

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE VETERINÁRIA

**OCORRÊNCIA DE *Staphylococcus pseudintermedius* RESISTENTE À METICILINA
(MRSP) EM CÃES ATENDIDOS NO HOSPITAL DE CLÍNICAS VETERINÁRIAS DA
UFRGS (HCV-UFRGS)**

VERÔNICA SILVEIRA LUIZ MACHADO

PORTO ALEGRE

2014

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE VETERINÁRIA

**OCORRÊNCIA DE *Staphylococcus pseudintermedius* RESISTENTE À METICILINA
(MRSP) EM CÃES ATENDIDOS NO HOSPITAL DE CLÍNICAS VETERINÁRIAS DA
UFRGS (HCV-UFRGS)**

Autora: Verônica Silveira Luiz Machado

Monografia apresentado à
Faculdade de Veterinária como requisito parcial para
a obtenção de Graduação em Medicina Veterinária

Orientadora: Marisa Ribeiro de Itapema Cardoso

Coorientadora: Priscila Regina Guerra

PORTO ALEGRE

2014

CIP - Catalogação na Publicação

Machado, Verônica Silveira Luiz
OCORRÊNCIA DE *Staphylococcus pseudintermedius*
RESISTENTE À METICILINA (MRSP) EM CÃES ATENDIDOS NO
HOSPITAL DE CLÍNICAS VETERINÁRIAS DA UFRGS (HCV-
UFRGS) / Verônica Silveira Luiz Machado. -- 2014.
35 f.

Orientadora: Marisa Ribeiro de Itapema Cardoso.
Coorientadora: Priscila Regina Guerra.

Trabalho de conclusão de curso (Graduação) --
Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Faculdade
de Veterinária, Curso de Medicina Veterinária, Porto
Alegre, BR-RS, 2014.

1. Fiodermite. 2. *Staphylococcus pseudintermedius*
. 3. MRSP. I. Cardoso, Marisa Ribeiro de Itapema,
orient. II. Guerra, Priscila Regina, coorient. III.
Título.

Elaborada pelo Sistema de Geração Automática de Ficha Catalográfica da UFRGS com os
dados fornecidos pelo(a) autor(a).

RESUMO

Staphylococcus (S.) pseudintermedius é o principal agente causador de piodermite e otite crônica canina e o isolamento desta espécie em infecções humanas sugere possível caráter zoonótico deste agente. Nos últimos anos houve crescente número de relatos de cepas de *S. pseudintermedius* resistentes à meticilina (MRSP), as quais frequentemente pertencem a grupos clonais disseminados no ambiente hospitalar e na comunidade. O objetivo deste estudo foi investigar a presença de MRSP em amostras clínicas provenientes de pacientes atendidos entre 2011-2012 no Hospital de Clínicas Veterinárias da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (HCV-UFRGS). Noventa e dois isolados de *Staphylococcus* sp. coagulase positiva foram submetidos ao teste de triagem para identificar resistência à meticilina, através do teste de disco-difusão em ágar utilizando disco de oxacilina. Dos isolados analisados, 21,7% (20/92) apresentaram perfil de resistência fenotípica à meticilina. Os isolados resistentes à meticilina foram submetidos a PCR-RFLP para identificação da espécie e investigou-se a presença do gene *mecA*. A amplificação e análise do gene *spa* foi utilizada para identificar possíveis clones. Dentre estes, 100% (20/20) pertenciam à espécie *S. pseudintermedius* e tiveram a presença do gene *mecA* confirmada. Através da tipificação do gene *spa* seis diferentes repetições foram identificadas e sete tipos de *spa typing*, sugerindo possíveis clonalidades. Conclui-se que cepas MRSP estão presentes em pacientes atendidos no HCV-UFRGS, um fato preocupante pelo potencial zoonótico e pela dificuldade de tratamento destes pacientes. A tipificação do gene *spa* revelou haver um grupo clonal predominante na região.

Palavras-chave: Piodermite; *S. pseudintermedius*; MRSP.

ABSTRACT

Staphylococcus pseudintermedius is the main cause of pyoderma and chronic otitis in dogs. The isolation of this specie in human infections suggests that it may be a zoonotic agent as well. Recently reports of methicillin-resistant *S. pseudintermedius* (MRSP) clonal groups, which have spread in hospitals and community, have been increasing. The objective of this study was to assess the occurrence of MRSP isolates in patients treated between 2011-2012 at the Veterinary Hospital of the Federal University of Rio Grande do Sul (UFRGS-HCV). Ninety-two isolates of *Staphylococcus sp.* coagulase positive were subjected to agar disk diffusion test to assess resistance to methicillin. From the isolates analyzed, 21.7% (20/92) presented a phenotypic resistance profile to methicillin. These isolates were then submitted to PCR-RFLP for species identification and for investigation of the *mecA* gene presence. Amplification and analysis of the *spa* gene was used to identify clones. Among these isolates, 100% (20/20) was identified as *S. pseudintermedius* and presented the *mecA* gene. In *spa* gene analysis six different repetitions, and seven *spa* types were identified. It was concluded that MRSP isolates are present in patients treated at the HCV-UFRGS, a matter of concern taking into account the difficulty of treating these patients and their zoonotic hazard. The *spa* gene classification showed that a MRSP clonal group is present in the region.

Keywords: Pyoderma; *S. pseudintermedius*; MRSP.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Lhasa Apso atópico com piodermite secundária por MRSP. A pele abdominal encontra-se eritematosa e liquenificada.....	12
Figura 2 - Teckel atópico, com liquenificação e infecção na região ventral da cauda causada por MRSP.....	14
Figura 3 - Coloração de Gram demonstrando a morfologia de <i>Staphylococcus</i> e os agrupamentos semelhantes a cachos de uva.....	15
Figura 4 - Representação esquemática da tipificação do gene da proteína A (<i>spa</i>) de <i>Staphylococcus</i>	20
Figura 5.A - Eletroforese em gel de agarose 1,5% demonstrando a amplificação por PCR do gene <i>mecA</i> . Coluna 1: Marcador de peso molecular 1 kb. Coluna 2 e 3: amostras positivas para o gene <i>mecA</i> . Coluna 4: controle negativo. 5.B - Eletroforese em gel de agarose 1,5% demonstrando a PCR-RFLP para identificação molecular das espécies de <i>Staphylococcus</i> . Coluna 1: Marcador de peso molecular 100 pb. Coluna 2 e 4: amplificação do gene <i>pta</i> . Colunas 3 e 5: digestão do produto de PCR com a enzima MboI.....	25
Figura 6 - Eletroforese em gel de agarose 1% demonstrando a amplificação por PCR do gene <i>spa</i> . Coluna 1: Marcador de peso molecular 1 kb. Coluna 2 a 12: amostras positivas para o gene <i>spa</i> . Coluna 13: controle negativo.....	26

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Oligonucleotídeos iniciadores e condições de amplificação para Reação em Cadeia da Polimerase para detecção do gene <i>mecA</i> , <i>pta</i> e <i>spa</i> em <i>S. pseudintermedius</i>	24
Tabela 2 - Origem e perfis de multi-resistência dos isolados MRSP encontrados nesse estudo.....	27
Tabela 3 - Sequências de DNA das seis repetições encontradas nos isolados MRSP e respectivas sequências de aminoácidos. As cores identificam códons equivalentes encontrados na mesma posição de diferentes repetições.....	28
Tabela 4 - Tipos de <i>spa</i> encontrados em isolados MRSP. Sete diferentes tipos de <i>spa</i> foram encontrados.....	28

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

μL microlitros

MRS *Staphylococcus* resistente à meticilina

MRSP *Staphylococcus pseudintermedius* resistente à meticilina

MSSP *Staphylococcus pseudintermedius* sensível à meticilina

pb pares de base

PBP proteína de ligação a penicilina

SIG Grupo *Staphylococcus intermedius*

SRD Sem raça definida

SUMÁRIO

1	
INTRODUÇÃO.....	10
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	12
2.1 Piodermite canina.....	12
2.2 Características gerais do gênero <i>Staphylococcus</i>.....	15
2.3 O grupo <i>Staphylococcus intermedius</i> (SIG).....	16
2.4 Fatores de virulência de <i>S. pseudintermedius</i>.....	16
2.5 Resistência à antimicrobianos e potencial zoonótico de <i>Staphylococcus pseudintermedius</i>.....	17
2.6 Tipificação da região de polimorfismo do gene <i>spa</i>.....	19
3 MATERIAIS E MÉTODOS.....	21
4 RESULTADOS.....	24
5 DISCUSSÃO.....	29
6 CONCLUSÃO.....	31
7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICA.....	32

1 INTRODUÇÃO

Staphylococcus (S.) pseudintermedius é considerado o principal agente causal da piодermite e otite crônica em cães e gatos, todavia este micro-organismo também pode estar presente na pele e mucosas de animais de forma comensal. A espécie *S. pseudintermedius* faz parte do grupo *Staphylococcus intermedius* (*Staphylococcus intermedius* group – SIG), juntamente com as espécies *S. delphini* e *S. intermedius*. Por mais de 30 anos, *S. intermedius* foi considerado o principal agente causador de infecções de pele em cães (BANNOHER; GUARDABASSI, 2012). A descrição de *S. pseudintermedius* foi feita pela primeira vez em 2005 (DEVRIESE et al., 2005), quando foi demonstrado que os isolados fenotipicamente identificados como *S. intermedius* constituíam três espécies do grupo SIG; sendo *S. pseudintermedius* a principal espécie que coloniza e causa infecções em cães e gatos.

A piодermite ocorre mais comumente em cães, em comparação á outros animais e ao homem. A razão da maior suscetibilidade canina ainda não é totalmente elucidada, porém algumas características fisiológicas e anatômicas seriam fatores predisponentes. O estrato córneo canino, a principal barreira física que previne a entrada de bactérias em partes mais profundas da pele, é mais fina e compacta que outras espécies conhecidas. Além disso, há uma escassez de lipídeos intercelulares, carência de tampões foliculares lipídicos e um pH mais alto (GORTEL, 2013).

Nos últimos anos, a espécie *S. pseudintermedius* vem ganhando grande atenção pela ocorrência de relatos de *S. pseudintermedius* resistente à meticilina (MRSP). Isolados MRSP são caracterizados pela presença do gene *mecA*, o qual confere resistência à meticilina e, geralmente, exibem resistência a diversos agentes antimicrobianos não β -lactâmicos (KADLEC; SCHWARZ, 2012). Infecções com isolados multi-resistentes são um desafio para o tratamento, além de representarem um potencial risco zoonótico devido à possibilidade de transmissão para veterinários e proprietários. Segundo Frank e Loeffler (2012), o homem pode ser colonizado por isolados MRSP e tornar-se reservatório, transformando-se em fonte de infecção para outros indivíduos. Há também o risco deste reservatório servir como fonte de transferência horizontal de genes para outros estafilococos.

Tendo em vista a importância desta bactéria em infecções caninas, a possibilidade de multi-resistência e o potencial zoonótico desse micro-organismo, o presente trabalho teve por objetivo investigar a ocorrência de isolados de *Staphylococcus pseudintermedius* resistente à meticilina (MRSP) obtidas de cães e gatos diagnosticados com lesão clínica de piodermite ou otite atendidos no Hospital de Clínicas Veterinárias da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (HCV UFRGS).

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Piodermite canina

As infecções cutâneas de origem bacteriana são frequentes em animais de companhia, apesar de raramente ocorrerem em gatos (RHODES, 2005); e tratam-se de um dos motivos mais importantes de consultas em dermatologia veterinária. Os aspectos clínicos dessas infecções são variados, distinguindo-se: piodermites superficiais pouco graves, em que é instituído um tratamento durante duas a quatro semanas; e piodermites profundas, menos frequentes e mais graves, em que o tratamento pode chegar a seis semanas ou mais. As piodermites resultam da associação da presença da bactéria patogênica com fatores que permitam sua proliferação e sua penetração na pele; ou seja, na maioria dos casos as infecções cutâneas são secundárias (Figura 1). Por esta razão, o diagnóstico e o tratamento da doença subjacente é indispensável para reestabelecer o ecossistema cutâneo e evitar recidivas (GUAGUÈRE; BENSIGNOR, 2005).



Figura 1 – Lhasa Apso atópico com piodermite secundária por *Staphylococcus pseudintermedius* resistente a metilina. A pele abdominal encontra-se eritematosa e liquenificada. (Fonte: COYNER, 2012)

A piодermite superficial pode ocorrer sozinha ou em associaçāo à foliculite superficial bacteriana, assim como a piодermite profunda pode ocorrer como sequela da foliculite. A localizaçāo frequente de lesōes de piодermite em regiōes glabas da virilha, axila e a presençā de intertrigo sugerem que a retençāo de calor e a ocorrēncia de microtraumas produzidos pela fricçāo possam contribuir para a multiplicaçāo bacteriana e a infecçāo (GROSS et al., 2009).

O agente mais comumente isolado em casos de piодermite é *S. pseudintermedius*, um habitante comensal de pele e mucosa que pode ser isolado de narinas, boca, faringe, face, virilha e ânus de cāes e gatos saudáveis (RUBIN; CHIRINO-TREJO, 2011). Esta bactéria reside nesses locais e é transportada, passivamente, para outras regiōes pela lambedura da pelagem e da pele, levando á infecçōes recidivantes quando a causa primária nāo é tratada. Considerado um patόgeno oportunista, *S. pseudintermedius* é produtor de toxina exfoliativa, um fator de virulēncia envolvido na piодermite canina, e encontrado, principalmente, em isolados obtidos de áreas com infecçōes cutāneas (IYORI et al., 2010). Cāes injetados com a toxina exfoliativa purificada desenvolveram sinais clīnicos de piодermite, como eritema, descamaçāo e crostas (TÉRAUCH et al. *apud* VAN DUIJKEREN et al., 2011).

Streptococcus e outras espécies do gênero *Staphylococcus*, como *S. aureus*, *S. hyicus*, *S. hominis* e *S. epidermidis*, podem ser causadoras de piодermite (GUAGUÈRE; BENSIGNOR, 2005). Ao evoluir de uma piодermite superficial para uma piодermite profunda, a patogenia pode ser complicada por microorganismos Gram-negativos, como *Escherichia coli*, *Proteus* e *Pseudomonas* (RHODES, 2005).

As lesōes apresentadas sāo variáveis, podendo ocorrer pápulas, pústulas, hematomas, crostas, colarinhos epidérmicos, manchas circulares eritematosas ou hiperpigmentadas, alopecia, descamaçāo, abscessos e liquenificaçāo (Figura 2). O animal pode apresentar prurido causado por uma doençā de base, como alopecia ou alergias à picada de pulga, ou a própria infecçāo pode ser prurítica (RHODES, 2005).

O controle da piодermite, geralmente, baseia-se na administraçāo de agentes antimicrobianos de uso oral e local. Entre os grupos farmacolόgicos recomendados para tratamento destas infecçōes estāo os β-lactâmicos (penicilinas e cefalosporinas), macrolídeos, lincosamidas, fluoroquinolonas e sulfonamidas. Em casos de piодermite superficial é, geralmente, utilizado empiricamente um antimicrobiano ativo contra *S. pseudintermedius*, por

este ser responsável por mais de 90% destas infecções. Neste caso os β -lactâmicos são frequentemente empregados. O uso de teste de susceptibilidade á antimicrobianos é recomendado, principalmente, em casos de piodermite profunda ou recidivante (GUAGUÈRE; BENSIGNOR, 2005).



Figura 2 - Teckel atópico, com liquenificação e infecção na região ventral da cauda causada por *Staphylococcus pseudintermedius* resistente a metilina. (Fonte: COYNER, 2013)

2.2 Características gerais do gênero *Staphylococcus*

O gênero *Staphylococcus* compreende bactérias Gram-positivas, em formato de cocos, com 0,5 – 1,5 μm de diâmetro, que formam agrupamentos semelhantes á cachos de uva (Figura 3). A estrutura da parede celular neste gênero é típica de bactérias Gram-positivas, apresentando peptídeoglicano, ácidos teicoicos e proteínas. Apresentam metabolismo fermentativo com produção de ácido e não de gás, são aeróbias ou anaeróbias facultativa, não formam esporos, são imóveis e capazes de multiplicar-se em meio de cultura contendo 10% de cloreto de sódio. São microorganismos mesófilos com capacidade de multiplicação entre 7 e 48 °C, com temperatura ótima de crescimento á 37°C. Sua multiplicação ocorre melhor em pH entre 6,0 e 7,0, porém, toleram a faixa de pH entre 4,0 e 10,0 (QUINN et al., 2011).

O gênero pertencente à família *Staphylococcaceae*, e inclui 49 espécies e 26 subespécies (<http://bacterio.net/staphylococcus.html>, último acesso em 09/12/2014). Espécies e subespécies de *Staphylococcus* estão amplamente distribuídas na natureza, sendo principalmente isolados de pele e mucosa de aves e mamíferos. Algumas dessas espécies podem atuar como patógenos oportunistas e causar infecções piogênicas graves em humanos e animais (QUINN et al., 2011).

Algumas espécies de *Staphylococcus* são produtoras de coagulase, uma proteína extracelular capaz de converter fibrinogênio em fibrina. Isolados coagulase-positiva apresentam diversos outros fatores de patogenicidade e são considerados mais virulentos. Espécies coagulase negativa geralmente apresentam baixa virulência, porém, podem ser causadoras de enfermidades em animais e humanos (QUINN, 2005).

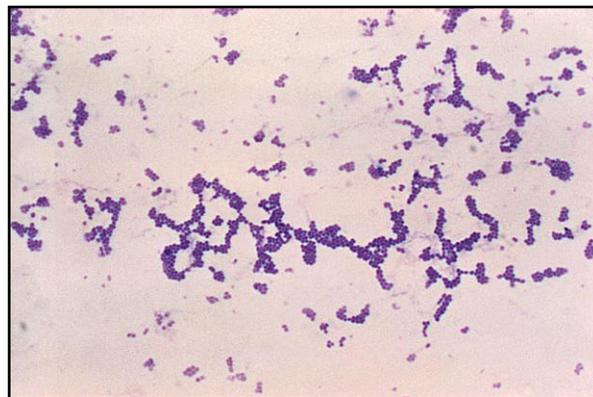


Figura 3 - Coloração de Gram demonstrando a morfologia de *Staphylococcus* e os agrupamentos semelhantes a cachos de uva. (Fonte: <http://phil.cdc.gov>)

2.3 O grupo *Staphylococcus intermedius* (SIG)

O grupo SIG compreende três espécies coagulase-positiva intimamente relacionadas: *S. intermedius*, *S. pseudintermedius* e *S. delhini* (Quinn, 2005). *S. intermedius* foi descrito pela primeira vez em 1976 (HAJEK, 1976), recebendo essa denominação por apresentar características de *S. aureus* e *S. epidermidis*. A partir deste momento, essa espécie foi reconhecida como a maior causadora de piодermite canina. No entanto, no ano de 2005, por meio de análise de sequências do gene da porção 16S do RNA ribossomal de isolados identificados como *S. intermedius*, houve a confirmação de uma nova espécie (DEVRIESE, 2005). Fenotipicamente, essa nova espécie se assemelhava ao *S. intermedius*, por essa razão foi denominada *S. pseudintermedius*.

Quando forem provenientes de cães, isolados identificados por métodos fenotípicos como pertencentes do grupo SIG podem ser referenciados como *S. pseudintermedius*; a menos que seja provado por métodos moleculares que pertencem à outra espécie (DEVRIESE, 2008). Na literatura científica utiliza-se o termo *S. (pseud)intermedius* para referenciar isolados de *S. pseudintermedius* que foram erroneamente identificados como *S. intermedius* anteriores à confirmação da existência da espécie *S. pseudintermedius* (WEESE, 2009).

Staphylococcus pseudintermedius é reconhecido como o principal colonizador e patógeno da pele de cães, causando otites e piодermites. Esse micro-organismo predomina na microbiota normal da pele, folículos pilosos e regiões mucocutâneas como nariz, boca e anus (BANNOERH; GUARDABASSI, 2012). A espécie *S. intermedius* tem sido isolada apenas de pombos e *S. delhini* já foi recuperado de várias espécies animais, incluindo equinos, martas e pombos (BEN ZAKOUR et al., 2012).

2.4 Fatores de virulência de *S. pseudintermedius*

Staphylococcus pseudintermedius produz alguns fatores de virulência anteriormente identificados em *S. aureus*, como enzimas coagulase e protease e toxinas (hemolisina, toxina exfoliativa e enterotoxina). Ainda possui capacidade de formar biofilme e é produtor de proteína A, a qual ligação é capaz de ligar-se com a fração cristalizável da imunoglobulina G

(FITZGERALD, 2009). Porém, a patogenicidade de *S. pseudintermedius* ainda é pouco conhecida e a maioria dos fatores de virulência ainda não foi totalmente elucidada (SANZ, 2013).

A secreção de coagulase por *Staphylococcus* catalisa a transformação de fibrinogênio em fibrina, promovendo a formação de coágulo, o qual funciona como uma barreira para as células do sistema imune do hospedeiro (CHENG et al., 2011). Proteases, por sua vez, inativam a ação dos anticorpos e, possivelmente, possuem papel importante na obtenção de nutrientes a partir do ambiente (GYLES et al. *apud* GIRARDINI, 2013).

Toxinas como as hemolisinas produzem poros na membrana plasmática da célula do hospedeiro, permitindo o extravasamento de seu conteúdo. *Staphylococcus pseudintermedius* produz α -hemolisina e β -hemolisina que causam, respectivamente, lise de eritrócitos de coelhos e hemólise *hot-cold* em eritrócitos ovinos (BANNOEHR; GUARDABASSI, 2012). Além disso, A toxina exfoliativa de *S. pseudintermedius*, quando inoculada em cães, demonstrou produzir eritema e descamação (TÉRAUCH et al. *apud* VAN DUIJKEREN et al., 2011).

Singh e colaboradores (2013) demonstraram a capacidade de formação de biofilme por *S. pseudintermedius*. Neste estudo foram utilizados 140 isolados de *S. pseudintermedius*, provenientes de cães com infecção. Ao final, 96% dos isolados (136/140) foram classificados como fortes ou moderados produtores de biofilme.

A proteína A, codificada pelo gene *spa*, é uma proteína de membrana, a qual se liga à porção Fc de Imunoglobulina G. Essa ligação impede a opsonização e a fagocitose da bactéria (PLATA; ROSATO; WEGRZYN, 2009).

2.5 Resistência à antimicrobianos e potencial zoonótico de *Staphylococcus pseudintermedius*

A resistência frente aos antimicrobianos tem apresentado considerável aumento em quase todas as bactérias de interesse médico e veterinário. Em alguns casos, animais ou alimentos podem ser a fonte de propagação de micro-organismos resistentes para humanos. O uso indiscriminado de agentes antimicrobianos em gatos e cães e o contato próximo destes animais com humanos podem representar uma potencial fonte de transmissão de micro-organismos resistentes (GUARDABASSI; SCHWARZ; LLOYD, 2004). Por essa razão, o uso de agentes antimicrobianos em animais de companhia ou animais de produção deve ser conduzido de forma

prudente (GUARDABASSI; JENSEN; KRUSE, 2010). Huerta e colaboradores (2011) detectaram uma razão de chance cerca de quatro vezes maior de isolar bactérias multi-resistentes de cães urbanos em relação à cães de zonas rurais. Neste mesmo trabalho, todos os isolados de *Staphylococcus* sp. resistente à meticilina foram detectados em cães urbanos. Os autores acreditam que este resultado está relacionado à alta prescrição de agentes antimicrobianos para este grupo de animais, havendo desta forma, uma pressão de seleção.

Os β -lactâmicos são agentes bactericidas que inibem a síntese da parede celular bacteriana através do bloqueio da última etapa da síntese do peptidoglicano. Em *Staphylococcus*, o mecanismo de resistência à meticilina é devido à síntese de uma proteína modificada de ligação à penicilina (PBP), denominada PBP2a e PBP2'. Essa proteína é codificada pelo gene *mecA*, o qual está localizado em um elemento genético móvel, o cassette cromossômico estafilocócico *mec* (*SCCmec*). A presença deste cassette foi relatada em diversas espécies de *Staphylococcus* e outras bactérias Gram-positivas, incluindo *S. pseudintermedius*. A aquisição de resistência por *S. pseudintermedius* a outras classes de antimicrobianos deve-se principalmente à transferência de elementos genéticos móveis, como plasmídeos e transposons, os quais se integram ao DNA e são replicados como parte do genoma da bactéria (KADLEC; SCHWARZ, 2012).

Diferentemente de *S. aureus*, é incomum a colonização em humanos por *S. pseudintermedius* (WEESE; VAN DUIJKEREN, 2010), porém o potencial de transmissão desta bactéria para humanos já foi comprovada. A ocorrência de *S. (pseud)intermedius* em cães e humanos foi investigada por Guardabassi, Schwarz e Lloyd (2004), a partir da amostra de 13 cães com piodermite e seus tutores em comparação a um grupo controle de 13 pessoas sem contato com cães. Doze dos treze cães estavam colonizados por *S. (pseud)intermedius* e sete tutores apresentavam *S. (pseud)intermedius* em sua cavidade nasal (n=4), oral (n=1) ou ambas (n=2). No grupo controle *S. (pseud)intermedius* foi encontrado em apenas uma pessoa. Quando nova coleta de material foi feita após o tratamento dos cães, nenhum dos tutores apresentou a bactéria, demonstrando a não permanência de colonização deste micro-organismo em humanos. Em outra pesquisa, Mahoudeau e colaboradores (1997) investigaram 3397 estafilococos coagulase positiva, isolados de pacientes hospitalizados, e dois foram identificados como *S. (pseud)intermedius*. Um dos isolados foi obtido da mucosa nasal de um paciente hígido e outro de líquido pleural. Em outro estudo, conduzido em um hospital veterinário no Japão, foram coletadas amostras de suabe

nasal de veterinários, estudantes e funcionários em 2007 e 2008. Houve uma incidência de 3,3% (3/92) de MRSP no ano de 2007 e de 7,9% (10/127) em 2008 (ISHIHARA, 2010). Outro estudo conduzido no Canadá, Hanselman, Kruth e Weese (2007) coletaram, em 122 residências na província de Ontário, amostras de cães e gatos e seus proprietários. Foram amostrados 242 suabes nasais de pessoas e 132 e 161 suabes nasais/anais de cães e gatos, respectivamente. Os autores encontraram 4,1% de proprietários, 46,2% de cães e 6,8% de gatos colonizados por *S. pseudintermedius* sensível à meticilina (MSSP). A colonização por MRSP foi encontrada em 0,4% dos proprietários, 4,5% dos cães e 1,2% dos gatos. Nesse estudo, concluiu-se que a não higienização das mãos por parte dos proprietários após manipulação de seus animais estaria associada à colonização destes por *S. pseudintermedius*.

A emergência de MRSP traz um novo desafio à medicina veterinária pela limitação nas opções para o tratamento de animais infectados. Este fato pode resultar no uso indevido de antimicrobianos em animais de companhia (VAN DUIJKEREN et al., 2011). Infecções causadas por *Staphylococcus* resistente à meticilina (MRS) são uma importante causa de mortalidade em animais de companhia e podem estar envolvidas em transmissões zoonóticas, o que colocaria em risco tutores e veterinários. No entanto, mais estudos clínicos, epidemiológicos e microbiológicos envolvendo a população de animais e de pessoas são necessários para melhor elucidar o real papel de MRS na doença animal e sua importância na saúde pública (WEESE; VAN DUIJKEREN, 2010).

2.6 Tipificação da região de polimorfismo do gene *spa*

A tipificação de isolados resistentes a antimicrobianos tem um papel importante para investigações epidemiológicas e monitoramento de sua disseminação em ambiente hospitalar ou na comunidade.

Existem diferentes técnicas aplicadas á isolados de *S. pseudintermedius*, entre eles a tipificação da região de polimorfismo do gene *spa*. Esse gene, o qual codifica para a Proteína A, é dividido em uma região conservada, de ligação com a imunoglobulina G, e uma região de polimorfismo, denominada região X. Esta técnica é baseada na amplificação e posterior sequenciamento da região X, em que as variações desta sequência consistem em duplicações e

deleções de pares de base (pb) (Figura 4) (MOODLEY et al., 2009). Em geral, estas repetições possuem 30 pb e, ao serem analisadas de acordo com suas variações, se enquadrarão em diferentes tipos de *spa* (*spa-types*).

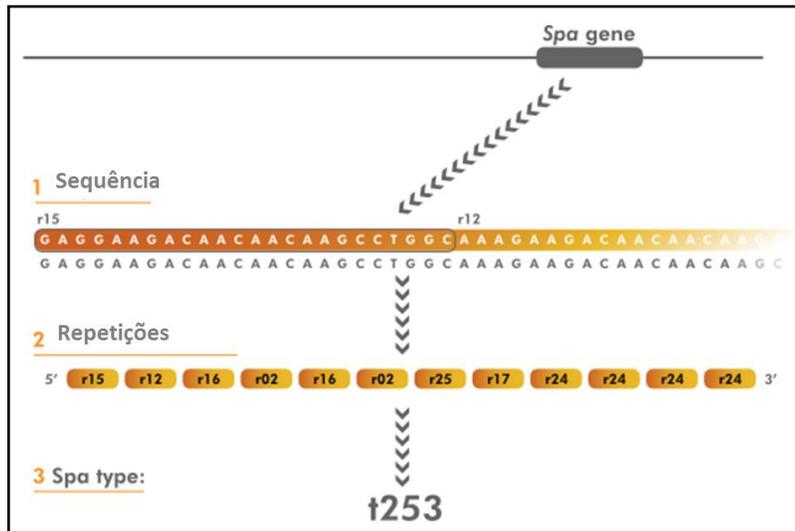


Figura 4 - Representação esquemática da tipificação do gene da proteína A (*spa*) de *Staphylococcus*. (Fonte: <http://www.applied-maths.com/>)

Este método tem sido alvo de interesse, por ser menos laborioso que o método de *Pulsed-field Gel Electrophoresis* (PFGE), o qual é reconhecido como padrão ouro na tipificação molecular desse gênero. Nesse sentido, a tipificação do gene *spa* torna-se uma ferramenta útil para avaliar a clonalidade de isolados e possibilita a comparação dos resultados entre laboratórios (MOODLEY et al., 2009).

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Isolados bacterianos

Noventa e duas amostras de suabes otológicos e de pele e colhidas de animais de companhia (cães e gatos) atendidos no Hospital de Clínicas Veterinárias da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (HCV-UFRGS), durante consultas entre os anos de 2011 e 2012, e encaminhadas para diagnóstico bacteriológico e teste de suscetibilidade a antimicrobianos no Laboratório de Medicina Veterinária Preventiva UFRGS foram incluídas no estudo.

As amostras foram semeadas em ágar sangue, contendo 5% de sangue ovino e incubadas em estufa a $35 \pm 1^\circ\text{C}$ por 24 horas. As colônias foram identificadas como pertencentes ao gênero *Staphylococcus* de acordo com sua morfologia macroscópica, microscópica e teste de coagulase (QUINN, 2005).

3.2 Teste de suscetibilidade a agentes antimicrobianos

Teste de triagem para identificação de resistência à meticilina foram realizados em todos os isolados identificados como *Staphylococcus* coagulase positiva. Para isso, foi realizado o teste de suscetibilidade pelo método de disco difusão em ágar, empregando disco (Oxoid[®]) impregnado com oxacilina (1 μ g), de acordo com as especificações contidas no documento M31-A3 do *Clinical Laboratory Standards Institute* (CLSI, 2013).

Isolados identificados como resistentes à meticilina foram submetidos ao teste de disco difusão em ágar Müller-Hinton (Oxoid[®]) de acordo com o CLSI (2013), utilizando-se os seguintes discos (Oxoid[®]) de antimicrobianos: Ácido Nalidíxico, Ciprofloxacina, Ceftiofur, Cefalotina, Clindamicina, Eritromicina, Florfenicol, Gentamicina, Kanamicina, Ampicilina, Penicilina G, Oxacilina, Tetraciclina, Vancomicina, Rifampicina e Sulfametoxazole + Trimetropim.

3.3 Confirmação da presença do gene *mecA*

Os isolados resistentes à metilicina tiveram seu DNA extraído através do *kit* comercial *NucleoSpin® Tissue* (Machery Nagel, Alemanha), de acordo com as instruções do fabricante. A presença do gene *mecA* foi confirmada através de PCR, conforme descrito (BANNOEHR et al., 2007). A reação foi realizada em volume de 25µL, contendo 1mmol de cada oligonucleotídeo (Tabela 1), 200mmol de dNTP (dATP, dCTP, dGTP, dTTP), 1X Tampão de PCR (10 mM Tris-HCl, 1,5 mM MgCl₂, 50mM KCl [pH 8,3]), 0,5 unidade de Taq polimerase, 1µL de DNA e água bidestilada para completar o volume. Em todas reações foram incluídos controles negativo (sem DNA) e positivo. Os produtos foram submetidos à separação em gel de agarose 1,5%, corados com 10 mg/mL de solução de BlueGreen® (LGC, Brasil). Utilizou-se marcador molecular de 1Kb (Invitrogen®) com intuito de identificar o tamanho dos fragmentos obtidos. O gel foi fotografado e a imagem obtida em fotodocumentador (Gel Logic 2200 Pro).

3.4 Identificação molecular da espécie de *Staphylococcus*

Para identificar a espécie, os isolados foram submetidos à técnica de PCR-RFLP (PCR-*restriction fragment length polymorphism*). Primeiramente foi realizada a amplificação do gene da enzima fosfoacetil transferase (*pta*), e posterior clivagem do produto com a enzima MboI. A clivagem do produto amplificado e o tamanho dos fragmentos resultantes identifica a espécie de *Staphylococcus* coagulase positiva (BANNOEHR et al., 2009). A reação foi realizada em volume de 50µL, contendo 1mmol de cada oligonucleotídeo (Tabela 1), 200mmol de dNTP (dATP, dCTP, dGTP, dTTP), 1X Tampão de PCR (10 mM Tris-HCl, 1,5 mM MgCl₂, 50mM KCl [pH 8,3]), 1 unidade de Taq polimerase, 3µL de DNA e água bidestilada para completar o volume. Em todas reações foram incluídos controle negativo (sem DNA) e controle positivo (*S. aureus* ATCC 6538). Para a realização da PCR-RFLP foi utilizado 25µL do produto da PCR, 5U da enzima MboI e 5µL de tampão presente no kit da enzima. As amostras foram incubadas durante 2 horas à 37°C. Os produtos foram submetidos à separação em gel de agarose 1,5%, corados com 10 mg/mL de solução de BlueGreen® (LGC, Brasil), controles negativo e positivos foram incluídos. Utilizou-se marcador molecular de 100pb (Invitrogen®) com intuito de identificar o tamanho dos fragmentos obtidos. O resultado foi documentado em fotodocumentador (Gel Logic 2200 Pro).

3.5 Sequenciamento e análise do gene *spa*

A região-X de polimorfismo do gene da proteína A (*spa*) nos isolados identificados como *S. pseudintermedius* foram amplificados conforme descrito previamente (MOODLEY et al. 2009). A reação de amplificação foi realizada em volume de 50µL, contendo 1mmol de cada oligonucleotídeo (Tabela 1), 200mmol de dNTP (dATP, dCTP, dGTP, dTTP), 1X Tampão de PCR (10 mM Tris-HCl, 1,5 mM MgCl₂, 50mM KCl [pH 8,3]), 1,25 unidade de Taq polimerase, 5µL de DNA e água bidestilada para completar o volume. Em todas as reações foram incluídos controles negativo (sem DNA) e positivo. Os produtos foram submetidos à separação em gel de agarose 1%, corados com 10 mg/mL de solução de BlueGreen® (LGC, Brasil). Utilizou-se marcador molecular de 1Kb (Invitrogen®) com intuito de identificar o tamanho dos fragmentos obtidos. O resultado foi documentado em fotodocumentador (Gel Logic 2200 Pro).

Os produtos de PCR foram purificados através do *kit PureLink™* (Invitrogen®) e posteriormente sequenciados. O seqüenciamento foi realizado na Unidade de Análises Moleculares e de Proteínas do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (Centro de Pesquisa Experimental, HCPA) utilizando o equipamento ABI 3500 *Genetic Analyzer* com capilares de 50 cm e polímero POP7 (Applied Biosystems). Os produtos de PCR foram marcados utilizando-se 3,2 pmol do primer 5'- AACCTGCGCCAAGTTTCGATGAAG -3' e 1 µL do reagente *BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit* (Applied Biosystems) em um volume final de 10 µL. As reações de marcação foram realizadas em termociclador Veriti® 96-Well Thermal Cycler (Applied Biosystems) com uma etapa de desnaturação inicial a 96°C por 1 min seguida de 35 ciclos de 96°C por 15 seg, 50°C por 15 seg e 60°C por 4 min. Após marcadas, as amostras foram purificadas pela precipitação com *BigDye XTerminator Purification Kit* (Applied Biosystems) e eletroinjetadas no sequenciador automático.

A similaridade de nucleotídeos entre as seqüências obtidas dos isolados e seqüências depositadas no banco de dados GenBank (<http://blast.be-md.ncbi.nlm.nih.gov/>) foram analisadas. Para isto, as seqüências em formato FASTA foram submetidas à ferramenta BLAST (Basic Local Alignment Search Tool). Repetições foram identificadas visualmente utilizando-se como base as repetições descritas por Moodley e colaboradores (2009).

TABELA 1 – Oligonucleotídeos iniciadores e condições de amplificação da PCR para detecção do gene *mecA*, *pta* e *spa* em *S. pseudintermedius*.

Gene alvo	Oligonucleotídeos iniciadores	Tamanho do fragmento (pb)	Condições de amplificação
<i>mecA</i>	mecA F: 5' GTAGAAATGACTGAACGTCCGATAA 3' mecA R: 5' CCAATTCCACATTGTTTCGGTCTAA 3'	310	95°C por 5', 30 ciclos (95°C por 45'', 52°C por 45'', 72°C por 1'), 72°C por 5'.
<i>pta</i>	pta F: 5' AAAGACAAACTTTCAGGTAA 3' pta R: 5'GCATAAACAAGCATTGTACCG 3'	320	95°C por 5', 30 ciclos (95°C por 45'', 52°C por 45'', 72°C por 1'), 72°C por 5'.
<i>spa</i>	Slspa F: 5' AACCTGCGCCAAGTTTCGATGAAG 3' Slspa R:5' CGTGGTTTGCTTTAGCTTCTTGGC 3'	1389	95°C por 10', 30 ciclos (95°C por 30'', 58°C por 30'', 72°C por 1'), 72°C por 10'.

4 RESULTADOS

No teste de disco-difusão, 21,74% (20/92) dos isolados apresentaram fenótipo de resistência à oxacilina. Nos 20 isolados houve a amplificação de fragmento de 310, correspondente ao gene de resistência à meticilina *mecA* (Figura 5.A). Todos os 20 isolados apresentaram apenas um sítio de clivagem para MboI no produto amplificado do gene *pta*, gerando dois fragmentos de 213 pb e 107 pb, indicativos da espécie *S. pseudintermedius*. (Figura 5.B). Entre os isolados confirmados como MRSP, 15 foram provenientes de suabe de pele, quatro de suabe de ouvido e um de suabe de fístula.

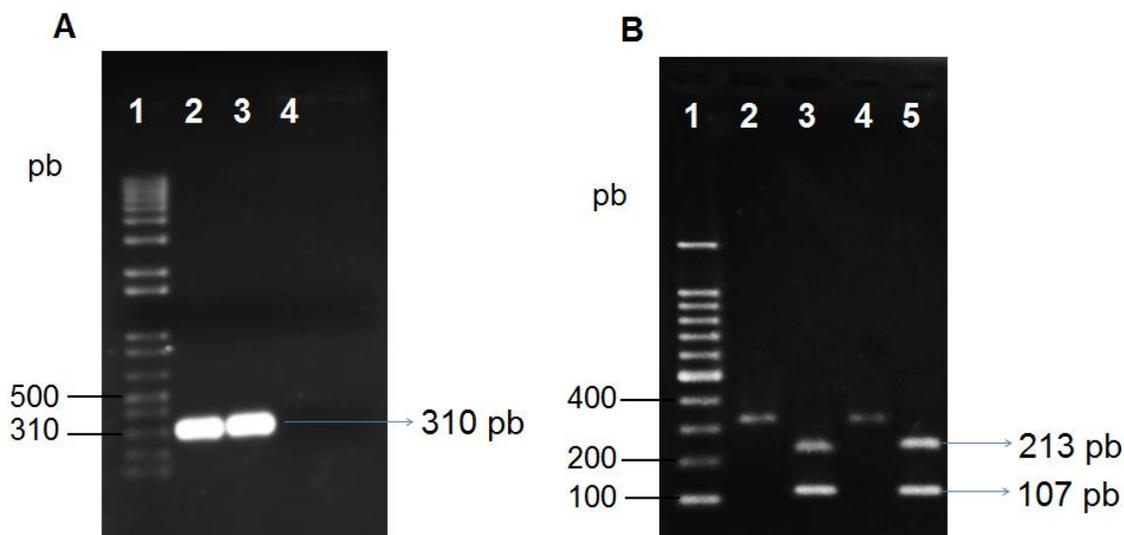


Figura 5.A - Eletroforese em gel de agarose 1,5% demonstrando a amplificação por PCR do gene *mecA*. Coluna 1: Marcador de peso molecular 1 kb. Coluna 2 e 3: amostras positivas para o gene *mecA*. Coluna 4: controle negativo. 5.B - Eletroforese em gel de agarose 1,5% demonstrando a PCR-RFLP para identificação molecular das espécies de *Staphylococcus*. Coluna 1: Marcador de peso molecular 100 pb. Coluna 2 e 4: amplificação do gene *pta*. Colunas 3 e 5: digestão do produto de PCR com a enzima MboI.

De acordo com as recomendações do CLSI, todos os isolados MRSP foram considerados resistentes à ampicilina, penicilina e ácido nalidíxico (Tabela 2). Os isolados MRSP também apresentaram resistência a sulfametoxazol/trimetoprima (95%), canamicina (100%), eritromicina (95%), ciprofloxacina (85%), clindamicina (85%), ceftiofur (80%), tetraciclina (75%), cefalotina

(75%) e rifampicina (50%). O teste de suscetibilidade revelou a presença de oito diferentes perfis de multi-resistência (Tabela 2); o perfil mais comum (PR1) foi encontrado em 10 (50%) isolados. O perfil mais frequente era constituído por resistência frente á 13 diferentes agentes antimicrobianos comumente utilizados em medicina veterinária e humana.

O gene *spa*, o qual codifica para a proteína A das espécies de *Staphylococcus*, foi amplificado em todos os isolados MRSP (Figura 6) e submetido ao sequenciamento para tipificação (*spa typing*). A análise das sequências obtidas demonstrou a presença de um número variável (entre duas a oito) de repetições de 30 pb na região de polimorfismo do gene. Isso resultou na identificação de seis repetições (Tabela 3), identificadas como R01 a R06, e sete tipos de *spa typing* (Tabela 4). Em apenas um isolado MRSP (isolados 843) não foi possível identificar as repetições existentes. O tipo de *spa* predominante t01 foi identificado em dez diferentes isolados, sendo estes provenientes de suabe de pele (8) e suabe de ouvido (2).

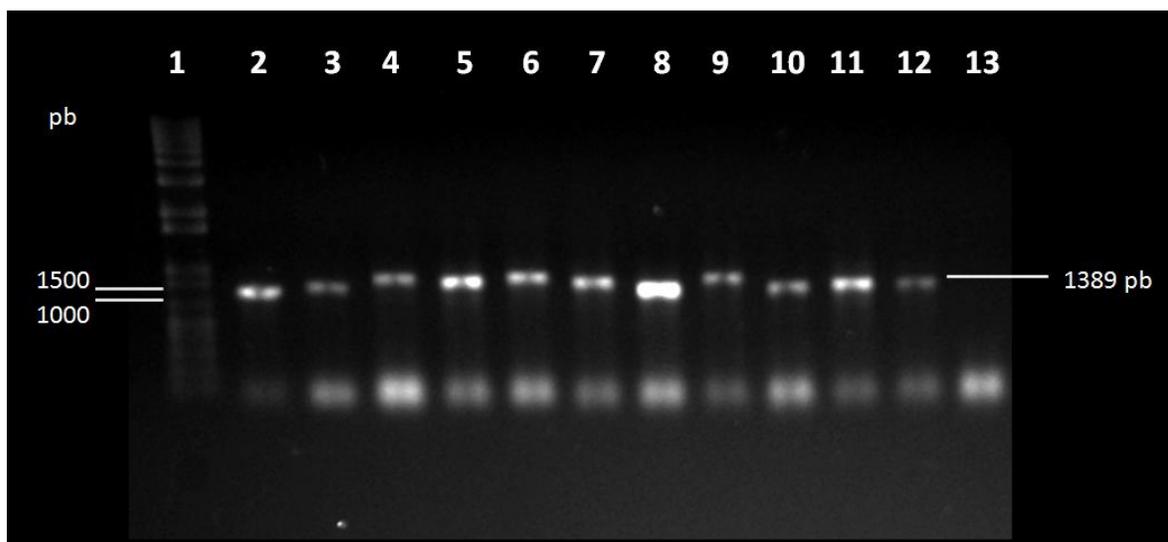


Figura 6 - Eletroforese em gel de agarose 1% demonstrando a amplificação por PCR do gene *spa*. Coluna 1: Marcador de peso molecular 1 kb. Coluna 2 a 12: amostras positivas para o gene *spa*. Coluna 13: controle negativo.

Tabela 2 – Origem e perfis de multi-resistência dos isolados de *Staphylococcus pseudintermedius* resistente a meticilina encontrados nesse estudo.

Identificação do paciente	Data de isolamento	Raça	Origem	Resistência Fenotípica	Perfil de resistência
1 (554)	17-05-2011	Dálmata	Suabe de pele	OX-NA-PEN-AMP-KF-EFT-CLI-ERY-KAN-TET-RIF-STX-CIP	PR1
2 (559)	20-05-2011	SRD	Suabe de pele	OX-NA-PEN-AMP-KF-EFT-CLI-ERY-KAN-TET-RIF-STX-CIP	PR1
3 (561)	22-05-2011	York Shire	Suabe de pele	OX-NA-PEN-AMP-KF-EFT-CLI-ERY-KAN-TET-RIF-STX-CIP	PR1
4 (619)	07-07-2011	SRD	Suabe de pele	OX-NA-PEN-AMP-KF-EFT-CLI-ERY-KAN-TET-RIF-STX-CIP	PR1
5 (651)	15-07-2011	SRD	Suabe de pele	OX-NA-PEN-AMP-KAN-TET-STX	PR2
6 (695)	16-11-2011	Dálmata	Suabe de pele	OX-NA-PEN-AMP-KF-EFT-CLI-ERY-KAN-STX-CIP	PR3
7 (705)	19-08-2011	Cocker Spaniel Americano	Suabe de pele	OX-NA-PEN-AMP-EFT-CLI-ERY-KAN-STX	PR4
8 (786)	01-10-2011	Labrador	Suabe de ouvido	OX-NA-PEN-AMP-KF-EFT-CLI-ERY-KAN-TET-STX-CIP	PR5
9 (795)	29-09-2011	SRD	Suabe de pele	OX-NA-PEN-AMP-KF-EFT-CLI-ERY-KAN-TET-RIF-STX-CIP	PR1
10 (819)	14-10-2011	Poodle	Suabe de pele	OX-NA-AMP-ERY-KAN-STX	PR6
11 (833)	18-10-2011	Teckel	Suabe de pele	OX-NA-PEN-AMP-ERY-KAN-CIP	PR7
12 (843)	25-10-2011	Shih Tzu	Suabe de pele	OX-NA-PEN-AMP-KF-EFT-CLI-ERY-KAN-TET-RIF-STX-CIP	PR1
13 (890)	22-11-2011	SRD	Suabe de pele	OX-NA-PEN-AMP-KF-EFT-CLI-ERY-KAN-TET-STX-CIP	PR5
14 (1037)	14-03-2012	Fox Terrier	Suabe de pele	OX-NA-PEN-AMP-KF-EFT-CLI-ERY-KAN-TET-RIF-STX-CIP	PR1
15 (1044)	16-03-2012	Pastor Alemão	Suabe de ouvido	OX-NA-PEN-AMP-KF-EFT-CLI-ERY-KAN-TET-STX-CIP	PR5
16 (1259)	17-07-2012	SRD	Suabe de ouvido	OX-NA-PEN-AMP-KF-EFT-CLI-ERY-KAN-TET-RIF-STX-CIP	PR1
17 (1378)	17-09-2012	Pastor Alemão	Suabe de pele	OX-NA-PEN-AMP-CLI-ERY-KAN-STX-CIP	PR8
18 (1379)	18-09-2012	Dálmata	Suabe de pele	OX-NA-PEN-AMP-KF-EFT-CLI-ERY-KAN-TET-RIF-STX-CIP	PR1
19 (1382)	19-09-2012	Tosa	Suabe de pele	OX-NA-PEN-AMP-KF-EFT-CLI-ERY-KAN-TET-RIF-STX-CIP	PR1
20 (1397)	01-10-2012	Rottweiller	Suabe de fístula	OX-NA-PEN-AMP-KF-EFT-CLI-ERY-KAN-TET-STX-CIP	PR5

*OX= oxacilina, NA= ác. Nalidíxico, PEN= penicilina G, AMP= ampicilina, KF= cefalotina, EFT= ceftiofur, CLI= clindamicina, ERY= eritromicina, KAN=kanamicina, TET= tetraciclina, RIF= rifampicina, STX= Sulfa+trimetropim, CIP= ciprofloxacina.

Tabela 3 - Sequências de DNA das seis repetições encontradas nos isolados de *Staphylococcus pseudintermedius* resistente a metilina e respectivas sequências de aminoácidos. As cores identificam códons equivalentes

Código para a repetição	Sequência de DNA										Sequência de aminoácidos
R01	GGT	GAA	AAC	AAA	GCT	GAA	GAC	AAA	GGC	AAC	GENKAEDKGN
R02	AAA	GAA	AAC	AAA	GCT	GAA	GAT	AAA	GGC	AGC	KENKAEDKGS
R03	AAA	GAA	GAC	AAA	GCT	GAA	GAT	AAA	GGC	AGC	KEDKAEDKGS
R04	AAA	GAA	GGC	AAA	GCT	GCA	GAC	AAA	GGT	ATG	KEGKAADKGM
R05	AAA	GAA	GAT	AAA	GCT	AAA	GAC	AAA	GAC	AAC	KEDKAKDKDN
R06	AAA	GAA	GAC	AAA	GCT	GAA	GAC	AAA	GGC	AAC	KENKAEDKGN
Sequência consenso	AAA	GAA	GAC	AAA	GCT	GAA	GAC	AAA	GGC	AXC	KEXKAEDKGX

encontrados na mesma posição de diferentes repetições.

Tabela 4 - Tipos de *spa* encontrados em isolados de *Staphylococcus pseudintermedius* resistente a metilina.

Isolado	Tipo de <i>spa</i>	Sequência de repetições
554	t01	R3 R3 R3 R5 R4
559	t01	R3 R3 R3 R5 R4
561	t01	R3 R3 R3 R5 R4
619	t02	R3 R3
651	t03	R1 R2 R3 R3 R3 R5 R4
695	t03	R1 R2 R3 R3 R3 R5 R4
705	t04	R1 R2 R3 R3 R3 R3 R5 R4
786	t01	R3 R3 R3 R5 R4
795	t01	R3 R3 R3 R5 R4
819	t05	R1 R2 R6 R2 R5 R4
833	t01	R3 R3 R3 R5 R4
890	t01	R3 R3 R3 R5 R4
1044	t06	R3 R3 R3 R5
1259	t01	R3 R3 R3 R5 R4
1378	t07	R1 R2 R3 R3 R3 R5
1379	t03	R1 R2 R3 R3 R3 R5 R4
1382	t01	R3 R3 R3 R5 R4
1397	t01	R3 R3 R3 R5 R4

5 DISCUSSÃO

Dos 92 isolados de *Staphylococcus* coagulase positiva, provenientes de cães atendidos no HCV, testados quanto ao perfil fenotípico de resistência frente a antimicrobianos, a maioria (78,4%) foi identificada como suscetível à oxacilina. Entretanto, os 20 isolados que apresentaram resistência à oxacilina demonstraram ser resistentes a até 13 dos 16 antimicrobianos testados. Apenas frente à gentamicina, florfenicol e vancomicina não houve a detecção de isolados resistentes nesse grupo. Esse resultado demonstra a dificuldade em instituir um tratamento eficaz nas infecções causadas por esse grupo de isolados, o que pode contribuir para a permanência de quadros crônicos ou recidivantes.

Todos os isolados resistentes à oxacilina foram confirmados como pertencentes à espécie *S. pseudintermedius*, concordando com outros estudos que demonstraram essa a espécie mais importante nesse grupo em amostras clínicas provenientes de cães. Bannoerhr et al. (2007) sugeriram que está ocorrendo uma disseminação global de clones MRSP, o que torna a tipificação desses isolados de extrema importância. Apesar de técnicas como PFGE e ribotificação terem sido amplamente utilizadas, técnicas baseadas em sequenciamento como MLST e *spa*-typing tem apresentado aplicabilidade crescente em estudos de vigilância epidemiológica por permitirem a comparação entre laboratórios.

Com a tipificação do gene *spa* é possível coletar os resultados e harmoniza-los em um banco de dados de acesso gratuito para usuários da internet. Para *S. pseudintermedius*, ainda não há um banco de dados online para análise de tipos de *spa*, assim como há para *S. aureus* (Ridom StaphType™ e Bionumerics™). Todas as repetições (R01 a R06) encontradas em nossos isolados já haviam sido anteriormente relatadas por Modley et al. (2009), porém somente dois tipos de *spa* (t03 e t04) são semelhantes aos tipos anteriormente publicados. O Hospital de Clínicas Veterinárias da UFRGS recebe para atendimento animais de diferentes locais dos municípios da Região Metropolitana de Porto Alegre. A observação de um mesmo tipo de *spa* em diferentes pacientes atendidos em diferentes períodos sugere a disseminação de um mesmo clone na população canina desta localidade. Entre os isolados analisados, 50% apresentaram o mesmo *spa* typing, embora tenham sido obtidos com intervalos de até um ano entre coletas. A disseminação geográfica de linhagens clonais de MRSP foi identificada por MLST (BANNOEHR et al., 2007),

identificando dois tipos predominantes de sequências no Norte da Europa (ST71) e nos EUA (ST68). Posteriormente, um único tipo de *spa* e três tipos de PFGE foram identificados nos isolados americanos pertencentes ao ST68. Além disso, cinco tipos de *spa* e dois tipos de PFGE foram encontrados no clone europeu ST71.

No presente estudo o *spa*-type predominante (t01) apresentou um perfil de multi-resistência semelhante e que incluía treze antimicrobianos testados, indicando que há a disseminação dessa linhagem clonal na região.

6 CONCLUSÃO

Staphylococcus pseudintermedius resistentes a meticilina estão envolvidos em casos de dermatites e otites em cães atendidos no Hospital de Clínicas Veterinárias-UFRGS. Isolados MRSP apresentam perfil de multi-resistência frente aos principais antimicrobianos utilizados no tratamento dessas afecções. A tipificação do gene *spa* dos isolados MRSP demonstrou a presença de um grupo clonal predominante.

REFERÊNCIAS

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

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

BANNOEHR, J., GUARDABASSI, L. *Staphylococcus pseudintermedius* in the dog: taxonomy, diagnostics, ecology, epidemiology and pathogenicity. **Veterinary Dermatology**. v. 23, p. 253-266, 2012.

BEN ZAKOUR et al. Comparative genomics of the *Staphylococcus intermedius* group of animal pathogens. **Frontiers in Cellular and Infectious Microbiology**. v. 2, 2012.

CHENG, Alice G. et al. A play in four acts: *Staphylococcus aureus* abscess formation. **Trends in Microbiology**, Chicago, v, 19, p 225-232, 2011.

Clinical and Laboratory Standards Institute. **Performance standards for antimicrobial disk and dilution susceptibility tests for bacteria isolated from animals. CLSI document VET01-S2**. Wayne, 2013.

COYNER, Kimberly S. The emergence and prevalence of MRSA, MRSP and MRSS in pets and people. **Veterinary Medicine**. Las Vegas, p. 516-521, 2012.

COYNER, Kimberly S. Maniging MRSA, MRSP and MRSS. **Veterinary Medicine**. Las Vegas, p. 32-38, 2013.

DEVRIESE, Luc A. et al. *Staphylococcus pseudintermedius* sp. nov., a coagulase-positive species from animals. **International Journal Of Systematic And Evolutionary Microbiology**, Great Britain, v. 55, p.1569-1573, 2005.

DEVRIESE, Luc A. et al. *Staphylococcus pseudintermedius* versus *Staphylococcus intermedius*. **Veterinary Microbiology**, Belgium, v. 133, n. 2, p.206-207, abr. 2008.

FITZGERALD, J. Ross. The *Staphylococcus intermedius* group of bacterial pathogens: species re-classification, pathogenesis and the emergence of meticillin resistance. **Veterinary Dermatology**, UK, v. 20, p. 490-495, 2009.

FRANK, Linda A.; LOEFFLER, Anette. Meticillin-resistant *Staphylococcus pseudintermedius*: clinical challenge and treatment options. **Veterinary Dermatology**, USA, v. 23, p.283-292, fev. 2012.

GIRARDINI, Lilian Kolling. **Identificação de grupos clonais e presença de genes associados à formação de biofilmes (*icaA* e *icaD*) em *Staphylococcus aureus* isolados de propriedades produtoras de leite bovino.** 89 f. Tese de Doutorado. Medicina Veterinária, UFRGS, 2013.

GORTEL, Kinga. Recognizing Pyoderma. More Difficult than it May Seem. **Veterinary Clinics Of North America: Small Animal Practice**, Canada, v. 43, p.1-18, 2013.

GROSS, Thelma Lee et al. **Doenças de pele do cão e do gato.** São Paulo: Roca, 2009. 889 p.

GUAGUÈRE, Éric; BENSIGNOR, Emmanuel. **Terapêutica Dermatológica do Cão.** São Paulo: Roca, 2005. 299 p.

GUARDABASSI, Luca; SCHWARZ, Stefan; LLOYD, David H. Pet animals as reservoirs of antimicrobial-resistant bacteria. **Journal Of Antimicrobial Chemotherapy**, UK, v. 54, n. 2, p.321-332, ago. 2004.

GUARDABASSI, Luca; JENSEN, Lars B., KRUSE, Hilde. **Guia de Antimicrobianos em Veterinária.** Porto Alegre: Artmed, 2010. 268 p.

GYLES, C. L. et al. **Pathogenesis of Bacterial Infections in Animals.** 4. Ed. USA: Wiley-blackwell, 2010. 651 p. *apud* GIRARDINI, 2013.

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

HANSELMAN, Beth A.; KRUTH, Stephen; WEESE, J. Scott. Methicillin-resistant staphylococcal colonization in dogs entering a veterinary teaching hospital. **Veterinary Microbiology**. Canada, v. 128, p. 277-281, 2008.

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

ISHIHARA, Kanako et al. Occurrence and Molecular Characteristics of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* and Methicillin-Resistant *Staphylococcus pseudintermedius* in an Academic Veterinary Hospital. **American Society for Microbiology**. v. 76, n. 15, p. 5165-5174, ago. 2010.

KADLEC, Kristina; SCHWARZ, Stefan. Antimicrobial resistance of *Staphylococcus pseudintermedius*. **Veterinary Dermatology**, Germany, v. 23, n. 4, p.276-283, jun. 2012.

LPSN. **List of Prokaryotic names with Standing in Nomenclature**. Disponível em: <<http://www.bacterio.net/staphylococcus.html>> Acesso em: 09 dez. 2014.

MAHOUDEAU, Isabelle et al. Frequency of Isolation of *Staphylococcus intermedius* from Humans. **Journal Of Clinical Microbiology**, France, v. 35, n. 8, p.2153-2154, ago. 1997.

MOODLEY, Arshnee et al. Tandem repeat analysis of staphylococcal protein A (*spa*) gene in methicillin-resistant *Staphylococcus pseudintermedius*. **Veterinary Microbiology**. v. 135, p. 320-326, 2009.

MOODLEY, Arshnee; DAMBORG, Peter; NIELSEN, Soren Saxmose. Antimicrobial resistance in methicillin susceptible and methicillin resistant *Staphylococcus pseudintermedius* of canine origin: Literature review from 1980 to 2013. **Veterinary Microbiology**, Denmark, v. 171, p.337-341, 2014.

PLATA, Konrad; ROSATO, Adriana E.; WEGRZYN, Grzegorz. *Staphylococcus aureus* as an infectious agent: overview of biochemistry and molecular genetics of its pathogenicity. **Acta BiochimicaPolinica**. Poland, v. 56, n 4. p 597-612. 2009.

QUINN P. J. et al. **Microbiologia Veterinária e Doenças infecciosas**. Primeira edição. Artmed, 2005. 512 p.

QUINN, P. J. et al. **Veterinary Microbiology and Micobial disease**. Second Edition. Wiley-Blackwell, 2011. 912 p.

RHODES, Karen Helton. **Dermatologia de pequenos animais: consulta em 5 minutos**. Rio de Janeiro: Revinter, 2005. 702 p.

RUBIN, Joseph E.; CHIRINO-TREJO, Manuel. Prevalence, sites of colonization, and antimicrobial resistance among *Staphylococcus pseudintermedius* isolated from healthy dogs in Saskatoon, Canada. **Journal of Veterinary Investigation**. Canada, v. 23, p. 351-354, 2011.

SANZ, Elena Gómes. ***Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus pseudintermedius* in animal: Molecular epidemiology, Antimicrobial Resistance, Virulence and Zoonotic Potential**. 381 f. Tese de Doutorado – Facultad de Ciencias, Estudios Agroalimentarios e Informatica, 2013.

SIGH, Ameet et al. Characterization of the biofilm forming ability of *Staphylococcus pseudintermedius* from dogs. **BMC Veterinary Research**. p. 1746-1761, 2013.

TERAUCH, R. et al. Isolation of exfoliative toxin from *Staphylococcus intermedius* and its local toxicity in dogs. **FEMS MICROBIOL LETT**. v. 94, p. 19-29, 2003. *Apud* VAN DUIJKEREN, 2011

VAN DUIJKEREN et al. Review on methicillin-resistant *Staphylococcus pseudintermedius*. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**. september 2011.

WEESE, J. Scott; VAN DUIJKEREN, Engeline. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus pseudintermedius* in veterinary medicine. **Veterinary Microbiology**, Canada, v. 140, p.418-429, 2010.

YORI, Keita et al. Identification of a novel *Staphylococcus pseudintermedius* exfoliative toxin gene and its prevalence in isolates from canines with pyoderma and healthy dogs. **Federation of European Microbiological Societies**. p. 169-175, 2010.