOEHR et al., 2007; BANNOEHR et al., 2009; FRANK et al., 2003; SASAKI et al., 2007; GUARADBASSI et al., 2010).

O aumento da resistência aos antimicrobianos entre os estafilococos e uma melhor compreensão do seu potencial zoonótico destaca a importância da correta identificação das espécies de MRS por ambos, médicos veterinários e laboratórios de diagnóstico. Dessa forma, o objetivo deste estudo foi determinar a frequência de resistência à oxacilina e suscetibilidade a antimicrobianos de estafilococos isolados provenientes da pele de cães saudáveis e com piodermite.

## **2. MATERIAL E MÉTODOS**

### **2.1 Local, período e seleção das amostras**

O isolamento dos *Staphylococcus* spp. foi realizado no Laboratório de Microbiologia da Escola de Veterinária e Zootecnia da Universidade Federal de Goiás, no período de setembro a novembro de 2010, utilizando-se suabes estéreis colhidos a partir da pele de cães saudáveis e cães com piodermite. Ao

total, foram realizadas 90 colheitas de 90 cães distintos, todos adultos e independente de raça ou sexo, assim distribuídos: 40 cães com quadro clínico de piodermite e 50 cães saudios.

A etapa de colheita de material foi realizada no Hospital Veterinário da Escola de Veterinária e Zootecnia da Universidade Federal de Goiás no período de setembro a novembro de 2010, empregando-se animais atendidos na rotina hospitalar e após aprovação do projeto de pesquisa pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal de Goiás (protocolo Nº: 103/10) (Anexo 1).

Para o estudo foram obtidos 36 isolados de *Staphylococcus* spp. provenientes da pele de cães que apresentaram quadro clínico de piodermite e 36 isolados da pele de cães saudáveis.

A identificação molecular das espécies de *Staphylococcus* spp. resistentes à meticilina foi realizada no Laboratório de Biologia Molecular da Escola de Veterinária e Zootecnia da Universidade Federal de Goiás, no período de novembro a dezembro de 2010.

## 2.2 Suscetibilidade à oxacilina

Para detectar isolados de estafilococos resistentes à oxacilina foi utilizado o ágar *screening*, no qual as amostras foram semeadas em ágar Mueller-Hinton suplementado com NaCl 4% e oxacilina 6µg/mL (De GIUSTI, 1999; TERASAWA, 2006).

O inóculo foi preparado a partir do crescimento das colônias isoladas, após incubação de 24 horas em caldo de cultura, até a escala de 0,5 de McFarland (WAYNE, 2005), semeando-se então, em placa de ágar suplementado. As placas foram incubadas durante 24 horas a 37°C, sendo realizadas, posteriormente, avaliações para verificar a ocorrência de qualquer crescimento bacteriano, cuja presença indicou resistência fenotípica a esse antimicrobiano (De GIUSTI, 1999; TERASAWA, 2006).

O crescimento de estafilococos nessa placa especial de ágar sugeriu que o isolado era portador do gene *mecA*.

### 2.3 Extrações de DNA

As amostras foram inoculadas em meio líquido TSB (*Trypticase Soy Broth*) contendo NaCl 5% e incubadas a 37°C por 24h, posteriormente, cerca de 1 mL de cultura foi transferido para um microtubo de 1,5 mL.

O DNA foi extraído empregando-se o *kit* comercial *Illustra Bacteria GenomicPrep Mini Spin* (GE-Healthcare), segundo instruções do fabricante. Os eluatos obtidos no final das extrações foram armazenados a -20°C para posteriormente serem utilizados nas reações de PCR.

### 2.4 Oligonucleotídeos utilizados para amplificação do fragmento do gene *mecA*

A amplificação dos fragmentos de DNA foi feita utilizando-se os seguintes pares de oligonucleotídeos iniciadores sintéticos: *primer mecA* 1282 (5' AAA ATC GAT GGT AAA GGT TGG C 3') e *primer mecA* 1793 (5' AGT TCT GCA GTA CCG GAT TTG C 3'), podendo produzir um fragmento de 533 pb (MERLINO et al., 2002).

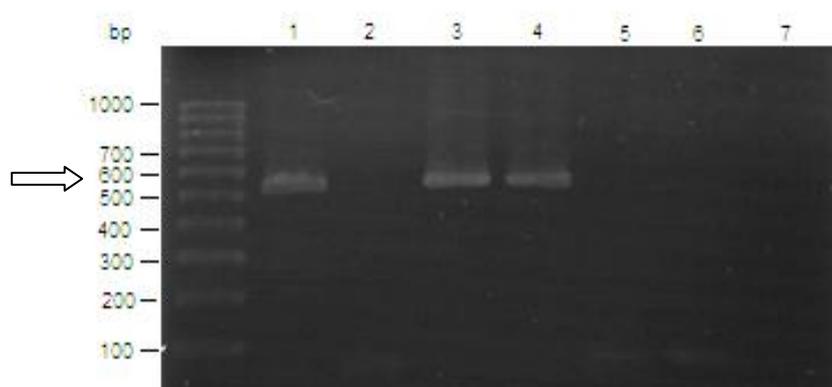
### 2.5 Reações de PCR

As reações foram realizadas segundo MALUTA (2008) com algumas modificações. O *mix* de PCR foi preparado utilizando-se: 2 µL do eluato (DNA extraído previamente); 5 µL de tampão de PCR 10x (KCl 50mM, TRIS-HCl 200 mM, pH 8,4); 5U de *Taq* DNA polimerase; 1 µL de dNTP 10 mM; 2 µL de MgCl<sub>2</sub> 50 mM; 0,5 µL de cada *primer* (20µM) e água milli Q estéril até completar o volume da reação em 50 µL.

O processo de amplificação foi realizado em termociclador com as seguintes condições de tempo e temperatura: i) 2min/94°C; ii) 40 ciclos de 1min/94°C, 2min/52°C e 2min/72°C; iii) uma etapa de extensão final de 5min/72°C e iv) manutenção das amostras sob refrigeração a 5°C. Terminada a reação, os produtos foram submetidos à análise pela eletroforese em gel de agarose a 1,2% com brometo de etídio a 1,5% em tampão TBE pH 8,4 (89mM Tris; 89mM ácido bórico; 2mM EDTA), sob voltagem constante (90v) por 40min e visualizados sob luz ultra-violeta (UV).

### 3. RESULTADOS

A partir de 72 isolados de *Staphylococcus* spp. da pele de cães, sendo 36 amostras da pele de animais com quadro clínico de piодermite (Grupo 1) e 36 isolados da pele sadia (Grupo 2), obteve-se 17 (23,6%) isolados de *Staphylococcus* spp. resistentes à metilina (MRS) pela técnica fenotípica de ágar screen. Os mesmos 17 isolados apresentaram o gene *mecA*, de resistência à oxacilina, pela técnica da PCR. Na Figura 1 observa-se a amplificação do fragmento de 533 pb do gene *mecA* em dois isolados de MRS.



**FIGURA 1** - Resultado após a corrida eletroforética em gel de agarose do produto de 533pb (seta) da PCR de dois isolados *mecA* positivos. 1 – controle positivo; linhas 2 a 6: amostras de *Staphylococcus* spp. linhas 3 e 4: amostras positivas; linha 7: controle negativo

Verificou-se a frequência das espécies isoladas de *Staphylococcus* spp. resistentes à oxacilina, por grupo e total. No grupo de sádios obteve-se 11 isolados, assim distribuídos: *S. pseudintermedius* 63,6% (7/11); *S. epidermidis* 18,2% (2/11) e outros estafilococos coagulase-negativo (OSCoN) 18,2% (2/11). No grupo de cães com piодermite obteve-se seis isolados: *S. pseudintermedius* 66,7% (4/6); *S. aureus* 16,7% (1/6); *S. epidermidis* 16,7% (1/6). No total, foram isoladas 11 (64,7%) cepas de *S. pseudintermedius* resistentes à metilina (MRSPI) e uma (5,9%) cepa de *S. aureus* resistente à metilina (MRSA) (Tabela 1).

O programa utilizado para análise dos dados foi SPSS versão 15.0 for Windows. O teste qui-quadrado ( $\chi^2$ ) (nível de significância  $\alpha < 0,05$ ) foi utilizado para comparar a frequência dos *Staphylococcus* spp. entre os dois grupos, porém não houve diferença significativa ( $p=0,402$ ).

**TABELA 1** – Frequência das espécies de *Staphylococcus* spp. resistentes à oxacilina, isoladas da pele de cães com piodermite e aparentemente saudáveis

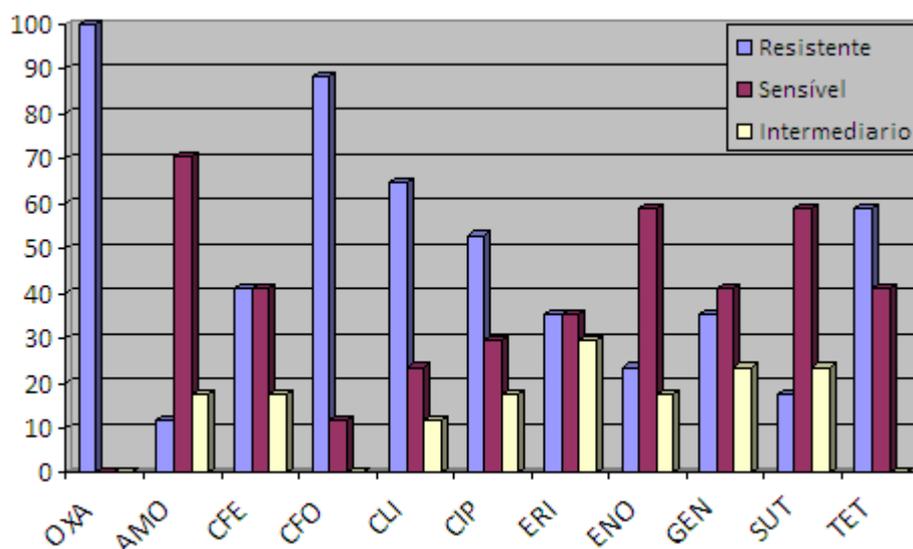
| Isolado                    | Grupo 1<br>n(%) | Grupo 2<br>n(%) | Total<br>n(%)   |
|----------------------------|-----------------|-----------------|-----------------|
| <i>S. pseudintermedius</i> | 4 (66,7)        | 7 (63,6)        | 11 (64,7)       |
| <i>S. epidermidis</i>      | 1 (16,7)        | 2 (18,2)        | 3 (17,6)        |
| OSCoN                      | 0 (0)           | 2 (18,2)        | 2 (11,8)        |
| <i>S. aureus</i>           | 1 (16,7)        | 0 (0)           | 1 (5,9)         |
| <b>Total n(%)</b>          | <b>6 (100)</b>  | <b>11 (100)</b> | <b>17 (100)</b> |

Grupo 1 - isolados de cães com piodermite; Grupo 2 - isolados de cães com pele saudável; OSCoN - outros estafilococos coagulase negativo

A suscetibilidade a antimicrobianos foi avaliada pelo método de difusão em ágar estabelecido pelo *Clinical and Laboratory Standards Institute* (2010), observando os seguintes resultados: Amoxicilina 70,6% (12/17); Enrofloxacin 58,8% (10/17); Sulfametazol-trimetoprim 58,8% (10/17); Cefalexina 41,2% (7/17); Tetraciclina 41,2% (7/17); Gentamicina 41,2% (7/17); Eritromicina 35,3% (6/17); Ciprofloxacina 29,4% (5/17); Clindamicina 23,5% (4/17); Cefoxitina 11,8% (2/17).

Para a resistência: Oxacilina 100% (17/17); Cefoxitina 88,2% (15/17); Clindamicina 64,7% (11/17); Tetraciclina 58,8% (10/17); Ciprofloxacina 52,9% (9/17); Cefalexina 41,2% (7/17); Gentamicina 35,3% (6/17); Eritromicina 35,3% (6/17); Enrofloxacin 23,5% (4/17); Sulfametazol-trimetoprim 17,6% (3/17); Amoxicilina 11,8% (2/17).

Os antibióticos que mostraram maior inibição do crescimento bacteriano (50% ou mais) foram: Amoxicilina (70,6%); Enrofloxacin (58,8%) e Sulfametazol-trimetoprim (58,8%). Os MRS apresentaram maior resistência frente a Cefoxitina (88,2%), Clindamicina (64,7%); Tetraciclina (58,8%) e Ciprofloxacina (52,9%). A amoxicilina foi o único  $\beta$ -lactâmico que apresentou alta suscetibilidade (70,6%) (Figura 2).



**FIGURA 2** – Descrição da suscetibilidade antimicrobiana de MRS (%). OXA-oxacilina; AMO-amoxicilina; CFE-cefalexina; CFO- cefoxetina; CLI-clindamicina; CIP-ciprofloxacina; ERI-eritromicina; ENO-enrofloxacina; GEN-gentamicina; SUT-sulfametazol + trimetoprim; TET-tetraciclina

Pôde-se observar o perfil de resistência a múltiplos antimicrobianos e a identificação das espécies das cepas de MRS isoladas de cães. A multirresistência (resistência a três ou mais classes de antibióticos) foi verificada em 70,6% (12/17) dos isolados. Um isolado de *S. pseudintermedius* apresentou resistência a quase todos os antibióticos testados. Entre as cepas que apresentaram multirresistência (70,6%), 8,3% (1/12) foram resistentes a uma classe dos antibióticos de escolha nas piodermites (penicilinas, fluoroquinolonas e cefalosporinas), 16,7% (2/12) foram resistentes a duas classes, e 75% (9/12) foram resistentes às três classes, concomitantemente. Cinco isolados (dois de OSCoN\*\* e três de *S. pseudintermedius*\*\*) apresentaram resistência à oxacilina, porém sem perfil de multirresistência, pois só apresentaram resistência a uma ou duas classes de antimicrobianos (Quadro 1).

Não houve diferença significativa entre os grupos para cada antibiótico testado.

**QUADRO 1** – Perfil de resistência a múltiplos antimicrobianos em 17 isolados de *Staphylococcus* spp. resistentes à oxacilina

| Nº | Grupo | Espécie do isolado de <i>Staphylococcus</i> sp | Antibiotipo   |
|----|-------|--|---|
| 1  | 1     | <i>S. aureus</i>                               | OXA <sup>a</sup> , CFE <sup>b</sup> , CFO <sup>c</sup> , CLI <sup>d</sup> , CIP <sup>e</sup> , ERI <sup>f</sup> |
| 2  | 1     | <i>S. epidermidis</i>                          | OXA, CFE, CFO, CLI, CIP, GEN <sup>g</sup>   |
| 3  | 1     | <i>S. pseudintermedius</i>                     | OXA, AMO <sup>h</sup> , CFO, CLI, CIP, GEN  |
| 4  | 1     | <i>S. pseudintermedius</i>                     | OXA, CFO, CLI, CIP  |
| 5  | 1     | <i>S. pseudintermedius</i>                     | OXA, CFO, CLI, CIP, ERI, GEN, TET <sup>i</sup>  |
| 6  | 1     | <i>S. pseudintermedius</i>                     | OXA, CFE, CFO, CLI, CIP, ENO <sup>j</sup> , SUT <sup>k</sup> , TET  |
| 7  | 2     | <i>S. epidermidis</i>                          | OXA, CLI, TET   |
| 8  | 2     | <i>S. epidermidis</i>                          | OXA, CFO, GEN, TET  |
| 9  | 2     | <i>S. pseudintermedius</i>                     | OXA, CFO, CLI, CIP, ERI, ENO, SUT, TET  |
| 10 | 2     | <i>S. pseudintermedius</i> *                   | OXA, AMO, CFE, CFO, CLI, CIP, ERI, ENO, GEN, SUT, TET   |
| 11 | 2     | <i>S. pseudintermedius</i>                     | OXA, CFE, CFO, ERI, GEN   |
| 12 | 2     | <i>S. pseudintermedius</i>                     | OXA, CFO, ERI, ENO, TET   |
| 13 | 2     | <i>S. pseudintermedius</i> **                  | OXA, TET  |
| 14 | 2     | <i>S. pseudintermedius</i> **                  | OXA, CFE, CFO, TET  |
| 15 | 2     | <i>S. pseudintermedius</i> **                  | OXA, CFO, CIP   |
| 16 | 2     | OSCoN**  | OXA, CFO, CLI   |
| 17 | 2     | OSCoN**  | OXA, CFE, CFO   |

Número 1-12: isolados multirresistentes; Grupo 1 - isolados de cães com piodermite; Grupo 2 - isolados de cães com pele saudável; OSCoN - outros estafilococos coagulase-negativo; <sup>a</sup>oxacilina; <sup>b</sup>cefalexina; <sup>c</sup>cefoxitina; <sup>d</sup>clindamicina; <sup>e</sup>ciprofloxacina; <sup>f</sup>eritromicina; <sup>g</sup>gentamicina; <sup>h</sup>amoxicilina; <sup>i</sup>tetraciclina; <sup>j</sup>enrofloxacina; <sup>k</sup>sulfametazol-trimetoprim; \*resistência a todos os antibióticos testados; \*\*resistência a oxacilina, sem multirresistência

#### 4. DISCUSSÃO

No presente trabalho obteve-se 23,6% (17/72) de isolados de *Staphylococcus* spp. resistentes à meticilina (MRS). Essa resistência foi detectada tanto pela técnica fenotípica de ágar *screening* quanto pela técnica da PCR. Em seu trabalho, BOOST e colaboradores (2007) detectaram 15 isolados MRS, porém, cinco não possuíam o gene *mecA* frente a análise genética (PCR). Os mesmos autores afirmaram que o falso-positivo na técnica fenotípica ocorreria por

vários motivos, dentre eles a hiper produção de  $\beta$ -lactamases, enfatizando a importância de se confirmarem os testes fenotípicos para resistência à meticilina, contudo não foram observados falsos-positivos neste trabalho.

O *S. pseudintermedius* foi a espécie mais frequentemente isolada (91,7%) dentre os SCoP. De seis cães com piодermite que tinham cepas de MRS, quatro (66,7%) apresentaram como agente etiológico da infecção a espécie *S. pseudintermedius*. Essa frequência foi maior do que a observada pelos pesquisadores SASAKI e colaboradores (2007) e HANSELMAN e colaboradores (2008), que relataram a existência de MRSP isolados da pele de cães saudáveis e afetados. Esta espécie tem sido previamente documentada na literatura como sendo a espécie de maior prevalência encontrada na pele de cães saudáveis e apontada como a mais frequente nos casos de piодermite canina, como também constataram BIBERSTEIN & HIRSH (2003), PIANTA (2006), GRIFFETH et al. (2008), VANNI et al. (2009), FUKATA et al. (2010) e GUARDABASSI et al. (2010).

Embora o isolamento da MRSP seja pouco frequente em humanos, a transmissão dos animais para os seres humanos já foi descrita por CHUANG et al. (2010) e WEESE & VAN DUIJKEREN (2010). Mais importante, as cepas MRSP podem servir como reservatórios de genes de resistência antimicrobiana que podem, eventualmente, ser transferidos para outras espécies de bactérias como *S. aureus*, uma vez que a localização de muitos desses genes de resistência são elementos móveis.

No presente estudo, uma cepa (5,9%) de *S. aureus* resistente à meticilina (MRSA) foi isolada da pele de um cão com piодermite. Um dado interessante, haja vista que FUKATA e colaboradores (2010) não conseguiram isolar MRSA de cães com piодermite. Assim como no presente estudo, outros autores, tais como VAN DUIJKEREN et al. (2004) na Holanda, VENGUST et al. (2006) na Eslovênia e BAPTISTE et al. (2005) e BAGCIGIL et al. (2007) na Inglaterra e MALUTA (2008) no Brasil, só conseguiram isolar MRSA a partir de animais com infecções estafilocócicas.

A presença do gene *mecA* em *S. pseudintermedius* e *S. aureus* proveniente de amostras animais sugere a probabilidade de transferência horizontal de genes entre espécies distintas, conforme descrito por COELHO e colaboradores (2007). WIELDERS e colaboradores (2002) apresentaram dados

moleculares que suportaram a teoria de que a transferência do gene *mecA* entre linhagens de *Staphylococcus* spp. poderia ocorrer, permitindo o aparecimento de clones de *S. aureus* resistentes à meticilina (MRSA) disseminados pelo mundo, e de que essa disseminação poderia ser favorecida pela pressão seletiva oriunda do uso indiscriminado de antimicrobianos.

Os animais, assim como humanos, podem ser portadores assintomáticos de MRSA na superfície da pele e mucosas. Apesar da frequência de colonização por MRSA ter sido baixa, o transporte de cepas MRSA por animais de companhia na comunidade é um problema grave de saúde pública, pois essas cepas podem se tornar endêmicas na população animal. Como essa disseminação ocorreu não é completamente compreendida, como observaram PERRETEN e colaboradores (2010) e RUSCHER e colaboradores (2010), porém a colonização de animais saudáveis pode ser uma forma importante de transferência de patógenos de animal para animal.

Além de apresentarem resistência às penicilinas e cefalosporinas, os MRS, com frequência, são resistentes a fluorquinolonas, aminoglicosídeos, tetraciclina, macrolídeos e lincosaminas, corroborando as afirmações de GUARDABASSI e colaboradores (2010). Os macrolídeos são amplamente utilizados na medicina veterinária, inclusive para o tratamento de infecções causadas por cepas de *S. intermedius* resistentes à penicilina e em pacientes alérgicos aos  $\beta$ -lactâmicos. No presente estudo, observou-se resistência elevada à clindamicina (64,7%) e moderada a eritromicina (35,3%), confirmando dados obtidos por BOERLIN e colaboradores (2001) e OLIVEIRA e colaboradores (2006).

A resistência à tetraciclina foi elevada, indicando ser reflexo do uso excessivo desse antimicrobiano na medicina veterinária, especialmente para tratamento das afecções dermatológicas. Cerca de 63,3% (7/11) das cepas de MRSP mostraram resistência à tetraciclina, um percentual mais elevado que o descrito por SHIMIZU e colaboradores (2001) e OLIVEIRA e colaboradores (2006).

Para os MRS, observou-se baixa resistência a enrofloxacina (23,5%), e resistência moderada a ciprofloxacina (52,9%). Muitos trabalhos mostraram a eficácia desses antimicrobianos contra cepas isoladas de amostras de origem canina como relataram JUNCO & BARRASA (2002), HOEKSTRA & PAULTON

(2002) e GRIFFETH et al. (2008). Entretanto, é importante alertar para o uso indiscriminado de fluorquinolonas, especialmente a enrofloxacina, que poderia resultar em aumento da taxa de resistência.

A mais elevada taxa de resistência foi evidenciada frente à cefoxitina (88,2%) do grupo dos  $\beta$ -lactâmicos. Cepas com alto nível de resistência às cefalosporinas podem ser consideradas como MRSP, desde que a resistência seja mediada pelo mesmo gene (*mecA*) encontrado em MRSA, como afirmaram JONES e colaboradores (2007) e GUARDABASSI e colaboradores (2010). De fato, os MRSP apresentaram resistência à cefoxetina (90,9%) e cefalexina (36,4%). Em contrapartida, a mais elevada suscetibilidade dos MRS foi apresentada frente à amoxicilina (70,6%), um  $\beta$ -lactâmico semi-sintético. Este resultado difere do encontrado por GRIFFETH e colaboradores (2008), que não encontraram cepas MRS suscetíveis a amoxicilina isoladas de cães com infecção de pele. Segundo OLIVEIRA e colaboradores (2006), as variações descritas no perfil de resistência aos  $\beta$ -lactâmicos poderiam ser atribuídas às variações geográficas e aos hábitos de vida dos animais no tocante ao maior ou menor acesso às clínicas veterinárias e, conseqüentemente, aos antimicrobianos utilizados.

A frequência de isolados MRS verificada no grupo dos animais sadios (30,6%) foi maior que a observada no grupo de animais com piodermite (16,7%), porém não houve diferenças significativas entre os dois grupos ( $p = 0,402$ ). Estes dados indicam que esses animais podem atuar como reservatórios para a disseminação dos patógenos na comunidade. A ausência de dados sobre a frequência e suscetibilidade aos antimicrobianos de MRS em cães com quadro clínico de piodermite no Brasil dificulta a comparação do nível de frequência encontrado neste estudo.

## 5. CONCLUSÃO

*S. pseudintermedius* é a espécie de *Staphylococcus* spp. mais frequente dentre os estafilococos resistentes à metilina (MRS) dos casos de piodermite canina estudados.

O isolamento de uma cepa de MRSA demonstra que os cães podem atuar como reservatórios e posteriormente disseminarem esses patógenos na comunidade.

Os resultados apontam a expressão do gene *mecA* em todos os isolados de *Staphylococcus* spp. oxacilina e multidroga-resistentes.

## REFERÊNCIAS

1. AUTHIER, S.; PAQUETTE, D.; LABRECQUE, O.; MESSIER, S. Comparison of susceptibility to antimicrobials of bacterial isolates from companion animals in a veterinary diagnostic laboratory in Canada between 2 time points 10 years apart. **The Canadian Veterinary Journal**, Bethesda, v.47, n.8, p.774-778, 2006.
2. BAGCIGIL, F. A.; MOODLEY, A.; BAPTISTE, K. E.; JENSEN, V. F.; GUARDABASSI, L. Occurrence, species distribution, antimicrobial resistance and clonality methicillin- and erythromycin-resistant staphylococci in the nasal cavity of domestic animals. **Veterinary Microbiology**, Amsterdam, v.121, n.3-4, p.307-315, 2007.
3. BANNOEHR, J.; BEN ZAKOUR, N. L.; WALLER, A. S.; GUARDABASSI, L.; THODAY, K. L.; VAN DEN BROEK, A. H.; FITZGERALD, J. R. Population genetic structure of the *Staphylococcus intermedius* group: insights into agr diversification and the emergence of methicillin-resistant strains. **The Journal of Bacteriology**, Washington DC, Estados Unidos. v.189, n.23, p.8685-8692, 2007.
4. BANNOEHR, J.; FRANCO, A.; IURESCIA, M.; BATTISTI, A.; FITZGERALD, J. R. Molecular diagnostic identification of *Staphylococcus pseudintermedius*. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington DC, v.47, n.2, p.469-471, 2009.
5. BAPTISTE, K. E.; WILLIAMS, K.; WILLIAMS, N. J.; WATTRET, A.; CLEGG, P. D.; DAWSON, S.; CORKILL, J. E.; O'NEILL, T.; HART, C. A. Methicillin-resistant *Staphylococci* in Companion Animals. **Emerging Infectious Diseases**, Atlanta. v.11, n.12, p.1942-1944-1938, 2005.
6. BES, M.; GUERIN-FAUBLEE, V.; FRENEY, J.; ETIENNE, J. Isolation of *Staphylococcus schleiferi* subspecies *coagulans* from two cases of canine pyoderma. **Veterinary Record**, Londres, v.150, n.15, p.487-488, 2002.
7. BIBERSTEIN, E. L.; HIRSH, D. C. In: HIRSH, D. C.; ZEE, Y. C. **Microbiologia Veterinária**. 2.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2003. cap.21. 108-112p.
8. BOERLIN, P.; BURNENS, A. P.; FREY, J. Molecular epidemiology and genetic linkage of macrolide and aminoglycoside resistance in *Staphylococcus*

- intermedius* of canine origin. **Veterinary Microbiology**, Amsterdam, v.79, p.155-169, 2001.
9. BOOST, M. V.; O'DONOGHUE, M. M.; SIU, K. H. Characterisation of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates from dogs and their owners. **Clinical Microbiology and Infection**, Marseille, v.13, p.731-733, 2007.
  10. CHAMBERS, H. F. Methicillin resistance in staphylococci: molecular and biochemical basis and clinical implications. **Clinical Microbiology**, Washington, v.10, n.4, p.781-791, 1997.
  11. CHUANG, C. Y.; YANG, Y. L.; HSUEH, P. R.; LEE, P. I. Catheter-related bacteremia caused by *Staphylococcus pseudintermedius* refractory to antibiotic-lock therapy in a hemophilic child with dog exposure. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington DC, v.48, n.4, p.1497-1498, 2010.
  12. CLSI. **Clinical and Laboratory Standards Institute**. Table 2C. Zone Diameter and MIC Interpretative Standards for *Staphylococcus* spp., 2010.
  13. COELHO, S. M. O.; MORAES, R. A. M.; SOARES, L. C.; PEREIRA, I. A.; GOMES, L. P.; SOUZA, M. M. S. Mapeamento do perfil de resistências detecção do gene *mecA* em *Staphylococcus aureus* e *Staphylococcus intermedius* oxacilina-resistentes isolados de espécies humanas e animais. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.37, n.1, p.195-200, 2007.
  14. COOMBS, G. W.; NIMMO, G. R.; BELL, J. M. Genetic diversity among community methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains causing outpatient infections in Australia. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington DC, v.42, p.4735-43, 2004.
  15. De GIUSTI, M. Phenotypic detection of nosocomial *mecA*-positive coagulase-negative staphylococci from neonates. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, Oxford, v.44, n.3, p.351-358, 1999.
  16. FRANK, L. A.; KANIA, S. A.; HNILICA, K. A.; WILKES, R. P.; BEMIS, D. A. Isolation of *Staphylococcus schleiferi* from dogs with pyoderma. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, Schaumburg, v.222, p.451-4, 2003.
  17. FUKATA, T.; KAWAKAMI, T.; SHIBATA, S.; MURAYAMA, N.; NAGATA, M.; NISHIFUJI, K.; IWASAKI, T. Antimicrobial susceptibility and methicillin resistance in *Staphylococcus pseudintermedius* and *Staphylococcus schleiferi* subsp. *coagulans* isolated from dogs with pyoderma in Japan. **The Journal of Veterinary Medical Science**, Tokyo, v.72, n.12, p.1615-1619, 2010.
  18. GORTEL, K.; CAMPBELL, K.L.; KAKOMA, I.; WHITTEM, T.; SCHAEFFER, D.J.; WEISIGER, R.M. Methicillin resistance among staphylococci isolated from dogs. **American Journal of Veterinary Research**, Chicago, v.60, n.12, p.1526-1530, 1999.

19. GRIFFETH, G. C.; MORRIS, D. O.; ABRAHAM, J. L.; SHOFER, F. S.; RANKIN, S. C. Screening for skin carriage of methicillin-resistant coagulase-positive staphylococci and *Staphylococcus schleiferi* in dogs healthy and inflamed skin. **Veterinary Dermatology**, Oxford, v.19, n.3, p.142-149, 2008.
20. GUARDABASSI, L.; HOUSER, G. A.; FRANK, L. A.; PAPICH, M. G. Orientações para o uso de antimicrobianos em cães e gatos. In: GUARDABASSI, L.; JENSEN, L. B.; KRUSE, H. **Guia de antimicrobianos em veterinária**. 1.ed. Porto Alegre: Artmed, 2010. cap.11. 224-246p.
21. GUARDABASSI, L.; SCHWARZ, S.; LLOYD, D. H. Pet animals as reservoirs of antimicrobial-resistant bacteria. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, Oxford, v.54, p.321-322, 2004.
22. HANSELMAN, B. A.; KRUTH, S.; WEESE, J. S. Methicillin-resistant staphylococcal colonization in dogs entering a veterinary teaching hospital. **Veterinary Microbiology**, Amsterdam, v.126, p.277-281, 2008.
23. HOEKSTRA, K. A.; PAULTON, R. J. L. Clinical prevalence and antimicrobial susceptibility of *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus intermedius* in dogs. **Journal of Applied Microbiology**, Oxford, v.93, n.3, p.406-413, 2002.
24. IHRKE, P. J. Antibacterial therapy in dermatology. In: KIRK, R. W, 10.ed. **Current Veterinary Therapy, IX**. Philadelphia, PA: W.B. Saunders. 1986. 566-71p.
25. JONES, R. D.; KANIA, S. A.; ROHRBACH B. W. Prevalence of oxacillin- and multidrug-resistant staphylococci in clinical samples from dogs: 1772 samples (2001-2005). **Journal of the American Veterinary Medicine Association**, Schaumburg, v.230. p.221-227, 2007.
26. JUNCO, M. T. T.; BARRASA, J. T. M. Identification and antimicrobial susceptibility of coagulase positive *Staphylococci* isolated from healthy and dogs suffering from otitis externa. **Journal of Veterinary Medicine B**, v.49, p.419-423, 2002.
27. LOEFFLER, A.; LINEK, M.; MOODLEY, A. First report of multi-resistant, mecA-Positive *Staphylococcus intermedius* in Europe: 12 cases from veterinary dermatology referral clinic in Germany. **Veterinary Dermatology**, Oxford. v.18. p.412-421, 2007.
28. MALUTA, R. P. **Isolamento e perfil de suscetibilidade a antimicrobianos de cepas de estafilococos resistentes à em um hospital veterinário de ensino no Brasil**. Jaboticabal, 2008. 44f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agropecuária) – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, SP.
29. MASON, I. S.; KIETZMANN, M. Cephalosporins-pharmacological basis of clinical use in veterinary dermatology. **Veterinary Dermatology**, Oxford. v.10. p.187-192, 1999.

30. MERLINO, J.; WATSON, J.; ROSE, B.; BEARD-PEGLER, M.; GOTTLIEB, T.; BRADBURY, R.; HARBOUR, C. Detection and expression of methicillin/oxacillin resistance in multidrug-resistant *Staphylococcus aureus* in Central Sydney, Australia. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, Oxford, v.49. n.5. p.793-801, 2002.
31. MORRIS, D. O.; MAULDIN, E. A.; O'SHEA, K. Clinical, microbiological, and molecular characterization of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infections of cats. **American Journal of Veterinary Research**, Chicago. v.67. p.1421-1425, 2006a.
32. MORRIS, D. O.; ROOK, K. A.; SHOFER, F. S. Screening of *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus intermedius*, and *Staphylococcus schleiferi* isolates obtained from small companion animals for antimicrobial resistance: a retrospective review of 749 isolates (2003–2004). **Veterinary Dermatology**, Oxford, v.17. p.332–7, 2006b.
33. NEVES, M. C.; RÓSSI JUNIOR, O. D.; ALVES, E. C. C.; LEMOS, M. V. F. Detecção de genes de resistência antimicrobiana em cromossomos e plasmídeos de *Staphylococcus* spp.. **Arquivos do Instituto Biológico**, São Paulo, v.77, n.3, p.207-213, 2007.
34. NIEMEYER D. M.; PUCCI, M.J.; THANASSI, J.A.; SHARMA, V.K.; ARCHER, V.L. Role of *mecA* transcriptional regulation in the phenotypic expression of methicillin resistance in *Staphylococcus aureus*. **Journal of Bacteriology**, Washington, v.178, n.18, p.5464-5471, 1996.
35. OLIVEIRA, L. C.; BRILHANTE, R. S. N.; CUNHA, A. M. S.; CARVALHO, C. B. M. Perfil de isolamento microbiano em cães com otite média e externa associadas. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia-UFMG**, Minas Gerais, v.58. n.6. p.1009-1017, 2006.
36. O'MAHONY, R.; ABBOTT, Y.; LEONARD, F. C. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) isolated from animals and veterinary personnel in Ireland. **Veterinary Microbiology**, Amsterdam, v.109. p.285-296, 2005.
37. PERRETEEN, V.; KADLEC, K.; SCHWARZ, S.; GRONLUND-ANDERSSON, U.; GREKO, C.; MOODLEY, A.; KANIA, S.; FRANK, L.; BEMIS, D.; FRANCO, A.; IURESCIA, M.; BATTISTI, A.; DUIM, B.; WAGENAAR, J. A.; VAN DUIJKEREN, E.; WEESE, S.; FITZGERALD, J.; ROSSANO, A.; GUARDABASSI, L. Clonal spread of methicillin-resistant *Staphylococcus pseudintermedius* in Europe and North America: an international multicentre study. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, Oxford, v.65. n.2. p.1145-1154, 2010.
38. PIANTA, C.; OLIVEIRA, J.; FALLAVENA, L. C. B.; ESMERALDINO, A. T.; SILVA Jr, V. B. Pioderma estafilocócico canino: identificação das espécies e sensibilidade aos antimicrobianos. **Revista de Ciências Agroveterinárias**, Lage. v.5. p.60-63, 2006.

39. RUSCHER, C.; LÜBKE-BECKER, A.; SEMMLER, T.; WLEKLINSKI, C. G.; PAASCH, A.; ŠOBA, A.; STAMM, I.; KOPP, P.; WIELER, L. H.; WALTHER, B. Widespread rapid emergence of a distinct methicillin- and multidrug-resistant *Staphylococcus pseudintermedius* (MRSP) genetic lineage in Europe. **Veterinary Microbiology**, Amsterdam, v.144. n.3-4. P.340-346, 2010.
40. SASAKI, T.; KIKUCHI, K.; TANAKA, Y.; TAKAHASHI, N.; KAMATA, S.; HIRAMATSU, K. Reclassification of phenotypically identified *Staphylococcus intermedius* strains. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington DC, Estados Unidos. v.45. p.2770-2778, 2007.
41. SCHWARZ, S; NOBLE, W. C. Aspects of bacterial resistance to antimicrobials used in veterinary dermatological practice. **Veterinary Dermatology**, Oxford, v.10. p.163–76, 1999.
42. SHIMIZU, A.; WAKITA, Y.; NAGASE, S. Antimicrobial susceptibility of *Staphylococcus intermedius* isolated from healthy and diseased dogs. **The Journal of Veterinary Medical Science**, Tokio, v.63, n.3, p.357-360, 2001.
43. TENOVER, F. C.; POPOVIC, T.; OLSVIK, O. Genetic methods for detecting antibacterial resistance genes. In: MURRAY, P. R. **Manual of clinical microbiology**. 6.ed. Washington: American Society for Microbiology, 1995. 1368-1378p.
44. TERASAWA, L. B. **Caracterização da resistência à oxacilina em estafilococos coagulase negativa isolados no Hospital de Clínicas de Curitiba**. Paraná, 2006. 109f. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas e da Saúde) – Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, PR.
45. VAN DUIJKEREN, E.; BOX, A. T.; HECK, M. E.; WANNET, W. J.; FLUIT, A. C. Methicillin-resistant staphylococci isolated from animals. **Veterinary Microbiology**, Amsterdam, v. 103, n. 1-2, p. 91-97, 2004.
46. VANNI, M.; TOGNETTI, R.; PRETTI, C.; CREMA, F.; SOLDANI, G.; MEUCCI, V.; INTORRE, L. Antimicrobial susceptibility of *Staphylococcus intermedius* and *Staphylococcus schleiferi* isolated from dogs. **Research in Veterinary Science**, Pisa, Itália. v.87. n.2. p.192-195, 2009.
47. VENGUST, M.; ANDERSON, M. E. C.; ROUSSEAU, J.; WEESE, J. S. Methicillin-resistant staphylococcal colonization in clinically normal dogs and horses in the community. **Letters in Applied Microbiology**, Oxford, v.43. p.602-6, 2006.
48. WAYNE, P. A. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing. **National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS)**. Approved Standard, M100-S15. 2005.
49. WEESE, J. S.; VAN DUIJKEREN, E. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus pseudintermedius* in veterinary medicine. **Veterinary Microbiology**, Amsterdam. v.140. p418-429, 2010.

50. WIELDERS, A. L. C.; FLUIT, A. C.; BRISSE, S.; VERHOEF, J.; SCHMITZ, F. J. *MecA* gene is widely disseminated in *Staphylococcus aureus* population. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington DC, v.40, n.11, p.3970-3975, 2002.

## CAPÍTULO 4

### CONSIDERAÇÕES FINAIS

Este trabalho é o primeiro estudo sobre MRS, desenvolvido com amostras provenientes de piодermites caninas no estado de Goiás. Possibilitou a identificação de espécies de *Staphylococcus* spp. presentes nos cães sadios e também nos cães com quadro clínico de piодermite atendidos no HV da UFG da Escola de Veterinária e Zootecnia durante o período de junho a outubro de 2010.

Os resultados foram importantes no estabelecimento do perfil de suscetibilidade aos antimicrobianos de cepas de *Staphylococcus* spp. envolvidas nas piодermites, bem como na detecção de cepas resistentes à meticilina e multirresistentes, apontando para a importância da cultura e antibiograma antes de iniciar-se um tratamento contra infecções estafilocócicas.

O aumento da resistência aos antimicrobianos entre os estafilococos e uma melhor compreensão do seu potencial zoonótico têm destacado a importância da correta identificação das espécies de estafilococos por ambos, médicos veterinários e laboratórios de diagnóstico. A conscientização e o monitoramento dessa resistência em veterinária são de grande importância, afinal a resistência em patógenos animais pode conduzir ao fracasso do tratamento em pacientes individuais e podem representar um risco zoonótico aos proprietários, como mostrado pelo isolamento de MRSA e MRSP no estudo em questão. Além disso, um aumento da resistência a várias classes de antimicrobianos, que são extremamente importantes na medicina humana, pode resultar em restrição de valiosos agentes antibacterianos de uso pelos médicos veterinários.

O aparecimento de MRSP e MRSA em animais de companhia como causa da infecção canina de pele é alarmante. Em dermatologia veterinária, em especial, quando muitos pacientes exigem o uso frequente de antibióticos por longos períodos, a terapia antimicrobiana empírica tem sido muitas vezes utilizada. Por outro lado, como a pele se presta à terapia tópica de infecções superficiais, seria prudente o uso estratégico de antimicrobianos, reservando-se a aplicação sistêmica para as infecções profundas e complicadas. Essa ação

poderia limitar a disseminação de estafilococos multirresistentes em pacientes com doença da pele.

A resistência antimicrobiana é uma das preocupações atuais em saúde pública, e o médico veterinário precisa ser pró-ativo no monitoramento e controle da resistência aos antimicrobianos de uso em pequenos animais em nível local, nacional e internacional. Mais importante ainda, o acompanhamento de MRSA e MRSP em animais de companhia deve ser promovido nos programas de vigilância veterinária sobre a resistência antimicrobiana.

Acredita-se que novos estudos se façam necessários, considerando-se a importância de serem coletados dados sobre um número cada vez maior de isolados MRS e multidroga-resistentes nos animais de companhia e a disponibilização de informações de diferentes regiões do Brasil. Trabalhos mais aprofundados associados ao caráter zoonótico de *Staphylococcus* spp. e a epidemiologia molecular são fundamentais no sentido de se obter informações a respeito das espécies isoladas nos animais de companhia e sua correlação com aquelas espécies isoladas em seus proprietários e/ou profissionais médicos veterinários no Brasil, particularmente no estado de Goiás.

## ANEXO 1 – Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal de Goiás



SERVIÇO PÚBLICO FEDERAL  
UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS  
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO

COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA

**UFG**

Goiânia, 28/05/2010

**PARECER CONSUBSTANCIADO REFERENTE AO PROJETO DE PESQUISA, PROTOCOLADO NESTE COMITÊ SOB O Nº: 103 /IO**

### I - Identificação

- Título do projeto: ISOLAMENTO DE *Staphylococcus* spp. MULTIRRESISTENTES E PERFIL DE SUSCETIBILIDADE A ANTIMICROBIANOS DE CEPAS ISOLADAS DA PELE DE CÃES SAUDÁVEIS E COMPIODERMITE.

- Pesquisador Responsável: Greyciele Rodrigues de Almeida
- Pesquisadores participantes: Olizio Claudino da Silva, Greyciele Rodrigues de Almeida
- Instituição onde será realizado o estudo: EV / UFG
- Data de apresentação ao CEP/UFG: 06 / 04 / 2010
- Área Temática: Ciências Agrárias

### II - Estrutura do Protocolo (verificação dos documentos solicitados)

Protocolo bem estruturado e embasado cientificamente. Não apresenta termo de consentimento de "prováveis" clínicas particulares<sup>1</sup> a serem utilizadas no experimento.

### III- Parecer do CEP

Protocolo aprovado após atendimento de pendências.

### IV - Data da reunião: 27 / 07 / 2010

Assinatura do(a) relator(a):

Assinatura do(a) Coordenador(a) CEP/UFG:

Prof. João Carlos da Rocha Melo  
Coordenador do Comitê de Ética em Pesquisa  
Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação