UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO” - UNESP

FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

BOTUCATU - SP

DETECÇÃO DO GENE *mecA* E PERFIL DE RESISTÊNCIA ANTIMICROBIANA EM ISOLADOS DE PIODERMITES CANINAS NO MUNICÍPIO DE BOTUCATU (BRASIL)

MARIANA DE ARAUJO CARVALHO

Botucatu – SP

Maio 2020

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO” - UNESP

FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

BOTUCATU - SP

DETECÇÃO DO GENE *mecA* E PERFIL DE RESISTÊNCIA ANTIMICROBIANA EM ISOLADOS DE PIODERMITES CANINAS NO MUNICÍPIO DE BOTUCATU (BRASIL)

MARIANA DE ARAUJO CARVALHO

Dissertação apresentada junto ao Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária, como requisito para obtenção de título de mestre.

Orientador: Prof. Ass. Dr. Luiz Henrique de Araújo Machado

Co-orientador: Prof. Adj. Dr. Antônio Carlos Paes

Área de concentração: Clínica Veterinária

Botucatu – SP

Maio 2020

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CÂMPUS DE BOTUCATU - UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: ROSEMEIRE APARECIDA VICENTE-CRB 8/5651

Carvalho, Mariana de Araujo.
Detecção do gene *mecA* e perfil de resistência antimicrobiana em isolados de piodermites caninas no município de Botucatu (Brasil) / Mariana de Araujo Carvalho. - Botucatu, 2020

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia
Orientador: Luiz Henrique de Araújo Machado
Coorientador: Antônio Carlos Paes
Capes: 50501062

1. Cão - Doenças. 2. Anti-infecciosos. 3. Pele de animais - Doenças. 4. Manifestações cutâneas de doenças.
5. *Staphylococcus*. 6. Resistência microbiana a medicamentos.

Palavras-chave: Antimicrobianos; Piodermite canina; Resitência; *Staphylococcus pseudintermedius*; *mecA*.

Mariana de Araujo Carvalho

DETECÇÃO DO GENE *mecA* E PERFIL DE RESISTÊNCIA ANTIMICROBIANA EM ISOLADOS DE PIODERMITES CANINAS NO MUNICÍPIO DE BOTUCATU (BRASIL)

Comissão Examinadora

Prof. Ass. Dr. Luiz Henrique de Araújo Machado

Presidente e orientador

Departamento de Clínica Veterinária

FMVZ – UNESP – Botucatu, SP

Prof. Ass. Dr. Márcio Garcia Ribeiro

Membro

Departamento de Higiene Veterinária e Saúde Pública

FMVZ – UNESP – Botucatu, SP

Profa. Dra. Dyana Alves Henriques

Membro

Departamento de Graduação

Centro Universitário São Camilo

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, Rosângela e Oswaldo, por todo amor, dedicação e incentivo em todas as etapas da minha vida. Pelo apoio nos momentos mais turbulentos. Devo a vocês minha formação pessoal e minhas conquistas profissionais. À minha irmã, Amanda, por todo o cuidado e carinho dedicados a mim. À minha avó Neusa, sempre preocupada e amorosa. Agradeço também aos membros de quatro patas da família, Lucy (in memorian) e Tony, fontes de amor incondicional e lembrete constante do porquê eu escolhi o caminho da Veterinária.

Ao meu orientador, Luiz Henrique Machado, e co-orientador, Antonio Carlos Paes, pelo conhecimento compartilhado e grande contribuição para meu crescimento profissional.

Ao meu namorado, Igor Vellano, cujo amor e companheirismo foram imprescindíveis durante esta jornada. Obrigada por todo o suporte nos momentos mais difíceis, por compartilhar a alegria de cada pequena vitória, por ser meu porto seguro.

Ao Fernando Paganini Listoni, sempre disposto a ajudar com as técnicas laboratoriais. Agradeço por todos os ensinamentos. À Adriana Pavan, por sempre esbanjar simpatia e carinho, tornando as pausas para o café muito prazerosas.

Aos professores Márcio Garcia Ribeiro e Jane Megid, pelos ensinamentos e por sempre estarem disponíveis para ajudar desde a época da residência.

À minha amiga Carolina Lechinski, exemplo de pós graduanda, profissional e pessoa, pelos conselhos e sugestões que tanto contribuíram para este trabalho. Ao meu grande amigo André, irmão de alma, não tenho palavras para agradecer a parceria desde o tempo da residência. Ao amigo Fábio Portilho, que compartilhou comigo prazos, viagem para entrega de amostras e conhecimento tecnológico. A ajuda de vocês foi fundamental para a conclusão dessa etapa.

Às minhas amigas Kamila Paim, Mariana Ramos e Natália Lourenço, que mais do que dividir a casa, dividiram comigo alegrias e tristezas, momentos de muita amizade, risadas e carinho.

Aos amigos Ana Luísa Albuquerque, Raíssa Leite, Gustavo Rosa, Larissa Andrade, Larissa Tonelli, Gabrielly Sartori, Patrícia Lainetti, Vitória Ribeiro, pelos almoços, cafezinhos, risadas, vinhos, todos os momentos de descontração. Vocês tornaram os dias mais leves.

Às minhas amigas Júlia Lombardi, Marília Macedo, Natália Leonel e Natália Quadros, que mesmo estando longe, sempre se fizeram presentes. Obrigada pelo carinho e amizade incondicionais.

Aos residentes da Clínica Médica de Pequenos Animais, pelo acolhimento, amostras coletadas e pela amizade.

A todos os amigos da salinha dos pós graduandos, em especial à Bárbara Ferro, Maria Gabriela Picellia e Ana Camila Pereira, pelos conselhos e companheirismo, tornando os momentos na salinha tão agradáveis.

À aluna de graduação Núbia Felipeti, pela pró-atividade e disposição em ajudar sempre. Mais do que uma aluna de iniciação científica, você se tornou uma amiga.

À professora Maria de Lourdes da Cunha e à pós doutoranda Nathália Teixeira, pela realização dos PCRs e contribuição para esta pesquisa.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Oligonucleotídeos para a detecção do gene *mecA* 18

Tabela 2. Principais suspeitas e/ou diagnósticos confirmados de 115 cães com piodermite atendidos no Hospital Veterinário da UNESP Botucatu, SP, em 2018-2020 19

Tabela 3. Raças dos animais que apresentavam piodermite atendidos no Hospital Veterinário da FMVZ-UNESP Botucatu, SP, em 2018-2020. 20

Tabela 4. Micro-organismos isolados em meio de ágar sangue de amostras provenientes de piodermites caninas atendidas no Hospital Veterinário da UNESP Botucatu, SP, EM 2018-2020. 21

Tabela 5. Perfil de sensibilidade dos isolados de *Staphylococcus* spp obtidos de amostras de piodermites caninas atendidas no Hospital Veterinário da UNESP Botucatu, SP, em 2018-2020. 22

Tabela 6. Observações e mediana (mínimo – máximo) do número de compostos antimicrobianos não efetivos nos isolados de lesões de pele de cães atendidos no Hospital Veterinário da FMVZ/UNESP (Botucatu, SP) em 2018-2020, distribuídos por diferentes classes. 23

Tabela 7. Número e proporção de linhagens Multidrogas Resistentes (MDR) isoladas em lesões de pele de cães atendidos no Hospital Veterinário da FMVZ/UNESP (Botucatu, SP) em 2018-2020, distribuídos por diferentes classes. 24

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Frequência de isolados de espécies de *Staphylococcus* spp. identificados pela técnica do MALDI-TOF MS em 105 amostras de cães com piodermite atendidos no Hospital Veterinário da FMVZ/UNESP (Botucatu, SP) entre 2018-2020 21

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

BHI	Brain Heart Infusion
CEUA	Comissão de Ética no Uso de Animais
CIM	Concentração Inibitória Mínima
DNAse	Desoxirribonuclease
FMVZ	Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia
GSI	Grupo *Staphylococcus intermedius*
gyrA	Gene codificador de resistência à quinolonas
gyrB	Gene codificador de resistência à quinolonas
grlA	Gene codificador de resistência à quinolonas
grlB	Gene codificador de resistência à quinolonas
IRMA	Índice de Resistência Múltipla aos Antimicrobianos
µg	microgramas
MALDI-TOFMS	Matrix Assisted Laser Desorption Ionization-Time of Flight Mass Spectrometry
MDR	Multidroga resistentes*mecA* Gene codificador da resistência à meticilina
MSA	Manitol Salt Ágar
S	Sensível
SARM	*Staphylococcus aureus* resistente à meticilina
SPRM	*Staphylococcus pseudintermedius* resistente à meticilina
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase
PS	Parcialmente Sensível

Qualileite	Laboratório de Pesquisa em Qualidade do Leite
R	Resistente
tetK	Gene codificador de resistência à tetraciclinas
tetL	Gene codificador de resistência à tetraciclinas
tetM	Gene codificador de resistência à tetraciclinas
tetO	Gene codificador de resistência à tetraciclinas
UNESP	Universidade Estadual Paulista
USP	Universidade de São Paulo
VNP	Departamento de Nutrição e Produção Animal

SUMÁRIO

RESUMO 3
ABSTRACT 4
1. INTRODUÇÃO 5
2. REVISÃO DE LITERATURA 6
2.1. Microbiota cutânea canina 6
2.2. Staphylococcus pseudintermedius 7
2.3. Piodermite 8
2.4. Resistência à meticilina 9
3. OBJETIVOS 12
3.1. Geral 12
3.2. Específicos 12
4. MATERIAL E MÉTODOS 12
4.1. Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA), FMVZ - UNESP Botucatu 12
4.2. Origem das amostras 13
4.3. Colheita das amostras 13
4.4. Tamanho amostral 13
4.5. Diagnóstico microbiológico 14
4.5.1. Isolamento e caracterização fenotípica 14
4.5.2. Prova da catalase 14
4.5.3. Fermentação de açúcares 14
4.5.4. Produção de desoxirribonuclease (DNAse) 14
4.5.5. Teste de coagulase 15
4.5.6 Perfil de sensibilidade microbiana “in vitro” 15
4.6. Estoque de micro-organismos 16
4.7. MALDI-TOF MS 16
4.8. Biologia molecular 17
4.8.1. Extração do ácido nucléico 17
4.8.2. Detecção do gene *mecA* de resistência à meticilina 17
4.9. Análise estatística 18
5. RESULTADOS 18
6. DISCUSSÃO 25
7. DIFICULDADES E LIMITAÇÕES DO ESTUDO 28
8. CONCLUSÕES 28
9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS 29
ANEXO 1 36

ANEXO 2 37
10. ARTIGO 38

CARVALHO, M. A. Detecção do gene *mecA* e perfil de resistência antimicrobiana em isolados de piodermites caninas no município de Botucatu (Brasil). Botucatu, 2020. 60p. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Campus de Botucatu, Universidade Estadual Paulista – UNESP.

RESUMO

As piodermites figuram entre as principais afecções dermatológicas atendidas na rotina da clínica veterinária de animais de companhia. São comumente causadas por *Staphylococcus pseudintermedius* e o tratamento baseia-se principalmente em terapia antimicrobiana, muitas vezes instituída sem diagnóstico microbiológico e testes de sensibilidade “in vitro” prévios, aumentando a pressão seletiva para micro-organismos resistentes. A crescente proximidade entre o homem e animais de estimação favorece o processo de transferência de genes de resistência entre linhagens bacterianas diferentes, representando problema para a medicina veterinária e humana. O objetivo deste trabalho foi identificar os principais patógenos isolados de piodermites caninas atendidas em hospital veterinário no Brasil, bem como o perfil de resistência antimicrobiana e a presença do gene de resistência *mecA* nos isolados. Dos isolados, 70,4% foram confirmados como *Staphylococcus pseudintermedius* com base na técnica de Matrix-assisted laser desorption ionization – time of flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS), seguido por *S. intermedius* (23,8%). Observou-se maior taxa de resistência aos fármacos ampicilina (61,9%), penicilina (59%), doxiciclina (35,2%) e tetraciclina (31,4%). Foram encontradas 29/111 (26,1%) estirpes de estafilococos e estreptococos multidroga resistentes (MDR). Foram enviadas para realização de Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) 71 linhagens de *S. intermedius* e *S. pseudintermedius*, das quais apenas duas linhagens de *S. pseudointermedius* foram positivas para o gene *mecA.* Neste contexto, a alta frequência encontrada de MDR gera preocupação em Saúde Pública, considerando o potencial zoonótico do *S. pseudintermedius* e o contato cada vez mais estreito entre humanos e cães.

Palavra-chave: piodermite canina, *Staphylococcus pseudintermedius*, resistência, antimicrobianos, *mecA*

CARVALHO, M. A. Detection of the *mecA* gene and antimicrobial resistance profile in canine pyoderma isolates in the city of Botucatu (Brazil). Botucatu, 2020. 60p. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Campus de Botucatu, Universidade Estadual Paulista – UNESP.

ABSTRACT

Pyoderma are among the main dermatological conditions seen in the routine of the pet veterinary clinic. They are commonly caused by Staphylococcus pseudintermedius and the treatment is based mainly on antimicrobial therapy, often instituted without microbiological diagnosis and previous “in vitro” sensitivity tests, increasing the selective pressure for resistant microorganisms. The growing proximity between man and pets favors the process of transferring resistance genes between different bacterial strains, representing a problem for veterinary and human medicine. The objective of this work was to identify the main pathogens isolated from canine pyoderma treated at a veterinary hospital in Brazil, as well as the antimicrobial resistance profile and the presence of the mecA resistance gene in the isolates. Of the isolates, 70.4% were confirmed as *Staphylococcus pseudintermedius* based on the Matrix-assisted laser desorption ionization - time of flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS) technique, followed by *S. intermedius* (23.8%). A higher rate of resistance to the drugs ampicillin (61.9%), penicillin (59%), doxycycline (35.2%) and tetracycline (31.4%) was observed. 29/111 (26.1%) resistant strains of staphylococci and multidrug streptococci (MDR) were found. 71 Polymerase Chain Reaction (PCR) were sent to 71 strains of S. intermedius and S. pseudintermedius, of which only two strains of S. pseudointermedius were positive for the mecA gene. In this context, the high frequency found of MDR generates concern in Public Health, considering the zoonotic potential of S. pseudintermedius and the increasingly close contact between humans and dogs.

Key words: canine pyoderma, *Staphylococcus pseudintermedius*, resistance, antimicrobials, *mecA*

1. INTRODUÇÃO

Estima-se que 40% dos casos atendidos na rotina veterinária apresentem alguma queixa dermatológica, podendo esta ser o principal motivo da procura do veterinário. Dentre as doenças dermatológicas mais predominantes, a piodermite vem ganhando cada vez mais destaque no cenário da dermatologia veterinária. Doença muitas vezes secundária, pode ter como causa base endocrinopatias, disfunções no sistema imune ou até mesmo outras dermatopatias, e manifesta tanto sinais simples como mais complexos. O tratamento da piodermite fundamenta-se em terapia antimicrobiana, o que gera uma preocupação cada vez maior no que se refere à resistência bacteriana, pois grande parte dos clínicos escolhe o fármaco a ser utilizado de forma empírica, sem auxílio de testes de sensibilidade “in vitro”.

O agente causador mais comum da piodermite canina é *Staphylococcus pseudintermedius*, anteriormente denominado *Staphylococcus intermedius*. Residente natural na pele de cães, geralmente não ocasiona doença, vivendo em simbiose com o hospedeiro. Vários fatores podem propiciar a colonização excessiva da bactéria, provocando a manifestação clínica da piodermite, incluindo elevações de temperatura e alterações na barreira epidérmica. Apesar de menos frequente, já foi descrito o isolamento de *Staphylococcus aureus* resistente à meticilina (SARM) na pele de cães, apresentando piodermite ou não, sendo que este já pode ser considerado reservatório desta bactéria. Altamente patogênica para os humanos, a presença do SARM é de grande importância devido ao convívio cada vez mais próximo dos humanos com os animais de estimação.

Não é só *S. aureus* que apresenta a resistência à meticilina. Já foram isolados *S. pseudintermedius* resistentes à meticilina (SPMR) em cães que apresentavam piodermite, aparecendo com frequência cada vez maior. São vários os fatores que influenciam no aumento de bactérias resistentes. Um dos principais é a questão genética. Além da mutação espontânea, pode ocorrer transferência de genes entre bactérias. As bactérias resistentes à meticilina possuem um gene capaz de produzir proteínas que impedem a ação de antibióticos betalactâmicos. Além disso, o fato de não se utilizar os testes “in vitro” de sensibilidade aos antimicrobianos e o uso não racional de fármacos na rotina veterinária aumenta a pressão de seleção de micro-organismos resistentes.

Dados esses fatores, bactérias resistentes causadoras de piodermites em cães tornam-se um problema não só na medicina veterinária, mas também na saúde pública. A proximidade cada vez maior entre os humanos e os cães favorece a transferência de

genes de resistência entre *S. pseudintermedius* e *S. aureus*, sendo esta última de grande importância na saúde humana. Considerando essa perspectiva, o presente estudo investigou o perfil epidemiológico das piodermites caninas atendidas na Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia (FMVZ) – UNESP Botucatu, bem como a presença de multirresistência nos isolados.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Microbiota cutânea canina

A pele canina tem como função produzir uma barreira protetora, sem a qual a manutenção da vida não seria possível. Essa barreira é responsável por impedir a perda de água transepidérmica e evitar a entrada de moléculas exógenas provenientes do ambiente, tal como alérgenos e micro-organismos. É composta por mecanismos comportamentais, físicos, químicos e microbiológicos (BOTONI, 2018).

Um dos mecanismos comportamentais é o “grooming”, prática que ajuda a eliminar parasitas e distribuir secreções cutâneas fisiológicas. Os pelos, o estrato córneo e a secreção sebácea produzida nessa camada compõem a barreia física. No estrato córneo está localizada a matriz extracelular que contém lipídeos hidrofóbicos, responsáveis pela manutenção da hidratação. Já os mecanismos químicos são representados pelos peptídeos antibacterianos da secreção sebácea e de ácidos graxos, que induzem fagocitose, liberação de prostaglandinas, ativação da resposta inflamatória, dentre outros (MILLER et al., 2013;BOTONI et al., 2014; SANTORO, 2015).

Os micro-organismos naturais da pele do cão também auxiliam na barreira protetora, vivendo em simbiose com o hospedeiro e impedindo a colonização por outros agentes patogênicos. São compostos, entre outros, por bactérias localizadas na epiderme e nos folículos pilosos, e podem variar de acordo com o ambiente cutâneo, influenciados por fatores como pH, hidratação e nível de ácidos graxos. A microbiota natural é classificada em residente e transitória (MILLER et al., 2013; HOFFMAN et al., 2014).

Os micro-organismos residentes são obtidos da mãe no período neonatal e permanecem durante toda a vida. As principais bactérias da pele e folículos pilosos são *Micrococcus* spp., *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus xylosus*, *Staphylococcus pseudintermedius*, *Streptococcus* alfa hemolítico, *Clostridium* spp., *Acinetobacter* spp. Com relação à microbiota transitória, podem ser isoladas *Bacillus* spp, *Escherichia coli*, *Proteus mirabilis*, *Corynebacterium* spp. e *Pseudomonas* spp. Contudo, não possuem

importância clínica em geral, a menos que participem como agentes oportunistas de outras enfermidades (BOTONI et al., 2014; HOFFMAN et al., 2014).

2.2. Staphylococcus pseudintermedius

Staphylococcus pseudintermedius é o principal patógeno bacteriano envolvido em piodermites caninas. Componente da microbiota de pele dos cães, presente em folículos pilosos e pelos, desenvolve relação de simbiose com o hospedeiro, impedindo a colonização e infecção de outros agentes patogênicos (BANNOEHR; GUARDABASSI, 2012; BOTONI et al., 2014). Estima-se que a prevalência desse micro-organismo em cães saudáveis varia entre 46 e 92%, dependendo da população e metodologia utilizadas (LATRONICO et al., 2014).

Os filhotes adquirem a bactéria da mãe no período neonatal. Apesar de poucos estudos, acredita-se que a transmissão direta entre cães adultos também seja possível, pelo do contato de cães infectados com contactantes hígidos. A bactéria é também comumente isolada de orofaringe, região perianal, narinas e axilas, locais que podem apresentar temperaturas mais altas e aumento do tempo de contato, fatores que influenciam no sucesso da adesão da bactéria ao tegumento. A quantidade e as estirpes da bactéria podem variar de acordo com a dermatopatia apresentada pelo animal. Pacientes atópicos apresentam maiores concentrações de bactérias nos locais reservatórios em comparação com cães saudáveis (BANNOEHR; GUARDABASSI, 2012; BOTONI et al., 2014,).

Anteriormente denominado *Staphylococcus intermedius*, o agente foi reclassificado para o grupo *Staphylococcus intermedius* (GSI), que inclui *S. pseudintermedius*, *S. intermedius*, *S. delphini* e *S. cornubiensis* (ONUMA et al, 2012; MURRAY et al, 2018). Desde a reclassificação, é de senso comum que todos os isolados provenientes de cães sejam denominados *S. pseudintermedius*, a menos que seja realizado diagnóstico genético. Esta espécie é caracterizada por colônias de tamanho médio não pigmentadas, apresentando gama-hemólise ou beta-hemólise incompleta em meio de ágar sangue ovino ou bovino. Dentre os fatores de virulência, podemos citar a produção de enzimas, como coagulase e proteases, proteínas de superfície, como a proteína A, capacidade de formar biofilmes, e produção de toxinas, como as citotoxinas, toxina esfoliativa e enterotoxinas (BANNOEHR; GUARDABASSI, 2012; LATRONICO et al., 2014).

Em decorrência do contato cada vez mais próximo entre humanos e animais de estimação, atualmente *S. pseudointermedius* é considerado importante patógeno com

potencial zoonótico. Em humanos, já foram descritos casos de infecções nas quais foi isolado *S. pseudintermedius*, contrariando a hipótese de que seria isolado *S. aureus*. Os casos mais comuns de infecção humana por esse patógeno foram dermatopatias e feridas por mordedura de animais. Apesar de não haver grupo de vulnerabilidade definido, acredita-se que idosos, médicos veterinários e donos de cães com piodermite recorrente apresentem maior risco de colonização e/ou infecção por *S. pseudintermedius* (DUIJKEREN et al., 2011; LATRONICO et al., 2014; SOMAYAJI et al., 2016).

2.3. Piodermite

As doenças dermatológicas em cães estão elencadas entre as principais causas de atendimento na rotina clínica veterinária. Estima-se que 40% dos cães submetidos a exame veterinário apresentem sinais clínicos dermatológicos como queixa principal ou secundários a outras afecções (BOTONI et al., 2014). Dentre as afecções mais comuns destacam-se as piodermites bacterianas, as dermatites alérgicas e parasitárias, e as dermatoses imunomediadas e endócrinas (BOTONI et al., 2014; SUMMERS et al., 2014). Devido à elevada ocorrência, as piodermites estão entre os principais motivos de prescrição de antimicrobianos na rotina veterinária (LOEFFER; LLOYD, 2018)

As piodermites podem ser classificadas em superficiais ou profundas, assumindo, por vezes, caráter crônico e recorrente. A piodermite superficial, mais comum na rotina clínica, está associada com a proliferação da bactéria na epiderme. Os principais sinais clínicos são aparecimento de pápulas, pústulas, colaretes epidérmicos, áreas de alopecia e graus variados de prurido. Frequentemente as lesões estão localizadas no abdômen e face medial das coxas. Já a piodermite profunda apresenta caráter mais grave, uma vez que a proximidade da derme e vasos sanguíneos aumenta a chance de bacteremia. Crostas hemáticas, edema, eritema, nódulos e fístulas são as principais manifestações clínicas (SUMMERS et al., 2014; LOEFFER; LLOYD, 2018).

Embora infrequente, a apresentação clínica primária da doença pode ocorrer, e acredita-se que esteja relacionada com o fato do principal patógeno envolvido (*S. pseudintermedius*) pertencer à microbiota normal de cães saudáveis. No entanto, as piodermites geralmente são secundárias, resultando de outras enfermidades, que comprometam o sistema imunológico e/ou a barreira epidérmica, como observado em endocrinopatias e processos alérgicos. Nesses casos, é de extrema importância o

tratamento da causa primária, visando minimizar recidivas da piodermite (LOEFFER; LLOYD, 2018).

Além do controle da causa base, o tratamento da piodermite baseia-se na terapia antimicrobiana, tópica e/ou sistêmica, preferencialmente acompanhada de testes de sensibilidade “in vitro”. De acordo com o guideline proposto pelo Antimicrobial Guidelines Working Group of the International Society for Companion Animal Infectious Desease, em 2013, o tratamento exclusivamente tópico é indicado em casos de lesões localizadas ou lesões generalizadas amenas, e consiste no uso de clorexidine, peróxido de benzoíla, mupirocina em forma de xampus, condicionadores, sprays, entre outros. Quando se faz necessário o uso de terapia sistêmica, os fármacos mais eficazes são cefovecin, amoxicilina com clavulanato de potássio, clindamicina, cefadroxil e sulfametoxazol com trimetoprim (HILLIER et al., 2013).

De forma preocupante, o frequente estabelecimento de terapias antimicrobianas sistêmicas sem auxílio de diagnóstico microbiológico e testes de sensibilidade “in vitro”, vem aumentando cada vez mais a pressão seletiva para isolados resistentes (HOLM et al., 2002; KAWAKAMI et al., 2010; BRYAN et al., 2012).

2.4. Resistência à meticilina

A resistência bacteriana é um processo que ocorre tanto por mutação espontânea quanto por transmissão de material genético entre as bactérias. Além dos aspectos genéticos relacionados às próprias bactérias, a não realização de testes de sensibilidade aos antimicrobianos é um fator que contribui significativamente para a seleção de micro-organismos multirresistentes (SILVA et al., 2012). Uma bactéria é considerada multirresistente quando apresenta resistência a pelo menos um antimicrobiano de três ou mais diferentes classes de antimicrobianos (MAGIORAKOS et al., 2012).

O uso indiscriminado cada vez maior de antimicrobianos na Medicina Veterinária favorece a seleção de bactérias resistentes. Na União Europeia, a comercialização de medicamentos para animais de companhia equivale a 24% do total relacionado à saúde, onde 41% correspondem aos antimicrobianos (HOLM et al., 2002; GUARDABASSI et al., 2004; SILVA et al., 2012).

Recentemente foi descrita a presença de *Staphylococcus aureus* resistente à meticilina (SARM) na pele de cães, gatos e cavalos. Os cães podem ser considerados reservatórios de SARM, mesmo com a baixa prevalência (10%) de isolamento desse

micro-organismo na espécie na presença ou não de piodermite. *S. aureus* representa espécie bacteriana de elevada patogenicidade para humanos, o que torna preocupante a presença desse agente na pele dos cães, uma vez que está cada vez mais estreito o contato dos humanos com animais de companhia (LOEFFLER et al., 2005).

Loeffler et al. (2005), em Londres, avaliaram a presença do SARM nos animais internados e na equipe de médicos veterinários e enfermeiros do hospital. Foram coletadas amostras de mucosa oral e nasal de 45 cães e 12 gatos, independente da enfermidade e/ou tratamento realizado. Ainda, foram incluídas amostras de mucosa oral e nasal de 78 funcionários do hospital, entre veterinários e enfermeiros bem como amostras de superfícies ambientais de salas de espera e consultórios. SARM foi isolado de 13 amostras dos funcionários (17,9%), 4 amostras de cães (8,9%) e 3 de superfícies (10%). Não foi observado isolamento de SARM em amostras provenientes de gatos. Os autores salientam a alta frequência de isolamento de SARM nos cães e a necessidade de mais estudos para estabelecer se pessoas com contato ocupacional com animais de companhia possam representar um grupo de vulnerabilidade para as infecções por *S. aureus*. Além disso, sugerem o monitoramento do SARM nos animais para avaliar a disseminação deste agente e prevenir que se torne endêmico na população animal (LOEFFLER et al., 2005).

A resistência à meticilina não é um problema inerente apenas ao *S. aureus*. Em 2012, foram descritos isolados de *S. pseudintermedius* resistentes à meticilina (SPRM), com ocorrência cada vez maior na rotina clínica (BECK et al., 2012). A resistência destes micro-organismos está ligada principalmente a fatores genéticos. *Staphylococcus* resistentes à meticilina possuem um gene denominado *mecA*, que codifica proteínas que impedem a ligação das penicilinas, PBP 2’ ou PBP 2ª, prejudicando a ação de todos os antimicrobianos betalactâmicos (ONUMA et al., 2012).

Com o objetivo de avaliar a prevalência de SPRM em isolados de piodermite e otite externa em cães, estudo realizado no Veterinary Medical Teaching Hospital na Universidade Nacional de Seoul, Coreia, coletou amostras de 186 animais. Foram isolados 143 *S. pseudintermedius*, dentre os quais 60 apresentavam o gene de resistência *mecA* (KANG et al., 2017). No Reino Unido, Clark et al. (2016) constataram a presença de 97 SPRM em 196 isolados de pele de cães, confirmados pela presença do gene (CLARK et al., 2016).

Botoni et al. (2016), no Brasil, avaliaram a relação entre a presença de SPRM em cães com piodermite, a susceptibilidade *in vitro* e a presença do gene *mecA* nos isolados. Foram coletadas amostras de pele e narinas de 43 cães diagnosticados com piodermite

superficial. Foram obtidos 68 isolamentos e, destes, 61 (91%) identificados fenotípica e geneticamente como *Staphylococcus pseudintermedius*. Nos testes de sensibilidade, 24% das bactérias isoladas apresentaram resistência à cefalexina, 23% à amoxicilina com clavulanato de potássio e 34% à oxacilina. No que se refere à presença do gene *mecA*, 37% das bactérias testadas possuíam esse gene, porcentagem que pode ser comparada à taxa de resistência à oxacilina (34%), ambos os valores sendo indicativo da presença de SPRM nestes cães.

Esses micro-organismos frequentemente oferecem resistência a outros fármacos, como quinolonas e tetraciclinas, causada por mutações nos genes *gyrA*, *gyrB*, *grlA* ou *grlB* e nos genes *tetK*, *tetL*, *tetM* e *tetO*, respectivamente (COELHO et al., 2007; ONUMA et al., 2012). Beck et al. (2012) no Canadá, realizaram estudo para avaliar a presença de SPRM resistentes à meticilina em cães que foram submetidos ao tratamento antimicrobiano para piodermite. Foram coletadas amostras de 173 cães diagnosticados com piodermite e de 41 cães hígidos como grupo controle, sem histórico de doença dermatológica ou uso recente de antimicrobianos. Dos cães que apresentavam piodermite, 154 já haviam feito uso de antimicrobiano anteriormente, 36 haviam utilizado fluorquinolonas e 93 haviam utilizado ciclosporina e glicocorticoides. O SPRM foi isolado da pele de 78 (45,1%) dos 173 animais, ocorrência considerada alta e preocupante (BECK, et al., 2012).

O crescente aumento da resistência bacteriana nas piodermites de cães constitui problema tanto para Medicina Veterinária quanto à Saúde Pública. A presença de micro-organismos resistentes é responsável por falhas no tratamento, elevando custos com a doença e taxas de morbidade dos animais (PELLERIN et al., 1998).

Guardabassi et al. (2004), na Dinamarca, confirmaram a presença de *Staphylococcus intermedius* multirresistentes em donos de cães que apresentavam piodermite. Apesar de raramente causar doenças em humanos, a presença de *S. intermedius* nos proprietários dos animais potencializa o risco de transferência de genes de resistência para *Staphylococcus* patogênicos para humanos, pela capacidade de transmissão de genes entre bactérias. Loeffler et al. (2005), no Reino Unido, identificaram SARM em médicos veterinários, questionando se estes são um grupo de vulnerabilidade para infecções por este patógeno. Ressalta-se que o uso de antimicrobianos em cães deve ser realizado com cautela, visando evitar o aumento de bactérias multirresistentes que possam causar prejuízo à saúde animal e humana (GUARDABASSI et al., 2004).

Considerando a microbiota natural da pele de cães, na qual se destacam bactérias do gênero *Staphylococcus*, a alta casuística de afecções dermatológicas na rotina

veterinária, comumente tratadas com auxílio de terapias antimicrobianas, e a emergência mundial do fenômeno de multirresistência; o presente estudo investigou a prevalência de bactérias do gênero *Staphylococcus*, dando ênfase a espécie *S. pseudointermedius*. Foi avaliado também o perfil de resistência dos isolados aos antimicrobianos, além da detecção do gene mecA em *S. pseudointermedius* e *S. intermedius*.

3. OBJETIVOS

3.1. Geral

1. Identificar por técnicas microbiológicas e moleculares micro-organismos presentes em piodermites de cães atendidos em Hospital Veterinário no Brasil (Botucatu, SP).

3.2. Específicos

1. Investigar a ocorrência de *S. pseudintermedius* e *S. aureus* entre os isolados;

2. Determinar o perfil de resistência dos isolados diante dos principais fármacos antimicrobianos utilizados no tratamento de piodermite de cães;

3. Detectar a presença do gene *mecA* nos isolados de *S. pseudintermedius* e *S. intermedius.*

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA), FMVZ - UNESP Botucatu

O presente estudo foi submetido à apreciação do Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA) da FMVZ-UNESP/Botucatu, SP, e aprovado sob protocolo número 0149/2018 (ANEXO 1), bem como os tutores (proprietários), que permitiram a colheita de material dos cães, assinaram termo de consentimento livre e esclarecido (ANEXO 2).

4.2. Origem das amostras

As amostras foram provenientes de cães apresentando quadro compatível com piodermite superficial ou profunda, primária ou recorrente, apresentando ou não doença concomitante, sem predileção por raça, sexo ou idade, atendidos na rotina de diversos setores do Hospital Veterinário da FMVZ – UNESP/ Botucatu –SP (Clínicas Médica e Cirúrgica Pequenos Animais, Reprodução Animal, Enfermidades Infecciosas dos Animais), de setembro de 2018 a janeiro de 2020. Foram excluídos cães com piodermite que não apresentavam pústulas íntegras. Não foi critério de exclusão o uso recente ou atual de antimicrobianos nos animais no momento da coleta. Os animais foram classificados em três categorias com relação à idade: filhotes (1 dia – 1 ano), adultos (1 ano e 1 dia – 6 anos e 11 meses) e idosos (maior ou igual a 7 anos).

4.3. Colheita das amostras

O material foi colhido após o rompimento de pústulas íntegras com auxílio de uma agulha estéril (25x5,5mm), sem desinfecção prévia. Após o rompimento, o conteúdo purulento foi imediatamente recolhido por swab estéril e acondicionado em meio *Stuart (Oxoid®)*, substrato não-nutricional utilizado para conservação bacteriana. Após identificação, as amostras foram mantidas em temperatura de refrigeração (4-8ºC) até o processamento (HOLM et al., 2002), realizado em até sete dias após a colheita, no laboratório de Microbiologia do Departamento de Higiene Veterinária e Saúde Pública da mesma instituição.

4.4. Tamanho amostral

Considerando um nível de 95% de confiança e um erro estimado de 12%, determinou-se o tamanho amostral de 134 cães para o desenvolvimento do estudo (COCHRAN, 1977).

4.5. Diagnóstico microbiológico

4.5.1. Isolamento e caracterização fenotípica

As amostras foram processadas pela técnica de esgotamento em placas de ágar acrescido de 5% de sangue bovino desfibrinado (ágar sangue) e de ágar MacConkey (base Oxoid®). Após o processamento, foram mantidas em condições de aerobiose a 37ºC, por 96 horas, com leituras a cada 24 horas (QUINN et al., 2011; BENITES et al., 2016).

4.5.2. Prova da catalase

As colônias morfologicamente compatíveis com *Staphylococcus* spp. e *Streptococcus* spp. (cocos gram-positivos) foram submetidas ao teste de catalase, para possível diferenciação das espécies (REINER, 2010).

4.5.3. Fermentação de açúcares

Foi utilizado o Manitol Salt Ágar (MSA), contendo manitol e indicador de pH vermelho de fenol (base Himedia®). A bactéria com 24h de crescimento foi inoculada no meio com auxílio de alça de alumínio. Foram considerados positivos os isolados que após 48h de incubação a 37ºC apresentaram a coloração amarelada no MSA, indicando a fermentação do açúcar contido no meio, e negativas as que apresentaram coloração rosa após esse período (QUINN et al., 2011; BENITES et al., 2016).

4.5.4. Produção de desoxirribonuclease (DNAse)

Para avaliação da produção da enzima desoxirribonuclease, uma colônia bacteriana com 24h de crescimento foi semeada em ágar contendo desoxirribonuclease (base Difco®) e mantida incubada a 37ºC por mais 24h. Após esse período, as bactérias produtoras da enzima apresentam ao redor da semeadura um halo claro em relação ao meio. Foram consideradas positivas as amostras que continham o halo e negativas as que não continham (BENITES et al., 2016; KATEETE et al., 2010).

4.5.5. Teste de coagulase

Foram utilizados tubos de vidro, acrescentando 0,5µL de inóculo proveniente do caldo Brain Heart Infusion (BHI) e 0,25µL de plasma de coelho. Os tubos foram mantidos em condições de aerobiose, a 37ºC, por aproximadamente 20h. Nos tubos contendo reações positivas, foi observado presença de coágulo, enquanto nas negativas, a solução manteve-se líquida (BENITES et al., 2016).

4.5.6 Perfil de sensibilidade microbiana “in vitro”

Após 24 horas, no momento da primeira leitura, foram repicadas 2 a 3 colônias dos cultivos positivos para caldo Brain Heart Infusion (BHI) (base Oxoid®). Após aproximadamente 6h, a turbidez da solução foi comparada à solução padrão de McFarland 0,5. As soluções com maior turbidez que a escala foram diluídas com salina estéril até ficarem equivalentes à escala. O inóculo foi então semeado com auxílio de swab estéril em placas Mueller-Hinton e placas de ágar sangue bovino, este último em casos de espécies de *Streptococcus*.

A técnica utilizada foi a de difusão de discos, que foram armazenados em temperatura de refrigeração (2-8ºC). Após a colocação dos discos, as placas foram acondicionadas em atmosfera de aerobiose a 37ºC por aproximadamente 18h. Passado esse período, foi avaliado o diâmetro dos halos de inibição ao redor do disco, medido em milímetros com auxílio de uma régua. A sensibilidade foi determinada a partir da comparação dos diâmetros do halo, dividida em três categorias: sensível dose padrão (S), parcialmente sensível (PS) e resistente (R) (MIMICA et al., 2005; CLSI, 2018).

Para o teste de sensibilidade, foram utilizados fármacos dos seguintes grupos: 1) aminoglicosídeos (amicacina 30µg, gentamicina 10 µg, neomicina 10 µg), 2) anfenicol (cloranfenicol 30 µg), 3) betalactâmicos (amoxicilina com ácido clavulânico 30 µg, ampicilina 10 µg, penicilina 10 µg, oxacilina 5 µg), 4) cefalosporinas (cefalexina 30 µg, cefovecin 30 µg, ceftiofur 30 µg, ceftriaxona 30 µg), 5) fluoroquinolonas (ciprofloxacino 5 µg, enrofloxacino 5 µg, levofloxacino 5 µg, norfloxacino 10 µg), 6) Glicilcilinas (tigecicline 15 µg), 7) lincosaminas (clindamicina 2 µg), 8) macrolídeos (azitromicina 15 µg, claritromicina 15 µg, eritromicina 15 µg), 9) rifamicinas (rifampicina 5 µg), e 10) tetraciclinas (doxiciclina 30 µg, tetraciclina 30 µg) (TRABULSI et al., 2005).

Os isolados foram considerados multirresistentes quando apresentaram resistência a pelo menos um antimicrobiano de três ou mais diferentes classes de antimicrobianos (MAGIORAKOS et al., 2012).

4.6. Estoque de micro-organismos

Todos os isolados de *Staphylococcus* foram semeados em tubos de vidro contendo meio de Ligniéres e mantidos em temperatura de 37ºC por 24h. Dado esse período, os tubos foram fechados com tampa de borracha e armazenados em caixa de isopor, na temperatura de 25ºC. Passados aproximadamente 4 a 5 meses do armazenamento, foi realizado a passagem dos isolados para novos meios Lignières, a fim de manter a viabilidade bacteriana.

4.7. MALDI-TOF MS

Para identificação de gênero e espécie dos isolados foi utilizada a técnica MALDI-TOF MS. As bactérias estocadas foram reisoladas em placas de ágar sangue e mantidas em temperatura de 37ºC durante 24h. Após esse período, as colônias isoladas foram transferidas para placas MSP 96 target polished steel BC®, com capacidade para 96 amostras.

As amostras foram analisadas em duplicatas, sendo utilizadas duas colônias diferentes. Após a passagem das colônias, foi acrescentado 1µL de ácido fórmico a 70%, com a finalidade de extrair as proteínas ribossomais, e aguardado cerca de 10 a 15 minutos para secagem em temperatura ambiente. Em seguida foi acrescentado 1µL de solução matriz (ácido alfa-cyano-4-hidroxicinâmico diluído em 50% de acetonitrila e 2,5% de ácido trifluoroacético), mantido por 10 a 15 minutos para secagem em temperatura ambiente. As placas foram então introduzidas no aparelho Bruker Microflex LT®, no qual foram disparados 240 laser shots para gerar cada espectro. Os espectros foram analisados de acordo com o software MALDI Biotyper 2.0 (Bruker Daltonik).

Cada espectro foi analisado de acordo com o seguinte escore: amostras com escores abaixo de 1,7 foram consideradas não identificadas, escores entre 1,7 e 1,9 foram considerados confiáveis quanto à identificação de gênero, e escores acima de 2 foram considerados confiáveis para identificação de espécies (BARREIRO et al., 2010). O uso do MALDI-TOF MS foi indispensável para diferenciação das espécies de *Staphylococcus*,

principalmente entre *S. intermedius* e *S. pseudointermedius,* impossível de ser realizada fenotipicamente.

A análise foi realizada no Laboratório de Pesquisa em Qualidade do Leite (Qualileite) no Departamento de Nutrição e Produção Animal (VNP) da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo (USP), campus de Pirassununga, sob a responsabilidade do Professor Titular Marcos Veiga dos Santos.

4.8. Biologia molecular

4.8.1. Extração do ácido nucléico

O ácido nucléico total foi extraído de *Staphylococcus intermedius* e *S. pseudintermedius* obtidos do cultivo das amostras de pústulas. Para a extração foi utilizado o Kit Illustra (GE Healthcare) que consiste na digestão inicial das células de estafilococos com lisozima (10 mg/ml) e proteinase K (20 mg/ml). A seguir, 500 μl da solução de extração foi adicionada à mistura e esta centrifugada a 5.000 x g por 1 min. Em seguida, o sobrenadante foi transferido para a coluna GFX e centrifugado a 5.000 x g por 1 min. O líquido coletado foi descartado e 500 μl de solução de extração foi adicionado novamente à coluna. Após a centrifugação e descarte do líquido coletado, adicionou-se 500 μl da solução de lavagem à coluna e esta submetida à centrifugação a 14.000 x rpm por 3 min. A coluna foi transferida para um tubo de 1,5 ml e 200 μl de água Milli Q aquecida a 70^{o}C foi utilizada para a eluição. As amostras foram centrifugadas novamente a 5000 x g por 1 minuto, e a coluna de GFX desprezada. O DNA extraído foi guardado sob refrigeração a -20°C (Bannoehr et al., 2009)

4.8.2. Detecção do gene *mecA* de resistência à meticilina

As reações de PCR para a detecção do gene *mecA* (Tabela 1) foram realizadas conforme os parâmetros descritos por Murakami et al (1991). Em todas as reações realizadas serão utilizadas linhagens de referência internacional, como controle positivo (*S. aureus* ATCC 33591) e negativo (*S. aureus* ATCC 25923).

Tabela 1. Oligonucleotídeos para a detecção do gene *mecA*

Primer	Sequência de nucleotídeos	Produto amplificado
*mecA*1	AAA ATC GAT GGT AAA GGT TGG C	533 pb
*mecA*2	AGT TCT GCA GTA CCG GAT TTG C	533 pb

Fonte: Murakami et al (1991).

As amostras foram processadas no laboratório de Biologia Molecular do Instituto de Biociências da UNESP, sob a responsabilidade da Professora Adjunta Maria de Lourdes Ribeiro de Souza da Cunha.

4.9. Análise estatística

Os dados obtidos foram tabulados e estatísticas descritivas foram produzidas. O número de compostos ineficazes ou com eficácia intermediária em cada linhagem caracterizou a variável “resistência”. A distribuição desta variável foi avaliada com teses de normalidade (Shapiro-Wilk) e análise gráfica (Histograma e QQ Plot). Posteriormente, o teste de Wilcoxon não pareado bicaudal foi utilizado para avaliar a diferença entre a mediana da resistência nos grupos com e sem tratamento com antimicrobiano, nos dois gêneros bacterianos presentes no estudo. O teste de Kruskal-Wallis bicaudal foi utilizado para avaliar a diferença entre a mediana da resistência para cada enfermidade observada. A associação entre a ocorrência de linhagens MDR com as variáveis explanatórias uso de antimicrobiano, gênero bacteriano e enfermidade diagnosticada foi avaliada com o teste de Fisher. Foram consideradas diferenças estatísticas quando $P<0,05$. As análises foram realizadas com auxílio do *Statistical Analysis Software* – SAS versão 9.3 (SAS Institute, 2011).

5. RESULTADOS

Das 115 amostras coletadas, 47/115 (40,8%) foram provenientes de fêmeas e 68/115 (59,1%) de machos. A média da idade dos animais foi de 5,1 anos, com desvio padrão de 4,1, e a mediana foi de 5,0 anos, sendo que a idade mínima foi de 1 mês e a máxima foi de 14 anos. Os animais apresentavam tanto piodermite primária como secundária. As principais suspeitas e/ou diagnósticos confirmados estão descritas na Tabela 2.

TABELA 2. Principais suspeitas e/ou diagnósticos de 115 cães com piodermite atendidos no Hospital Veterinário da FMVZ/UNESP (Botucatu, SP) entre 2018-2020.

Enfermidades	Número de animais (%)
Doenças infecciosas	48 (41,7%)
Dermatopatias	40 (34,7%)
Outras	12 (10,4%)
Cardiopatias	4 (3,4%)
Nefropatias	4 (3,4%)
Neoplasias	4 (3,4%)
Neuropatias	2 (1,7%)
Endocrinopatias	1 (0,8%)

Dos 40 animais que apresentavam dermatopatias, 10 (25%) foram diagnosticados com dermatite atópica, apenas 8,7% do n total (10/115). Outras enfermidades englobam piometra, criptorquidismo, otohematoma, acidente ofídico e gastroenterite.

Dentre os animais coletados, 100 (86,9%) não estavam realizando ou haviam realizado tratamento recente com antimicrobianos. Os 15 animais (13%) que estavam sob tratamento fizeram uso dos seguintes fármacos: amoxicilina com ácido clavulânico, cefalexina, doxiciclina, metronidazol, neomicina, nitrofurantoína e rifampicina. As raças dos animais coletados estão descritas na Tabela 3.

TABELA 3. Raças dos animais que apresentavam piodermite atendidos no Hospital Veterinário da FMVZ/UNESP (Botucatu, SP) entre 2018-2020.

Raça	Número de animais (%)
S.R.D. (sem raça definida)	53 (46%)
Shih tzu	15 (13%)
Pit bull	9 (7,8%)
Yorkshire	6 (5,2%)
Poodle	5 (4,3%)
Border collie	3 (2,6%)
Daschund	3 (2,6%)
Boxer	2 (1,7%)
Maltês	2 (1,7%)
Pastor alemão	2 (1,7%)
Rotweiller	2 (1,7%)
American bully	1 (0,8%)
Bloodhound	1 (0,8%)
Blue heeler	1 (0,8%)
Bulldog francês	1 (0,8%)
Dálmata	1 (0,8%)
Fox paulistinha	1 (0,8%)
Golden retriever	1 (0,8%)
Lhasa apso	1 (0,8%)
Pug	1 (0,8%)
Teckel	1 (0,8%)
Schnauzer	1 (0,8%)
Sheep dog	1 (0,8%)
Spitz	1 (0,8%)

No cultivo microbiológico, foram obtidos 122 isolados em ágar sangue, especificados na Tabela 4, e três isolados de enterobactérias em ágar MacConkey. Não foram realizados testes bioquímicos para identificação das enterobactérias.

TABELA 4. Micro-organismos isolados de pústulas de 115 piodermites caninas atendidas no Hospital Veterinário Hospital Veterinário da FMVZ/UNESP (Botucatu, SP) entre 2018-2020.

Micro-organismos isolados	Número (%)
Staphylococcus beta hemolítico	82 (67,2%)
Staphylococcus gama hemolítico	19 (15,5%)
Staphylococcus spp.	4 (3,2%)
Streptococcus beta hemolítico	3 (2,4%)
Streptococcus spp.	3 (2,4%)
Enterobactérias	3 (2,4%)
Negativo	8 (6,5%)

As colônias morfologicamente compatíveis com *Staphylococcus* spp. (105/122) foram submetidas ao teste de catalase, no qual todas as amostras foram positivas, e coagulase, no qual 64 (60,9%) amostras foram positivas e 41 (39%) foram negativas. No manitol salt-ágar, 45 (42,8%) amostras foram consideradas positivas e 60 (57,1%) negativas. No teste da DNAse, 103 (98%) foram positivas e apenas 2 (2%) negativos. Foram enviadas 105 isolados para realização do MALDI-TOF MS, no qual 74 (70,4%) amostras foram identificadas como *Staphylococcus pseudintermedius*, 25 (23,8%) como *S. intermedius*, 1 (0,9%) como *S. epidermidis*, 1 (0,9%) como *S. haemolyticus*, 1 (0,9%) como *S. delphini*, 1 (0,9%) como *S. schleiferi* e 1 (0,9%) como *S. xylosus* e 1 (0,9%) como *Moraxella osloensis*. A Figura 1 sumariza a frequência de isolados de cada espécie.

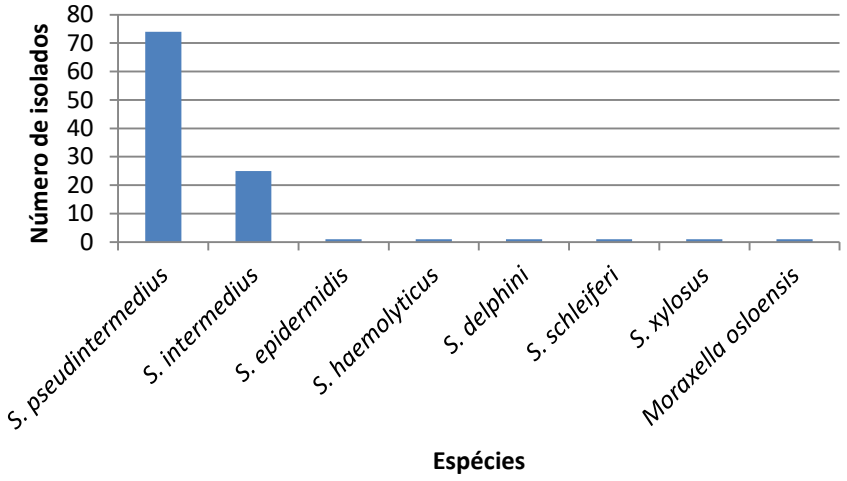

FIGURA 1. Frequência de isolados de espécies de *Staphylococcus* spp. identificados pela técnica do MALDI-TOF MS em 105 amostras de cães com piodermite atendidos no Hospital Veterinário da FMVZ/UNESP (Botucatu, SP) entre 2018-2020.

Foi realizado o teste de sensibilidade microbiana “in vitro” de todos os isolados de *Staphylococcus* spp. Foram testados 24 antimicrobianos (Tabela 5).

TABELA 5. Perfil de sensibilidade de 105 isolados de *Staphylococcus* spp. obtidos de amostras de piodermites caninas atendidas no Hospital Veterinário da FMVZ/UNESP (Botucatu, SP) em 2018-2020.

	Perfil de sensibilidade		
Antimicrobianos	S	PS	R
Amicacina	105 (100%)	0 (0%)	0 (0%)
Amox. + ácido clav.	102 (97,1%)	0 (0%)	3 (2,8%)
Ampicilina	40 (38%)	0 (0%)	65 (61,9%)
Azitromicina	94 (89,5%)	3 (2,8%)	8 (7,6%)
Cefalexina	102 (97,1%)	0 (0%)	3 (2,8%)
Cefovecin	102 (97,1%)	0 (0%)	3 (2,8%)
Ceftiofur	100 (95,2%)	0 (0%)	5 (4,7%)
Ceftriaxona	97 (92,3%)	5 (4,7%)	3 (2,8%)
Ciprofloxacino	94 (89,5%)	3 (2,8%)	8 (7,6%)
Claritromicina	94 (89,5%)	0 (0%)	11 (10,4%)
Clindamicina	95 (90,4%)	2 (1,9%)	8 (7,6%)
Cloranfenicol	99 (94,2%)	0 (0%)	6 (5,7%)
Doxiciclina	64 (60,9%)	4 (3,8%)	37 (35,2%)
Enrofloxacina	90 (85,7%)	5 (4,7%)	10 (9,5%)
Eritromicina	89 (84,7%)	5 (4,7%)	11 (10,4%)
Gentamicina	102 (97,1%)	0 (0%)	3 (2,8%)
Levofloxacino	96 (91,4%)	2 (1,9%)	7 (6,6%)
Neomicina	93 (88,5%)	3 (2,8%)	9 (8,5%)
Norfloxacina	96 (91,4%)	0 (0%)	9 (8,5%)
Oxacilina	101 (96,1%)	0 (0%)	4 (3,8%)
Penicilina	43 (40,9%)	0 (0%)	62 (59%)
Rifampicina	102 (97,1%)	0 (0%)	3 (2,8%)
Tetraciclina	65 (61,9%)	7 (6,6%)	33 (31,4%)
Tigecicline	103 (98%)	0 (0%)	2 (1,9%)

Amox + ácido clav.= Amoxicilina com ácido clavulânico; S= Sensível; PS= Parcialmente Sensível; R= Resistente

Os antimicrobianos que apresentaram menor índice de eficácia foram ampicilina (61,9%), penicilina (59%), doxiciclina (35,2%) e tetraciclina (31,4%). Foram encontradas 25/105 (23,8%) linhagens de *Staphylococcus* spp. e 4/6 (66,7%) linhagens de *Streptococcus* spp. multidroga resistentes (MDR). Dentre estas, 11 foram isoladas de filhotes, todas do gênero estafilococos. Dos cães adultos, foram isoladas 10, sendo duas linhagens de estreptococos. Dos animais idosos, foram obtidas sete MDR, das quais duas

eram estreptococos. Uma linhagem de *Staphylococcus pseudintermedius* apresentou-se resistente a 23 dos 24 antimicrobianos testados, sensível apenas a amicacina.

A Tabela 6 sintetiza os resultados obtidos após a comparação do número de antimicrobianos não efetivos entre diferentes classes, como uso de antimicrobianos recente ou no momento da coleta, gênero dos agentes isolados e enfermidade de base. Não houve diferença estatística significativa na eficácia dos antimicrobianos em nenhuma destas situações.

TABELA 6. Observações e mediana (mínimo – máximo) do número de compostos antimicrobianos não efetivos nos isolados de lesões de pele de cães atendidos no Hospital Veterinário da FMVZ/UNESP (Botucatu, SP) em 2018-2020, distribuídos por diferentes classes.

Classe	N	Mediana (Min-Máx)	Valor P
Sem antimicrobiano	97	2 (0-17)	
Com antimicrobiano	14	4 (0-23)	0,0879
Staphylococcus spp.	105	2 (0-23)	
Streptococcus spp.	6	4,5 (1-20)	0,1084
Cardiopatia	4	2 (0-6)	
Dermatopatias	41	2 (0-23)	
Doenças infecciosas	46	2 (0-9)	
Endocrinopatias	1	4 (4-4)	
Nefropatias	5	17 (4-20)	
Neoplasia	3	4 (2-6)	
Neuropatias	2	3,5 (0-7)	
Outros	9	2 (0-17)	0,1151
Total	**111**	**2 (0-23)**	

Foi também observado a quantidade de isolados multirresistentes distribuídos de acordo com as mesmas classes da tabela anterior. Houve diferença estatística

significativa apenas em relação ao gênero dos isolados, indicando *Streptococcus* spp. com maior índice de resistência aos antimicrobianos (Tabela 7).

TABELA 7. Número e proporção de linhagens Multidrogas Resistentes (MDR) isoladas em lesões de pele de cães atendidos no Hospital Veterinário da FMVZ/UNESP (Botucatu, SP) em 2018-2020, distribuídos por diferentes classes.

Classe	N	MDR (%)	Valor P
Sem antimicrobiano	97	23 (23,7%)	
Com antimicrobiano	14	6 (42,9%)	0,1894
Staphylococcus spp.	105	25 (23,8%)	
Streptococcus spp.	6	4 (66,7%)	**0,0393**
Cardiopatia	4	1 (25%)	
Dermatopatias	41	12 (29,3%)	
Doenças infecciosas	46	8 (17,4%)	
Endocrinopatias	1	0 (0%)	
Nefropatias	5	3 (60%)	
Neoplasia	3	1 (33,3%)	
Neuropatias	2	1 (50%)	
Outros	9	3 (33,3%)	0,339
Total	**111**	**29 (26,13%)**	

Valor P < 0,05 indica diferença estatística (Teste de Fisher)

Os isolados de *S. intermedius* e *S. pseudointermedius* (100 isolados) foram submetidos à técnica do PCR para detecção do gene mecA. Destes, apenas dois isolados de *S. pseudintermedius* (2/100; 2%) apresentaram o gene acima referido. A linhagem de *Staphylococcus pseudintermedius* resistente a 23 dos 24 antimicrobianos testados foi uma das amostras positivas para o gene.

6. DISCUSSÃO

O presente estudo possibilitou identificar os principais agentes bacterianos causadores de piodermites em cães atendidos no Hospital Veterinário da FMVZ-UNESP de Botucatu, o perfil de sensibilidade a antimicrobianos destes, e a detecção do gene *mecA*. A maioria dos isolados obtidos pertencia aos gêneros *Staphylococcus* spp. e *Streptococcus* spp. Foi encontrado a prevalência de 70,4% (74/105) de *S. pseudointermedius*, corroborando com resultados encontrados por Onuma et al. no Japão (2012), que identificaram isolados de piodermites caninas em dois períodos, 1999-2000 e em 2009, observando que a prevalência de *S. pseudintermedius* foi de 76,1% e 76,4%, respectivamente, similar ao estudo realizado por Kawakami et al. em 2010 no mesmo país (89,5%). Este último identificou a prevalência de 10,5% da espécie *S. schleiferi*, diferente do valor encontrado no presente estudo, que foi 0,95% (1/105). Apesar do contato entre humanos e animais de estimação estar cada vez mais estreito e cães já serem considerados reservatórios de SARM, neste estudo não foi obtido nenhum isolado de *S. aureus*, resultado diferente do observado por Loeffler et al.(2005), em Londres, que identificou 8,9% (4/45) de *S. aureus* em amostras de cães em ambiente hospitalar, independente da enfermidade. Bem como em Coro, Venezuela, López et al. (2019) identificaram a prevalência de 35,6% (16/45) de isolados de *S. aureus* causadores de piodermite em cães, prevalência alta que reforça a preocupação no quesito saúde pública, dado a proximidade entre cães e seus tutores.

Sobre a identificação de espécie do gênero *Staphylococcus*, é importante salientar as limitações do diagnóstico microbiológico convencional, que impossibilita diferenciar fenotipicamente bactérias pertencentes ao SIG. O PCR é a técnica considerada padrão ouro, mas a espectrometria de massas (MALDI-TOF MS) vem ganhando cada vez mais destaque neste cenário (ALCALÁ et.al, 2015). Estudo realizado na Espanha em 2015 por Alcalá et al. comparou a eficácia do MALDI-TOF MS na identificação de *S. aureus*, *S. intermedius* e *S. pseudointermedius* frente às técnicas de PCR e cultivo convencional. O MALDI-TOF MS mostrou-se eficaz na distinção de *S. pseudointermedius,* previamente identificados como *S. intermedius* pelo método de cultivo convencional. Com relação à identificação de *S. aureus*, o MALDI-TOF MS foi extremamente sensível. Todas as bactérias foram submetidas à técnica padrão ouro de biologia molecular. De forma similar, no presente estudo houve discrepância entre as identificações obtidas pelo método convencional e os resultados do MALDI-TOF MS, principalmente com relação às provas

de coagulase e manitol salt-ágar, reforçando a necessidade de técnicas mais específicas na identificação de bactérias do SIG.

Apesar da baixa prevalência de isolados de *Streptococcus* spp. como causador de piodermite canina encontrada neste estudo (6/115), este gênero merece atenção devido ao alto índice de resistência aos antimicrobianos apresentada. Houve diferença estatística ($p<0,05$) entre a porcentagem de *Streptococcus* spp. multidrogarresistentes (MDR), que foi de 66,7% (4/6), sendo que a porcentagem de *Staphylococcus* spp. MDR foi de 23,8% (25/105). A despeito da baixa participação nesta afecção de pele, o alto índice de resistência gera preocupação em se tratando de outras patologias causadas por esse agente. Já foi descrita a presença de *Streptococcus* spp. em amostras de cães que apresentavam ceratoconjuntivite seca (ORIA et al., 2013) e infecção urinária (MIYABE et al., 2016).

Com relação à resistência apresentada pelos isolados do gênero *Staphylococcus,* Onuma et al. (2012) observaram taxas de 75% (1999-2000) e 62% (2009) de resistência a ampicilina, 45% (1999-2000) e 48,4% (2009) de resistência a tetraciclina e 35% (1999-2000) e 15,2% (2009) de resistência ao cloranfenicol, considerando-se apenas estirpes de *S. pseudintermedius*. Neste estudo, foram consideradas todas as espécies isoladas de *Staphylococcus* spp. no perfil de sensibilidade. As frequências de resistência verificadas a ampicilina e a tetraciclina foram semelhantes às encontradas por Onuma et al. (2012), 61,9% e 31,4%, respectivamente. A ineficácia destes fármacos pode estar relacionada com a frequência do uso dos mesmos, o que aumenta a pressão de seleção de micro-organismos resistentes. A tetraciclina, por exemplo, já foi extensamente utilizada no tratamento de diversas enfermidades veterinárias, entre elas, enfermidades dermatológicas. No entanto, no presente estudo foi observada uma taxa de apenas 5,7% de resistência ao cloranfenicol, corroborando com as taxas encontradas no Reino Unido, onde este antimicrobiano é pouco utilizado para tratamentos dermatológicos, apresentando boa eficácia (SCHWARZ; NOBLE, 1999).

Na Austrália, uma pesquisa realizada por Bean e Wigmore (2016) apontou maiores ocorrências de resistência para penicilina, doxiciclina e tetraciclina em isolados de *S. pseudintermedius*, com a diferença dos isolados serem provenientes de cães saudáveis no período da coleta. Fora estes antimicrobianos, as taxas de resistência foram baixas. Dos 102 *S. pseudointermedius* isolados, apenas um foi confirmado como SPRM, através da detecção do gene *mecA* por PCR. De forma semelhante, foi observada nesse estudo alta resistência para doxiciclina. No Brasil, país considerado endêmico para

hemoparasitoses, esta droga é amplamente utilizada (SANTARÉM e AGUIAR, 2016), o que pode justificar a alta frequência de resistência *in vitro* observada (35,2%).

Este estudo possibilitou comparar a presença de MDR e a quantidade de fármacos ineficazes em cães sob tratamento ou que haviam realizado tratamento recente com antimicrobianos. Não houve diferença estatística entre estes grupos, resultado similar ao encontrado por Botoni (2014), que não observou correlação significativa entre antibioticoterapia prévia e presença do gene *mecA*. Da mesma forma, foi observada alta prevalência de estafilococos MDR em filhotes (11/105), que tiveram menos tempo de exposição a antimicrobianos se comparados aos animais considerados adultos e idosos. Estes dados contradizem a hipótese proposta por Hensel et al. (2016) e por Zur et al. (2016), que sugerem que a exposição prévia a antimicrobianos pode ser um fator de risco na seleção de SPRM.

Neste estudo, das 100 linhagens enviadas para PCR, apenas duas linhagens (2%) de *S. pseudointermedius* apresentavam o gene *mecA*, sendo uma delas a linhagem resistente a 23 dos 24 antimicrobianos testados. Esse resultado difere do encontrado no estudo realizado por Botoni et al. (2016), também no Brasil, que constatou 37% da prevalência do gene. Da mesma forma, estudos realizados na Coreia por Kang et al. (2017) e no Reino Unido por Clark et al. (2016), encontraram alta prevalência do gene *mecA* em *S. pseudintermedius*, 41,9% e 49,4%, respectivamente.

Apesar da baixa prevalência do gene *mecA* encontrada neste estudo, salienta-se a alta ocorrência de linhagens MDR encontradas, alertando para risco de infecções por *S. pseudintermedius* multirresistentes em cães e humanos, devido ao seu potencial zoonótico. Na Espanha, foi descrita a presença de linhagem de *S. pseudintermedius* fenotípica e geneticamente semelhantes em quatro pacientes humanos atendidos em um hospital e cães com os quais três destes pacientes tiveram contato. Três pacientes apresentavam lesões de pele, um era paciente oncológico. As linhagens isoladas dos cães e dos humanos apresentavam o mesmo perfil de resistência antimicrobiana (LOZANO et al., 2017). No Canadá, foi observada prevalência de 75% (18/24) de *S. pseudintermedius* em pacientes humanos com lesões de pele e tecidos moles. Os pacientes não necessariamente apresentavam outras comorbidades (SOMAYAJI et al., 2016). Ambos estudos sugerem a transmissão de linhagens entre cão-humano, reforçando a necessidade de atenção para o contato cada vez mais estreito entre cães e seus donos, tornando-se uma questão de grande importância no que concerne a saúde pública.

Infere-se a prevalência do gênero *Staphylococcus* spp. nas piodermites caninas, particularmente *S. pseudintermedius*, ressaltando este micro-organismo como principal causador desta afecção dermatológica. Bem como a presença do gene *mecA* nesta espécie reforça a preocupação no que concerne à Saúde Pública, indicando cães como possíveis carreadores de linhagens de *S. pseudintermedius* resistentes e de alta patogenicidade para humanos e outros animais.

7. DIFICULDADES E LIMITAÇÕES DO ESTUDO

Um dos pontos críticos observados no decorrer do presente estudo foi a obtenção das amostras, uma vez que foi diretamente influenciada pela casuística de piodermites na rotina do Hospital Veterinário. Além disso, a necessidade de pústulas íntegras no momento da coleta também foi determinante, pois em muitos casos os animais chegavam para atendimento já sem pústulas, apresentando apenas crostas melicéricas e colaretes epidérmicos, impossibilitando a coleta de material. Dessa forma, o número de amostras coletadas foi de 115, abaixo do proposto (n=134).

Outra limitação foi o fato de não serem testados neste estudo outros genes capazes de conferir aos micro-organismos mecanismos de resistência, como os genes *mecB* e *mecC*.

8. CONCLUSÕES

1. O predomínio *S. pseudintermedius* isolados de piodermites caninas ressalta o micro-organismo como principal agente em infecções de pele nos cães;

2. *S. aureus*, considerada a espécie de estafilococos mais patogênica para os humanos, não foi identificada em nenhuma das amostras processadas, apesar da relação entre humanos e *pets* apresentar-se cada vez mais próxima;

3. Os fármacos menos efetivos foram ampicilina, penicilina e tetraciclina, o que pode ser explicado pelo uso muito difundido destes antimicrobianos durante os anos. Os demais antimicrobianos testados apresentaram boa eficácia. Salienta-se a necessidade de testes de sensibilidade *in vitro* para o correto tratamento de infecções em cães, incluindo piodermites, visando evitar a pressão de seleção de micro-organismos resistentes.

4. A identificação do gene *mecA* em *S. pseudointermedius*, ainda que em baixa frequência, sugere que os cães com piodermite podem carrear linhagens resistentes, com potencial patogênico para humanos e outros animais.

9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALCALÁ, L. SIMÓN, M. C.; LÓPEZ-CALLEJA, A. I.; FERRER, I.; PEREIRA, J.; ORTEGA, C.; TORRES, C.; VIGUERA, N.; GÓMEZ-SANZ, E.; REVILLO, M. J.; REZUSTA, A. **Idoneidad del uso del MALDI-TOF MS para la identificación de Staphylococcus aureus y miembros del grupo de Staphylococcus intermedius (SIG)**. 2015.

BANNOEHR, J; FRANCO, A; LURESCIA, M; BATTISTI, A; FITZGERALD, JR. Molecular Diagnostic Identification of *Staphylococcus pseudintermedius.* J Clin Microb. 2009; 47(2): 469-71.

BANNOEHR, J.; GUARDABASSI, L. Staphylococcus pseudintermedius in the dog: taxonomy, diagnostics, ecology, epidemiology and pathogenicity. **Veterinary dermatology**, v. 23, n. 4, p. 253-e52, 2012.

BARREIRO, J. R. et al. Identification of subclinical cow mastitis pathogens in milk by matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry. **Journal of dairy science**, v. 93, n. 12, p. 5661-5667, 2010.

BÄUMER, W.; BIZIKOVA, P.; JACOB, M.; LINDER, K. E. Establishing a canine superficial pyoderma model. **Journal of applied microbiology**, v. 122, n. 2, p. 331-337, 2017.

BEAN, D. C.; WIGMORE, S. M. Carriage rate and antibiotic susceptibility of coagulase-positive staphylococci isolated from healthy dogs in Victoria, Australia. **Australian veterinary journal**, v. 94, n. 12, p. 456-460, 2016.

BECK, K. M.; WAISGLASS, S. E.; DICK, H. L. N.; WEESE, J. S. Prevalence of meticillin-resistant Staphylococcus pseudintermedius (MRSP) from skin and carriage sites of dogs after treatment of their meticillin-resistant or meticillin-sensitive staphylococcal pyoderma. **Veterinary dermatology**, v. 23, n. 4, p. 369, 2012.

BENITES, N. R.; MELVILLE, P. A.; RIBEIRO, M. G. Estaficcociais. In MEGID, J.; RIBEIRO, M. G.; PAES, A. C. **Doenças infecciosas em animais de produção e de companhia.** Rio de Janeiro: Editora Roca, 1 ed., 2016, cap. 29, pág. 300-314.

BOTONI, L. S. Prevalência de Staphylococcus pseudintermedius resistente à meticilina (MRSP) em cães com piodermite atendidos no Hospital Veterinário da UFMG entre março e julho de 2013. 2014.

BOTONI, L. S.; FILHO, N. P. R.; SCHERER, C. B.; BRAGA, L.; LEME, F. O. P.; BICALHO, A. P. C. V. Piodermite superficial canina por Staphylococcus pseudintermedius resistente à meticilina (MRSP).**Medvep Dermato - Revista de Educação Continuada em Dermatologia e Alergologia Veterinária** (2014); 3(10); 270-277

BOTONI, L. S.; SCHERER, C. B.; SILVA, R. O.; COURA, F. M.; HEINEMANN, M. B.; LEME, F. O. P.; VAL, A. P. C. Prevalence and in vitro susceptibility of methicillin-resistant Staphylococcus pseudintermedius (MRSP) from skin and nostrils of dogs with superficial pyoderma. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 36, n. 12, p. 1178-1180, 2016.

BOTONI, L. S. Aspectos clínicos e epidemiológicos e avaliação da disbiose cutânea em cães com dermatite atópica. 2018.

BRYAN, J., FRANK, L., ROHRBACH, B. W., BURGETTE, L., J., CAIN, C. L., & BEMIS, D. A. Treatment outcome of dogs with meticillin-resistant and meticillin-susceptible Staphylococcus pseudintermedius pyoderma. **Veterinary dermatology**, v. 23, n. 4, p. 361, 2012.

CLARK, S. M.; LOEFFLER, A.; SCHIMIDT, V. M.; CHANG, Y. M.; WILSON, A.; TIMOFTE, D.; BOND, R. Interaction of chlorhexidine with tris EDTA or miconazole in vitro against canine meticillin-resistant and-susceptible Staphylococcus pseudintermedius isolates from two UK regions. **Veterinary dermatology**, v. 27, n. 5, p. 340-e84, 2016.

CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE, 2018. Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Tests for Bacteria Isolated from Animals, CLSI, 4th ed.

COCHRAN, W. **Sampling techniques.** 3 ed. New York: John Wiley, 1977. 448 p.

COELHO, S. M. de O.; MORAES, R. A. M.; SOARES, L. C.; PEREIRA, I. A.; GOMES, L. P.; SOUZA, M. M. S. Mapeamento do perfil de resistência e detecção do gene mecA em Staphylococcus aureus e Staphylococcus intermedius oxacilina-resistentes isolados de espécies humanas e animais. **Ciência rural**, v. 37, n. 1, p. 195-200, 2007.

GOODMAN, L. A. Simultaneous confidence intervals for contrasts among multinomial populations. **Annals of Mathematical Statistics,** v. 35, n. 2, p. 716-725, 1964.

1138 GOODMAN, L. A. On silmultaneous confidence intervals for multinomial proportions.
1139 **Technometrics**, v. 7, n. 2, p. 247-254, 1965.

1140 GUARDABASSI, L.; LOEBER, M. E.; JACOBSON, A. Transmission of multiple
1141 antimicrobial-resistant Staphylococcus intermedius between dogs affected by deep
1142 pyoderma and their owners. **Veterinary microbiology**, v. 98, n. 1, p. 23-27, 2004.

1143 HENSEL, N.; ZABEL, S.; HENSEL, P. Prior antibacterial drug exposure in dogs with
1144 meticillin-resistant Staphylococcus pseudintermedius (MRSP) pyoderma. **Veterinary**
1145 **dermatology**, v. 27, n. 2, p. 72-e20, 2016.

1146 HILLIER, A.; LLOYD, D. H.; WEESE, J. S.; BLONDEAU, J. M.; BOOTHE, D.;
1147 BREITSCHWERDT, E.; GUARDABASSI, L.; PAPICH, M. G.; RANKIN, S.; TURNIDGE, J.
1148 D.; SYKES, J. E. Guidelines for the diagnosis and antimicrobial therapy of canine
1149 superficial bacterial folliculitis (A ntimicrobial G uidelines W orking G roup of the I
1150 nternational S ociety for C ompanion A nimal I nfectious D iseases). **Veterinary**
1151 **dermatology**, v. 25, n. 3, p. 163-e43, 2014.

1152 HOFFMANN, A. R.; PATTERSON, A. P.; DIESEL, A.; LAWHON, S. D.; LY, H. J.;
1153 STEPHENSON, C. E.; MANSELL, J.; STEINER, J. M.; DOWD, S. E.; OLIVRY, T.;
1154 SUCHODOLSKI, J. S. The skin microbiome in healthy and allergic dogs. PLoS ONE, v. 9,
1155 n. 1, 2014.

1156 HOLM, B. R., PETERSSON, U., BERGSTRÖM, K., & FRANKLIN, A. Antimicrobial
1157 resistance in staphylococci from canine pyoderma: a prospective study of first-time and
1158 recurrentcases in Sweden. **PUBLIC HEALTH**, v. 16, p. 1-6, 2002.

1159 KANG, J. H.; CHUNG, T. H; HWANG, C. Y. Clonal distribution of methicillin-resistant
1160 Staphylococcus pseudintermedius isolates from skin infection of dogs in
1161 Korea. **Veterinary microbiology**, v. 210, p. 32-37, 2017.

1162 KATEETE, D. P.; KIMANI, C. N.; KATABAZI, F. A.; OKENG, A.; OKEE, M. S.; NANTEZA,
1163 A.; JOLOBA, M. L.; NAJJUKA, F. C. Identification of Staphylococcus aureus: DNase and
1164 Mannitol salt agar improve the efficiency of the tube coagulase test. **Annals of clinical**
1165 **microbiology and antimicrobials**, v. 9, n. 1, p. 23, 2010.

1166 KAWAKAMI, T., SHIBATA, S., MURAYAMA, N., NAGATA, M., NISHIFUJI, K., IWASAKI,
1167 T., & FUKATA, T. . Antimicrobial susceptibility and methicillin resistance in Staphylococcus
1168 pseudintermedius and Staphylococcus schleiferi subsp. coagulans isolated from dogs with

pyoderma in Japan. **Journal of Veterinary Medical Science**, v. 72, n. 12, p. 1615-1619, 2010.

LATRONICO, F.; MOODLEY, A.; NIELSEN, S. S.; GUARDABASSI, L. Enhanced adherence of methicillin-resistant Staphylococcus pseudintermedius sequence type 71 to canine and human corneocytes. **Veterinary research**, v. 45, n. 1, p. 70, 2014.

LOEFFLER, A.; BOAG, A. K.; SUNG, J.; LINDSAY, J. A.; GUARDABASSI, L.; DALSGAARD, A.; SMITH, H.; STEVENS, K. B.; LLOYD, D. H. Prevalence of methicillin-resistant Staphylococcus aureus among staff and pets in a small animal referral hospital in the UK. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 56, n. 4, p. 692-697, 2005.

LOEFFLER, A.; LLOYD, D. H. What has changed in canine pyoderma? A narrative review. **The Veterinary Journal**, v. 235, p. 73-82, 2018.

LÓPEZ, G. M.; OBERTO, V. C.; PORTILLO, L. C. Susceptibilidad antimicrobiana de estafilococos aislados en piodermas de caninos de Coro, Venezuela. **Revista de Investigaciones Veterinarias del Perú**, v. 30, n. 1, p. 404-422, 2019.

LOZANO, C.; REZUSTA, A.; FERRER, I.; PÉREZ, V. L.; ZARAZAGA, M.; RUIZ-RIPA, L.; REVILLO, M. J.; TORRES, C. Staphylococcus pseudintermedius human infection cases in Spain: dog-to-human transmission. **Vector-Borne and Zoonotic Diseases**, v. 17, n. 4, p. 268-270, 2017.

MAGIORAKOS, A.-P.; SRINIVASAN, A.; CAREY, R. B.; CARMELI, Y.; FALAGAS, M. E.; GISKE, C. G.; HARBARTH, S.; HINDLER, J. F.;KAHLMETER, G.; LILJEQUIST, B. O.; PATERSON, D. L.; RICE, L. B.; STELLING, J.; STRUELENS, M. J.; VATOPOULOS, A.; WEBER, J. T.; MONNET, D. I. Multidrug-resistant, extensively drug-resistant and pandrug-resistant bacteria: an international expert proposal for interim standard definitions for acquired resistance. **Clinical microbiology and infection**, v. 18, n. 3, p. 268-281, 2012.

MIMICA, L. M. J.; MENDES, C. M. F.; MIMICA, I. M. Controle laboratorial do tratamento das infecções bacterianas. In: TRABULSI, L. R.; ALTERTHUM, F. **Microbiologia.** São Paulo: Editora Atheneu, 4 ed., 2005, cap. 11, pág. 91-97.

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

MIYABE, F. M.; MAINARDI, R. M.; FACIMOTO, C. T.; PEREIRA, U. BACTÉRIAS CAUSADORAS DE INFECÇÃO URINÁRIA EM CÃES E GATOS E SEU PERFIL DE RESISTÊNCIA AOS ANTIMICROBIANOS.

MURAKAMI, K; MINAMIDE, W; WADA, K; NAKAMURA, E; TERAOKA, H; WATANABE, S. Identification of methicillin-resistant strains of staphylococci by polymerase chain reaction. **J Clin Microbiol**. 1991;29(10):2240-4.

MURRAY, A. K.; LEE, J.; BENDALL, R.; ZHANG, L.; SUNDE, M.; SLETTEMEAS, J. S.; GAZE, W.; PAGE, A. J.; VOS, M. Staphylococcus cornubiensis sp. nov., a member of the Staphylococcus intermedius Group (SIG). **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 68, n. 11, p. 3404-3408, 2018.

NIENHOFF, U.; KADLEC, K.; CHABERNY, I. F.; VERSPOHL, J.; GERLACH, G. R.; KREIENBROCK, L.; SCHWARZ, S.; SIMON, D.; NOLTE, I. Methicillin-resistant Staphylococcus pseudintermedius among dogs admitted to a small animal hospital. **Veterinary microbiology**, v. 150, n. 1-2, p. 191-197, 2011.

ONUMA, K.; TANABE, T.; SATO, H. Antimicrobial resistance of Staphylococcus pseudintermedius isolates from healthy dogs and dogs affected with pyoderma in Japan. **Veterinary dermatology**, v. 23, n. 1, p. 17, 2012.

ORIA, A. P.; PINNA, M. H., FURTADO, M. A., PINHEIRO, A. C. O., GOMES JUNIOR, D. C., & COSTA NETO, J. M. Microbiota conjuntival em cães clinicamente sadios e cães com ceratoconjuntivite seca. **Ciência Animal Brasileira**, v. 14, n. 4, p. 495-500, 2013.

PELLERIN, J. L.; BOURDEAU, P.; SEBBAG, H; PERSON, J. M. Epidemiosurveillance of antimicrobial compound resistance of Staphylococcus intermedius clinical isolates from canine pyodermas. **Comparative immunology, microbiology and infectious diseases**, v. 21, n. 2, p. 115-133, 1998.

QUINN, P. J.; MARKEY, B. K.; LEONARD, F. C.; FITZPATRICK, E. S.; FANNING, S.; HARTIGAN, P. J.**Veterinary Microbiology and Microbial Disease.**2 ed. Oxford: Blackwell Science Ltd., 2011, 1231p.

REINER, K. Catalase test protocol. **American Society For Microbiology, ASMMicrobeLibrary**, 2010.

SANTARÉM, V. A.; AGUIAR, D. M. Erliquiose Canina. In: MEGID, J.; RIBEIRO, M; G. PAES, A. C. **Doenças Infecciosas em Animais de Produção e Companhia.** Rio de Janeiro, Roca, 2016. p. 95-111.

SANTORO, D. 29th Proceedings of the North American Veterinary Dermatology Forum. AMP's structure and function. 2015.

SCHWARZ, STEFAN; NOBLE, WILLIAM C. Aspects of bacterial resistance to antimicrobials used in veterinary dermatological practice. **Veterinary dermatology**, v. 10, n. 3, p. 163-176, 1999.

SIAK, M.; BURROWS, A. K.; COOMBS, G. W.; KHAZANDI, M.; ABRAHAM, S.; NORRIS, J. M.; WEESE, J. S.; TROTT, D. J. Characterization of meticillin-resistant and meticillin-susceptible isolates of Staphylococcus pseudintermedius from cases of canine pyoderma in Australia. **Journal of medical microbiology**, v. 63, n. 9, p. 1228-1233, 2014.

SILVA, E. B. D. Identificação e perfil de resistência a antimicrobianos de Staphylococcus pseudintermedius isolados de piodermite canina. Dissertação de Mestrado em Medicina Veterinária pela Universidade Federal de Viçosa, Minas Gerais, 2012.

SOMAYAJI, R.; RUBIN, J. E.; PRIYANTHA, M. A. R.; CHURCH, D. Exploring Staphylococcus pseudintermedius: an emerging zoonotic pathogen?. 2016.

SOMAYAJI, R.; PRIYANTHA, M. A. R., RUBIN, J. E., CHURCH, D. Human infections due to Staphylococcus pseudintermedius, an emerging zoonosis of canine origin: report of 24 cases. **Diagnostic microbiology and infectious disease**, v. 85, n. 4, p. 471-476, 2016.

SUMMERS, J. F.; HENDRICKS, A.; BRODBELT, D. C. Prescribing practices of primary-care veterinary practitioners in dogs diagnosed with bacterial pyoderma. **BMC veterinary research**, v. 10, n. 1, p. 240, 2014.

TRABULSI, L. R.; MIMICA, I. M.; MIMICA, L. M. J. Características dos principais grupos de antibacterianos: espectro de ação e indicações. In: TRABULSI, L. R.; ALTERTHUM, F. **Microbiologia.** São Paulo: Editora Atheneu, 4 ed., 2005, cap. 10, p. 85-89.

VAN DUIJKEREN, E.; KAMPHUIS, M.; VAN DER MIJE, I. C.; LAARHOVEN, L. M.; DUIM, B.; WAGENAAR, J. A.; HOUWERS, D. J. Transmission of methicillin-resistant Staphylococcus pseudintermedius between infected dogs and cats and contact pets,

humans and the environment in households and veterinary clinics. **Veterinary microbiology**, v. 150, n. 3-4, p. 338-343, 2011.

ZUR, GILA; GUREVICH, BELLA; ELAD, DANIEL. Prior antimicrobial use as a risk factor for resistance in selected Staphylococcus pseudintermedius isolates from the skin and ears of dogs. **Veterinary dermatology**, v. 27, n. 6, p. 468-e125, 2016.

ANEXO 1

unesp UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA "JÚLIO DE MESQUITA FILHO"

fmvz - unesp
Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia
Campus de Botucatu

ATESTADO

Atesto que o Projeto "PERFIL EPIDEMIOLÓGICO E DE RESISTÊNCIA DE PIODERMITES CANINAS ATENDIDAS NA FMVZ – UNESP – BOTUCATU" **Protocolo CEUA 0149/2018** , a ser conduzido por Mariana de Araujo Carvalho, responsável/orientador Luiz Henrique de Araujo Machado, para fins de pesquisa científica/ensino - encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 08 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal - CONCEA.

Finalidade	PESQUISA CIENTÍFICA
Vigência do projeto	02/07/2018 a 28/02/2020
Nome Comum / Espécie / Linhagem	CANINA / CANIS LUPUS FAMILIARIS / variado
Raça	variado
Nº de animais machos	0
Nº de animais fêmeas	0
Nº de animais sexo indefinido	134
Peso médio de animais machos	0
Peso médio de animais fêmeas	0
Peso médio de animais sexo indefinido	10
Idade	5 ano(s) e 0 mes(es) e 0 dia(s).
Procedência	Rotina serviço de dermatologia

Projeto de Pesquisa aprovado em reunião da CEUA em 21/06/2018

JOSÉ NICOLAU PRÓSPERO PUOLI FILHO
Presidente da CEUA da FMVZ, UNESP - Campus de Botucatu

Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia
Seção Técnica Acadêmica
Rua Prof. Dr. Walter Maurício Corrêa, s/n
UNESP - Campus de Botucatu/SP - Cep 18618-681
(14) 3880-2176 - pamposa@fmvz.unesp.br - www.fmvz.unesp.br

Scanned by CamScanner

ANEXO 2

Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

Declaro para os devidos fins que estou ciente e autorizo a realização do Projeto de Pesquisa intitulado Perfil epidemiológico e de resistência de piodermites caninas atendidas na FMVZ – UNESP Botucatu, de responsabilidade de Luiz Henrique de Araujo Machado.

Descrição detalhada dos procedimentos, em linguagem não científica: coleta de secreção de pústulas para cultivo microbiológico e detecção de possíveis bactérias, bem como identificação e classificação destas, usando técnicas de biologia molecular.

Nome do animal ou Número de animais de produção: _____

NOME DO

RESPONSÁVEL: _____

RG:_____ Data:___/ __ / ___

Assinatura:_____

10. ARTIGO

Identification of the *mec*A gene in *Staphylococcus pseudintermedius* isolated from canine pyoderma

Mariana de Araujo Carvalho[1], André da Rocha Mota[2], Carolina Lechinski de Paula[2], Fábio Vinícius Ramos Portilho[2], Núbia Heloísa Felipeti[1], Fernando José Paganini Listoni[2], Maria de Lourdes Ribeiro de Souza da Cunha[3], Maria Lúcia Gomes Lourenço[1], Antônio Carlos Paes[2], Luiz Henrique de Araújo Machado[1]

1 Department of Veterinary Clinic, School of Veterinary Medicine and Animal Sciences, São Paulo State University – UNESP, Botucatu, Brazil

2 Department of Animal Production and Preventive Veterinary Medicine, School of Veterinary Medicine and Animal Sciences, São Paulo State University – UNESP, Botucatu, Brazil

3 Department of Microbiology and Immunology, Institue of Biosciences, São Paulo State University – UNESP, Botucatu, Brazil

Correspondence: Luiz Henrique de Araújo Machado, Department of Veterinary Clinic, School of Veterinary Medicine and Animal Sciences, UNESP, Botucatu, SP, Brazil. E-mail: henrique.machado@unesp.br

SIGNIFICANCE AND IMPACT OF THE STUDY:

The increasing proximity between humans and dogs favors the transfer of resistance genes between *S. pseudintermedius* and *S. aureus*, the latter being of great importance in human health. Given these factors, resistant bacteria that cause pyoderma in dogs become a problem not only in veterinary medicine, but also in public health. In this study, the predominance of *S. pseudintermedius* isolated from canine pyoderma highlighted the microorganism as the main agent in skin infections in dogs. Of all isolated *Staphylococcus* spp, 23.8% were considered multidrug resistant, and two strains of *S. pseudintermedius* were positive for the *mec*A resistance gene. The identification of the *mec*A gene in this species, albeit at a low frequency, suggests that dogs with pyoderma can carry resistant strains, with pathogenic potential to humans and other animals.

ABSTRACT:

Pyoderma are among the main dermatological conditions seen in the routine of pet veterinary clinic. They are commonly caused by *Staphylococcus pseudintermedius* and the treatment is based on antimicrobial therapy, often instituted without microbiological diagnosis and previous “in vitro” sensitivity tests, increasing the selective pressure for resistant microorganisms. The process of transferring resistance genes between different bacterial strains represent a problem for veterinary and human medicine. The objective of this work was to identify the main pathogens isolated from canine pyoderma treated at a veterinary hospital in Brazil, as well as the antimicrobial resistance profile and the presence of the *mec*A resistance gene in the isolates. Of the isolates, 70.4% were confirmed as *Staphylococcus pseudintermedius* based on the MALDI-TOF MS technique, followed by *S. intermedius* (23.8%). A higher rate of resistance to the drugs ampicillin (61.9%), penicillin (59%), doxycycline (35.2%) and tetracycline (31.4%) was observed. 29/111 (26.1%) multidrug resistant strains of staphylococci and streptococci (MDR) were found. 71 strains of *S. intermedius* and *S. pseudintermedius* were sent to Polymerase Chain Reaction (PCR), of which only two strains of *S. pseudointermedius* were positive for the *mec*A gene. The high frequency found of MDR and the identification of the *mec*A gene generates concern in Public Health, considering the zoonotic potential of *S. pseudintermedius* and the increasingly close contact between humans and dogs.

INTRODUCTION:

Dermatological diseases in dogs are listed among the main causes of care in the veterinary clinical routine. It is estimated that 40% of dogs undergoing veterinary examination have clinical dermatological

signs as the main complaint or secondary to other conditions (BOTONI et al., 2014). Due to the high occurrence, pyoderma are among the main reasons for prescribing antimicrobials in the veterinary routine (LOEFFER; LLOYD, 2018). In addition to controlling the underlying cause, the treatment of pyoderma is based on antimicrobial, topical and/or systemic therapy, preferably accompanied by microbiological diagnosis and “in vitro” sensitivity tests, which are often not performed, and empirical treatment is instituted, increasing the risk of selection pressure of resistant microorganisms (HOLM et al., 2002; KAWAKAMI et al., 2010; BRYAN et al., 2012; HILLIER et al., 2013).

Staphylococcus pseudintermedius is the main bacterial pathogen involved in canine pyoderma. A component of the dogs' skin microbiota, present in hair follicles and hair, it develops a symbiosis relationship with the host, preventing the colonization and infection of other pathogens (BANNOEHR; GUARDABASSI, 2012; BOTONI et al., 2014). It is estimated that the prevalence of this microorganism in healthy dogs varies between 46 and 92%, depending on the population and methodology used (LATRONICO et al., 2014).

Formerly called *Staphylococcus intermedius*, the agent has been reclassified to the *Staphylococcus intermedius* (GSI) group, which includes *S. pseudintermedius*, *S. intermedius* and *S. delphini* (ONUMA et al, 2012). Since reclassification, it is common sense that all isolates from dogs are called *S. pseudintermedius*, unless a genetic diagnosis is made. This species is characterized by medium pigmented colonies with incomplete gamma-hemolysis or beta-hemolysis on sheep or bovine blood agar medium. Among the virulence factors, we can mention the production of enzymes, surface proteins, the ability to form biofilms, and the production of toxins (BANNOEHR; GUARDABASSI, 2012; LATRONICO et al., 2014).

Due to the ever closer contact between humans and pets, *S. pseudointermedius* is currently considered an important pathogen with zoonotic potential. In humans, cases of infections have been described in which *S. pseudintermedius* was isolated, contradicting the hypothesis that *S. aureus* would be isolated. The most common cases of human infection with this pathogen were skin diseases and animal bite wounds. Although there is no defined risk group, it is believed that the elderly, veterinarians and dog owners with recurrent pyoderma have a higher risk of colonization and/or infection by *S. pseudintermedius* (VAN DUIJKEREN et al., 2011; LATRONICO et al., 2014; SOMAYAJI et al., 2016).

In 2012, methicillin-resistant *S. pseudintermedius* isolates (SPRM) were described, with an increasing occurrence in the clinical routine (BECK et al., 2012). The resistance of these microorganisms is mainly linked to genetic factors. Methicillin-resistant *Staphylococcus* have a gene called *mec*A, capable of producing proteins that prevent the binding of penicillins, PBP 2 ' or PBP 2ª, impairing the action of all beta-lactam antimicrobials (ONUMA et al., 2012). Resistant microorganisms are responsible for treatment failures, increasing disease related costs and animal morbidity rates (PELLERIN et al., 1998).

Considering the ever closer contact between humans and pets, the presence of multidrug-resistant staphylococci in dogs becomes a concern in Public Health, both for presenting zoonotic potential and for the risk of transmitting resistance genes to other more pathogenic strains for humans.

RESULTS AND DISCUSSION

The present study made it possible to identify the main bacterial agents that cause pyoderma in dogs treated at the Veterinary Hospital of FMVZ-UNESP in Botucatu, their antimicrobial sensitivity profile, and the detection of the *mec*A gene. Most of the isolates obtained belonged to the genera *Staphylococcus* spp. and *Streptococcus* spp. The prevalence of 70.4% (74/105) of *S. pseudointermedius* was found, corroborating with results found by Onuma et al. in Japan (2012), who identified canine pyoderma isolates in two periods, 1999-2000 and in 2009, noting that the prevalence of *S. pseudintermedius* was 76.1% and 76.4%, respectively, similar to the study carried out by Kawakami et al. in 2010 in the same country (89.5%). The latter identified a prevalence of 10.5% of the species *S. schleiferi*, different from the value found in the present study, which was 0.95% (1/105). Although the contact between humans and pets is increasingly close and dogs are already considered reservoirs of SARM, in this study no isolate of *S. aureus* was obtained, a result different from that observed by Loeffler et al. (2005), in London, who identified 8.9% (4/45) of *S. aureus* in samples of dogs in a hospital environment, regardless of the disease. As well as in Coro, Venezuela, López et al. (2019) identified the prevalence of 35.6% (16/45) of isolates of *S. aureus* causing pyoderma in dogs, a high prevalence that reinforces the concern in terms of public health, given the proximity between dogs and their guardians.

In this study 122 isolates were obtained. Colonies morphologically compatible with *Staphylococcus* spp. (105/122) underwent the catalase test, in which all samples were positive, and coagulase, in which 64 (60.9%) samples were positive and 41 (39%) were negative. In salt-agar mannitol, 45 (42.8%) samples were considered positive and 60 (57.1%) negative. In the DNAse test, 103 (98%) were positive and only 2 (2%) negative. 105 isolates were sent to perform the MALDI-TOF, in which 74 (70.4%) samples were identified as *Staphylococcus pseudintermedius*, 25 (23.8%) as *S. intermedius*, 1 (0.9%) as S. epidermidis, 1 (0.9%) as *S. haemolyticus*, 1 (0.9%) as *S. delphini*, 1 (0.9%) as *S. schleiferi* and 1 (0.9%) as *S. xylosus* and 1 (0.9%) as *Moraxella osloensis*.

Regarding the identification at the species level of the *Staphylococcus* genus, it is important to highlight the limitations of conventional microbiological diagnosis, since it is impossible to differentiate phenotypically bacteria belonging to GIS. PCR is the technique considered to be the gold standard, but mass spectrometry (MALDI-TOF) is gaining more and more prominence in this scenario (ALCALÁ et.al, 2015). A

study carried out in Spain in 2015 by Alcalá et al. compared the effectiveness of MALDI-TOF in the identification of *S. aureus*, *S. intermedius* and *S. pseudointermedius* compared to PCR and conventional cultivation techniques. MALDI-TOF was effective in distinguishing *S. pseudointermedius*, previously identified as *S. intermedius* by the conventional culture method. Regarding the identification of *S. aureus*, MALDI-TOF was extremely sensitive. All bacteria were subjected to the gold standard technique of molecular biology. Similarly, in the present study, there was a discrepancy between the identifications obtained by the conventional method and the results of the MALDI-TOF, mainly in relation to the coagulase and salt-agar mannitol tests, reinforcing the need for more specific techniques in the identification of GIS bacteria.

The antimicrobials that showed the lowest efficacy index were ampicillin (61.9%), penicillin (59%) doxycycline (35.2%) and tetracycline (31.4%). 25/105 (23.8%) strains of *Staphylococcus* spp. and 4/6 (66.7%) strains of *Streptococcus* spp. were multidrug resistant (MDR). Among these, 11 were isolated from puppies, all of the *Staphylococcus* genus. Of the adult dogs, 10 were isolated, two strains of streptococci. From the elderly animals, seven MDRs were obtained, of which two were streptococci. One strain of *Staphylococcus pseudintermedius* was resistant to 23 of the 24 tested antimicrobials, sensitive only to amikacin.

Despite the low prevalence of *Streptococcus* spp. as a cause of canine pyoderma found in this study (6/115), this genus deserves attention due to the high level of resistance to antimicrobials presented. There was a statistical difference ($p < 0.05$) between the percentage of *Streptococcus* spp. multidrug resistant (MDR), which was 66.7% (4/6), with the percentage of *Staphylococcus* spp. MDR was 23.8% (25/105). In spite of the low participation in this skin condition, the high index of resistance generates concern in the case of other pathologies caused by this agent. The presence of Streptococcus spp.has been described in samples of dogs that had dry keratoconjunctivitis (ORIA et al., 2013) and urinary tract infection (MIYABE et al., 2016).

Regarding the resistance presented by the isolates of the *Staphylococcus* genus, in 2012, Onuma et al. observed rates of 75% (1999-2000) and 62% (2009) of ampicillin resistance, 45% (1999-2000) and 48.4% (2009) of tetracycline resistance and 35% (1999-2000) and 15,2% (2009) resistance to chloramphenicol, considering only strains of *S. pseudintermedius*. In this study, all isolated species of *Staphylococcus* spp. were submitted in the sensitivity profile. The resistance rates verified to ampicillin and tetracycline were similar to those found by Onuma et al., 61.9% and 31.4%, respectively. However, in our study, a rate of only 5.7% resistance to chloramphenicol was observed. The ineffectiveness of these drugs may be related to the frequency of their use, which increases the selection pressure for resistant microorganisms. Tetracycline, for example, has been widely used in the treatment of several veterinary

diseases, including dermatological diseases. Another example is chloramphenicol, that is not commomly used for dermatological treatments in the United Kingdom, showing good antimicrobial efficacy (SCHWARZ; NOBLE, 1999).

In Australia, a survey conducted by Bean and Wigmore (2016) pointed out higher occurrences of resistance to penicillin, doxycycline and tetracycline in isolates of *S. pseudintermedius*, with the difference that the isolates came from healthy dogs during the collection period. Apart from these antimicrobials, resistance rates were low. Of the 102 *S. pseudointermedius* isolated, only one was confirmed as SPRM, through the detection of the *mec*A gene by PCR. Similarly, high resistance to doxycycline was observed in this study. In Brazil, a country considered endemic for hemoparasitosis, this drug is widely used (SANTARÉM and AGUIAR, 2016), which may justify the high frequency of in vitro resistance observed (35.2%).

This study made it possible to compare the presence of MDR and the amount of ineffective drugs in dogs under treatment or who had recently undergone antimicrobial treatment. There was no statistical difference between these groups, a result similar to that found by Botoni (2014), who found no significant correlation between previous antibiotic therapy and the presence of the *mec*A gene. Likewise, a high prevalence of MDR staphylococci was observed in puppies (11/105), who had less exposure to antimicrobials compared to animals considered adults and elderly. These data contradict the hypothesis proposed by Hensel et al. (2016) and by Zur et al. (2016), who suggest that previous exposure to antimicrobials may be a risk factor in the selection of SPRM.

In this study, of the 100 strains sent for PCR, only two strains (2%) of *S. pseudointermedius* had the *mec*A gene, one of which is the strain resistant to 23 of the 24 tested antimicrobials. This result differs from that found in the study by Botoni et al. (2016), also in Brazil, which found 37% of the prevalence of the gene. Likewise, studies carried out in Korea by Kang et al. (2017) and in the United Kingdom by Clark et al. (2016) found a high prevalence of the *mec*A gene in *S. pseudintermedius*, 41.9% and 49.4%, respectively.

The average of 5,082 years of age of the affected animals was observed. In similar studies, the average age was 6.2 years (NIENHOFF et al., 2011) and 4 years (HOLM et al., 2002). With regard to gender, 42.35% of the animals collected were females and 57.64% were males, a result that does not differ much from that found by Nienhoff et al. (2011), in which the distribution between the sexes was 50%. A higher prevalence of atopic dogs was expected, however, this was only 9.41%. In 2012, Beck et al. observed a 63% prevalence of dogs with atopic dermatitis as the underlying cause of pyoderma.

Despite the low prevalence of the *mec*A gene found in this study, it is worth noting the high occurrence of MDR strains found, alerting to the risk of infections by multiresistant *S. pseudintermedius* in

dogs and humans, due to their zoonotic potential. In Spain, the presence of a phenotypic and genetically similar *S. pseudintermedius* lineage has been described in four human patients treated at a hospital and dogs with which three of these patients had contact. Three patients had skin lesions, one was an oncology patient. Strains isolated from dogs and humans had the same antimicrobial resistance profile (LOZANO et al., 2017). In Canada, a prevalence of 75% (18/24) of *S. pseudintermedius* was observed in human patients with skin and soft tissue injuries. Patients did not necessarily have other comorbidities (SOMAYAJI et al., 2016). Both studies suggest the transmission of lineages between dog-human, reinforcing the need for attention for the ever closer contact between dogs and their owners, becoming a matter of great importance with regard to public health.

MATERIALS AND METHODS:

The 115 samples came from dogs showing a condition compatible with superficial or deep pyoderma, primary or recurrent, with or without concomitant disease, with no predilection for race, sex or age, attended in the routine of several sectors of the Veterinary Hospital of FMVZ - UNESP / Botucatu –SP (Small Animal Medical and Surgical Clinics, Animal Reproduction, Animal Infectious Diseases), from September 2018 to January 2020. Animals being treated or newly treated with antimicrobials were included in the study. Dogs with pyoderma who did not have healthy pustules were excluded.

The animals were classified into three categories according to age: puppies (1 day old - 1 year old), adults (1 year and 1 day old - 6 years and 11 months old) and elderly (older than or equal to 7 years old). The material was collected after the rupture of intact pustules with the aid of a sterile needle (25x5.5mm), without prior disinfection. After rupture, the purulent content was immediately collected by sterile swab and stored in Stuart Transport Medium, a non-nutritional substrate used for bacterial conservation. After identification, the samples were kept at refrigeration temperature (4-8ºC) until processing (HOLM et al., 2002 and Oxoid), performed within seven days after collection, in the Microbiology laboratory of the Department of Veterinary Hygiene and Health of the same institution.

Conventional culture was performed on defibrinated bovine blood agar MacConkey agar (Oxoid® base). After processing, the samples were kept under aerobic conditions at 37ºC, for 96 hours, with readings every 24 hours (QUINN et al., 2011; BENITES et al., 2016). Colonies morphologically compatible with Staphylococcus spp. and Streptococcus spp. (gram-positive coconuts) were subjected to the catalase test, for possible species differentiation (REINER, 2010).

In colonies morphologically suggestive of Staphylococcus spp., sugar fermentation test, mannitol salt-agar (MSA), production of the enzyme deoxyribonuclease (DNAse) and coagulase tests were performed (KATEETE et al., 2010; QUINN et al., 2011; BENITES et al., 2016;).

The in vitro antimicrobial sensitivity profile was performed, in which drugs from the following groups were used: 1) aminoglycosides (amikacin, gentamicin, neomycin), 2) beta-lactams (amoxicillin with clavulanic acid, ampicillin, chloramphenicol, penicillin, oxacillin), 3) cephalosporins (cephalexin, cefovecin, ceftiofur, ceftriaxone), 4) fluoroquinolones (ciprofloxacin, enrofloxacin, levofloxacin, norfloxacin), 5) glycillin (tigecicline), 6) lincosamine (clindamycin, 7), azromycin, 7)) rifamycins (rifampicin), 9) sulfonamides (sulfazotrim) and 10) tetracyclines (doxycycline, tetracycline) (TRABULSI et al., 2005).

The microorganisms were stored in Ligniéres medium, maintained at a temperature of 25 °, and subsequently underwent matrix-assisted laser desorption ionization-time of light mass spectrometry (MALDI-TOF MS) and Polymerase Chain Reaction (PCR), for identification and species and detection of the mecA gene, respectively (BANNOEHR et al., 2009; BARREIRO et al., 2010).

The data obtained were tabulated and descriptive statistics were produced. The number of ineffective or intermediate-effective compounds in each strain characterized the variable "resistance". The distribution of this variable was evaluated with theses of normality (Shapiro-Wilk) and graphic analysis (Histogram and QQ Plot). Subsequently, the unpaired two-samples Wilcoxon test was used to assess the difference between the median resistance in the groups with and without antimicrobial treatment, in the two bacterial genera present in the study. The Kruskal-Wallis test was used to assess the difference between the median resistance for each disease observed. The association between the occurrence of MDR strains and the explanatory variables use of antimicrobials, bacterial gender and diagnosed disease was assessed using the Fisher test. Statistical differences were considered when $P < 0.05$. The analyzes were performed with the aid of the Statistical Analysis Software - SAS version 9.3 (SAS Institute, 2011).

ACKNOWLEDGEMENTS:

Thank CAPES Foundation for the scholarship and financial aid granted to carry out this project.

ETHICS DECLARATIONS:

This study was submitted to the Animal Use Ethics Committee (CEUA) of FMVZ-UNESP / Botucatu, SP, and approved under protocol number 0149/2018.

CONFLICT OF INTEREST

The autors declare no conflict of interest.

REFERENCES

ALCALÁ, L. SIMÓN, M. C.; LÓPEZ-CALLEJA, A. I.; FERRER, I.; PEREIRA, J.; ORTEGA, C.; TORRES, C.; VIGUERA, N.; GÓMEZ-SANZ, E.; REVILLO, M. J.; REZUSTA, A. Idoneidad del uso del MALDI-TOF MS para la identificación de Staphylococcus aureus y miembros del grupo de Staphylococcus intermedius (SIG). 2015.

BANNOEHR, J; FRANCO, A; LURESCIA, M; BATTISTI, A; FITZGERALD, JR. Molecular Diagnostic Identification of *Staphylococcus pseudintermedius. J Clin Microb*. 2009; 47(2): 469-71.

BANNOEHR, J.; GUARDABASSI, L. Staphylococcus pseudintermedius in the dog: taxonomy, diagnostics, ecology, epidemiology and pathogenicity. *Veterinary dermatology*, v. 23, n. 4, p. 253-e52, 2012.

BARREIRO, J. R. et al. Identification of subclinical cow mastitis pathogens in milk by matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry. *Journal of dairy science*, v. 93, n. 12, p. 5661-5667, 2010.

BEAN, D. C.; WIGMORE, S. M. Carriage rate and antibiotic susceptibility of coagulase-positive staphylococci isolated from healthy dogs in Victoria, Australia. **Australian veterinary journal**, v. 94, n. 12, p. 456-460, 2016.

BECK, K. M.; WAISGLASS, S. E.; DICK, H. L. N.; WEESE, J. S. Prevalence of meticillin-resistant Staphylococcus pseudintermedius (MRSP) from skin and carriage sites of dogs after treatment of their meticillin-resistant or meticillin-sensitive staphylococcal pyoderma. *Veterinary dermatology*, v. 23, n. 4, p. 369, 2012.

BENITES, N. R.; MELVILLE, P. A.; RIBEIRO, M. G. Estaficcociais. In MEGID, J.; RIBEIRO, M. G.; PAES, A. C. *Doenças infecciosas em animais de produção e de companhia.* Rio de Janeiro: Editora Roca, 1 ed., 2016, cap. 29, pág. 300-314.

BOTONI, L. S.; FILHO, N. P. R.; SCHERER, C. B.; BRAGA, L.; LEME, F. O. P.; BICALHO, A. P. C. V. Piodermite superficial canina por Staphylococcus pseudintermedius resistente à meticilina (MRSP). *Medvep Dermato - Revista de Educação Continuada em Dermatologia e Alergologia Veterinária* (2014); 3(10); 270-277

BOTONI, L. S.; SCHERER, C. B.; SILVA, R. O.; COURA, F. M.; HEINEMANN, M. B.; LEME, F. O. P.; VAL, A. P. C. Prevalence and in vitro susceptibility of methicillin-resistant Staphylococcus pseudintermedius (MRSP) from skin and nostrils of dogs with superficial pyoderma. *Pesquisa Veterinária Brasileira,* v. 36, n. 12, p. 1178-1180, 2016.

BRYAN, J., FRANK, L., ROHRBACH, B. W., BURGETTE, L., J., CAIN, C. L., & BEMIS, D. A. Treatment outcome of dogs with meticillin-resistant and meticillin-susceptible Staphylococcus pseudintermedius pyoderma. *Veterinary dermatology*, v. 23, n. 4, p. 361, 2012.

CLARK, S. M.; LOEFFLER, A.; SCHIMIDT, V. M.; CHANG, Y. M.; WILSON, A.; TIMOFTE, D.; BOND, R. Interaction of chlorhexidine with tris EDTA or miconazole in vitro against canine meticillin-resistant and-susceptible Staphylococcus pseudintermedius isolates from two UK regions. *Veterinary dermatology*, v. 27, n. 5, p. 340-e84, 2016.

HENSEL, Nao; ZABEL, Sonja; HENSEL, Patrick. Prior antibacterial drug exposure in dogs with meticillin-resistant Staphylococcus pseudintermedius (MRSP) pyoderma. *Veterinary dermatology*, v. 27, n. 2, p. 72-e20, 2016.

HILLIER, A.; LLOYD, D. H.; WEESE, J. S.; BLONDEAU, J. M.; BOOTHE, D.; BREITSCHWERDT, E.; GUARDABASSI, L.; PAPICH, M. G.; RANKIN, S.; TURNIDGE, J. D.; SYKES, J. E. Guidelines for the diagnosis and antimicrobial therapy of canine superficial bacterial folliculitis (A ntimicrobial G uidelines W orking G roup of the I nternational S ociety for C ompanion A nimal I nfectious D iseases). *Veterinary dermatology*, v. 25, n. 3, p. 163-e43, 2014.

HOLM, B. R., PETERSSON, U., BERGSTRÖM, K., & FRANKLIN, A. Antimicrobial resistance in staphylococci from canine pyoderma: a prospective study of first-time and recurrentcases in Sweden. *PUBLIC HEALTH*, v. 16, p. 1-6, 2002.

KANG, J. H.; CHUNG, T. H; HWANG, C. Y. Clonal distribution of methicillin-resistant Staphylococcus pseudintermedius isolates from skin infection of dogs in Korea. *Veterinary microbiology*, v. 210, p. 32-37, 2017.

KATEETE, D. P.; KIMANI, C. N.; KATABAZI, F. A.; OKENG, A.; OKEE, M. S.; NANTEZA, A.; JOLOBA, M. L.; NAJJUKA, F. C. Identification of Staphylococcus aureus: DNase and Mannitol salt agar improve the efficiency of the tube coagulase test. *Annals of clinical microbiology and antimicrobials*, v. 9, n. 1, p. 23, 2010.

KAWAKAMI, T., SHIBATA, S., MURAYAMA, N., NAGATA, M., NISHIFUJI, K., IWASAKI, T., & FUKATA, T. . Antimicrobial susceptibility and methicillin resistance in Staphylococcus pseudintermedius and Staphylococcus schleiferi subsp. coagulans isolated from dogs with pyoderma in Japan. *Journal of Veterinary Medical Science*, v. 72, n. 12, p. 1615-1619, 2010.

LATRONICO, F.; MOODLEY, A.; NIELSEN, S. S.; GUARDABASSI, L. Enhanced adherence of methicillin-resistant Staphylococcus pseudintermedius sequence type 71 to canine and human corneocytes. *Veterinary research*, v. 45, n. 1, p. 70, 2014.

LOEFFLER, A.; BOAG, A. K.; SUNG, J.; LINDSAY, J. A.; GUARDABASSI, L.; DALSGAARD, A.; SMITH, H.; STEVENS, K. B.; LLOYD, D. H. Prevalence of methicillin-resistant Staphylococcus aureus among staff and pets in a small animal referral hospital in the UK. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, v. 56, n. 4, p. 692-697, 2005.

LÓPEZ, G. M.; OBERTO, V. C.; PORTILLO, L. C. Susceptibilidad antimicrobiana de estafilococos aislados en piodermas de caninos de Coro, Venezuela. *Revista de Investigaciones Veterinarias del Perú*, v. 30, n. 1, p. 404-422, 2019.

LOZANO, C.; REZUSTA, A.; FERRER, I.; PÉREZ, V. L.; ZARAZAGA, M.; RUIZ-RIPA, L.; REVILLO, M. J.; TORRES, C. Staphylococcus pseudintermedius human infection cases in Spain: dog-to-human transmission. *Vector-Borne and Zoonotic Diseases*, v. 17, n. 4, p. 268-270, 2017.

MIYABE, F. M.; MAINARDI, R. M.; FACIMOTO, C. T.; PEREIRA, U. BACTÉRIAS CAUSADORAS DE INFECÇÃO URINÁRIA EM CÃES E GATOS E SEU PERFIL DE RESISTÊNCIA AOS ANTIMICROBIANOS.

NIENHOFF, U.; KADLEC, K.; CHABERNY, I. F.; VERSPOHL, J.; GERLACH, G. R.; KREIENBROCK, L.; SCHWARZ, S.; SIMON, D.; NOLTE, I. Methicillin-resistant Staphylococcus pseudintermedius among dogs admitted to a small animal hospital. *Veterinary microbiology*, v. 150, n. 1-2, p. 191-197, 2011.

ONUMA, K.; TANABE, T.; SATO, H. Antimicrobial resistance of Staphylococcus pseudintermedius isolates from healthy dogs and dogs affected with pyoderma in Japan. *Veterinary dermatology*, v. 23, n. 1, p. 17, 2012.

ORIA, A. P.; PINNA, M. H., FURTADO, M. A., PINHEIRO, A. C. O., GOMES JUNIOR, D. C., & COSTA NETO, J. M. Microbiota conjuntival em cães clinicamente sadios e cães com ceratoconjuntivite seca. *Ciência Animal Brasileira*, v. 14, n. 4, p. 495-500, 2013.

PELLERIN, J. L.; BOURDEAU, P.; SEBBAG, H; PERSON, J. M. Epidemiosurveillance of antimicrobial compound resistance of Staphylococcus intermedius clinical isolates from canine pyodermas. *Comparative immunology, microbiology and infectious diseases*, v. 21, n. 2, p. 115-133, 1998.

QUINN, P. J.; MARKEY, B. K.; LEONARD, F. C.; FITZPATRICK, E. S.; FANNING, S.; HARTIGAN, P. J. *Veterinary Microbiology and Microbial Disease.* 2 ed. Oxford: Blackwell Science Ltd., 2011, 1231p.

REINER, Karen. Catalase test protocol. *American Society For Microbiology, ASMMicrobeLibrary*, 2010.

SANTARÉM, V. A.; AGUIAR, D. M. Erliquiose Canina. In: MEGID, J.; RIBEIRO, M; G. PAES, A. C. *Doenças Infecciosas em Animais de Produção e Companhia.* Rio de Janeiro, Roca, 2016. p. 95-111.

SCHWARZ, STEFAN; NOBLE, WILLIAM C. Aspects of bacterial resistance to antimicrobials used in veterinary dermatological practice. *Veterinary dermatology,* v. 10, n. 3, p. 163-176, 1999.

SOMAYAJI, R.; RUBIN, J. E.; PRIYANTHA, M. A. R.; CHURCH, D. Exploring Staphylococcus pseudintermedius: an emerging zoonotic pathogen? 2016.

TRABULSI, L. R.; MIMICA, I. M.; MIMICA, L. M. J. Características dos principais grupos de antibacterianos: espectro de ação e indicações. In: TRABULSI, L. R.; ALTERTHUM, F. *Microbiologia.* São Paulo: Editora Atheneu, 4 ed., 2005, cap. 10, p. 85-89.

VAN DUIJKEREN, E.; KAMPHUIS, M.; VAN DER MIJE, I. C.; LAARHOVEN, L. M.; DUIM, B.; WAGENAAR, J. A.; HOUWERS, D. J. Transmission of methicillin-resistant Staphylococcus pseudintermedius between infected dogs and cats and contact pets, humans and the environment in households and veterinary clinics. *Veterinary microbiology*, v. 150, n. 3-4, p. 338-343, 2011.

ZUR, Gila; GUREVICH, Bella; ELAD, Daniel. Prior antimicrobial use as a risk factor for resistance in selected Staphylococcus pseudintermedius isolates from the skin and ears of dogs. *Veterinary dermatology*, v. 27, n. 6, p. 468-e125, 2016.

GRAPHICAL ABSTRACT: