

CAROLINA SASSE ULLOA STEIN

**Avaliação dos Critérios Interpretativos de Oxacilina em Isolados Clínicos de
*Staphylococcus pseudintermedius***

SÃO PAULO

2020

CAROLINA SASSE ULLOA STEIN

**Avaliação dos Critérios Interpretativos de Oxacilina em Isolados
Clínicos de *Staphylococcus pseudintermedius***

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Epidemiologia Experimental aplicada a Saúde Animal da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para a obtenção do título de Mestre/Doutor em Ciências.

Departamento:

Medicina Veterinária Preventiva e Saúde
Animal

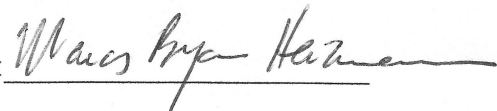
Área de concentração:

Epidemiologia Experimental Aplicada às
Zoonoses

Orientador:

Prof. Dr. Marcos Bryan Heinemann

De acordo:



Orientador

São Paulo
2020

Obs: A versão original encontra-se disponível na Biblioteca da FMVZ/USP

Autorizo a reprodução parcial ou total desta obra, para fins acadêmicos, desde que citada a fonte.

DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO

(Biblioteca Virgínia Buff D'Ápice da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo)

T. 3939
FMVZ

Stein, Carolina Sasse Ulloa
Avaliação dos critérios interpretativos de oxacilina em isolados clínicos de *Staphylococcus pseudintermedius* / Carolina Sasse Ulloa Stein. – 2020.
65 f. : il.

Dissertação (Mestrado) – Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Animal, São Paulo, 2020.

Programa de Pós-Graduação: Epidemiologia Experimental Aplicada às Zoonoses. Área de concentração: Epidemiologia Experimental Aplicada às Zoonoses.

1. *Staphylococcus pseudintermedius*. 2. Antibióticos. 3. Pontos de corte. 4. Concentração Inibitória Mínima. 5. ECOFF. I. Título.

CERTIFIED

We certify that the Research "Evaluation of the Interpretative Criteria for Oxacillin in Clinical Isolates of Staphylococcus pseudintermedius", protocol number CEUAX 1057170517 (ID 000744), under the responsibility Marcos Bryan Heinemann, agree with Ethical Principles in Animal Research adopted by Ethic Committee in the Use of Animals of School of Veterinary Medicine and Animal Science (University of São Paulo), and was approved in the meeting of day June 01, 2017.

Certificamos que o protocolo do Projeto de Pesquisa intitulado "Avaliação dos Critérios Interpretativos de Oxacilina em Isolados Clínicos de Staphylococcus pseudintermedius", protocolado sob o CEUAX nº 1057170517, sob a responsabilidade de Marcos Bryan Heinemann, está de acordo com os princípios éticos de experimentação animal da Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, e foi aprovado na reunião de 01 de junho de 2017.



Profa. Dra. Anneliese de Souza Traidi
Presidente da Comissão de Ética no Uso de Animais
Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade
de São Paulo



Roseli da Costa Gomes
Secretária
Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade
de São Paulo

FOLHA DE AVALIAÇÃO

Autor: STEIN, Carolina Sasse Ulloa

Título: Avaliação dos Critérios Interpretativos de Oxacilina em Isolados Clínicos de *Staphylococcus pseudintermedius*

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Epidemiologia Experimental aplicada à Saúde Animal da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências.

Data: ____/____/____

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer primeiramente a todos os professores, Marcos, Alessandro, Eleine, Andréia e outros das disciplinas da graduação até a pós-graduação que contribuíram para a minha formação acadêmica. Estes que são pilares da minha educação e que fazem diferença na minha trajetória e no meu futuro. Também muito importante, aos colegas que contribuíram para o processamento das amostras, desde o fornecimento pelo Laboratório São Francisco de Blumenau, o espaço para o processamento como o Laboratório de Análises Clínicas da FURB e o LAC da USP, o treinamento recebido pelo Antônio e Gisele, e toda ajuda na área estatística pela Mariana. Agradeço pela bolsa de estudos fornecida pela CAPES (168324/2017-2), onde foi fundamental para a minha dedicação exclusiva ao estudo. E a todos os meus familiares e amigos pelo suporte e paciência em todos os momentos.

'A mente que se abre a uma nova idéia jamais voltará ao seu tamanho original.'

Oliver Wendell Holmes Sr.

RESUMO

STEIN, C. S. U. **Avaliação dos Critérios Interpretativos de Oxacilina em Isolados Clínicos de *Staphylococcus pseudintermedius***. 2020. 65 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2020.

Staphylococcus pseudintermedius é um patógeno comumente encontrado em pele de cães, e a resistência à oxacilina tem emergido entre as últimas décadas. Os *Staphylococcus pseudintermedius* resistentes a meticilina (MRSP) limitam as opções terapêuticas na rotina clínica. *S. pseudintermedius* podem colonizar ou causar infecções em cães e gatos saudáveis e doentes, implicando um risco potencial de transmissão dessas bactérias para seres humanos. O BrCAST que é o Comitê brasileiro de testes de susceptibilidade a antimicrobianos, foi criado no Brasil em 2016 com objetivo de padronizar os testes de sensibilidade bacteriana e portanto novos estudos epidemiológicos são incentivados para geração de dados populacionais. O objetivo do estudo foi determinar a susceptibilidade de isolados clínicos de *S. pseudintermedius* à oxacilina através da determinação da concentração inibitória mínima (CIM), do teste de disco difusão, e a presença de *mecA* e *mecC* em isolados clínicos; comparar esses resultados com o CLSI (Instituto de Padrões Clínicos e Laboratoriais) e BrCAST. Foram utilizadas 211 amostras *S. pseudintermedius*, sendo 28,9% *S. pseudintermedius* resistentes à oxacilina pela presença do gene *mecA*; 22,37% pela resistência à oxacilina pelo teste de disco difusão; e 27,48% pela CIM. Em 17 amostras foram identificadas a presença do gene *mecC*. A concordância entre os testes na detecção de resistência à oxacilina comparado a presença de *mecA* foi: oxacilina pelo método de disco difusão (concordância leve), CIM de oxacilina (concordância moderada) e cefoxitina pelo método de disco difusão não apresentou concordância. ECOFFs calculados com 95% da população estudada apresentaram ponto de corte de 0,5ug/L, compatível com do CLSI (2019). Em relação a multiresistência, 45% das amostras de *S.pseudintermedius* foram classificadas como multiresistentes. O três antibióticos com mais amostras resistentes na disco difusão foram: tetraciclina (54,02%), penicilina (49,76 %) e sulfametoxazol-trimetoprim (40,28%).

Palavras-chave: *Staphylococcus pseudintermedius*. Antibióticos. Pontos de corte. Concentração Inibitória Mínima. ECOFF.

ABSTRACT

STEIN, C. S. U. **Evaluation of oxacillin interpretative criteria of clinical isolates of *Staphylococcus pseudintermedius***. 2020. 65 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2020.

Staphylococcus pseudintermedius is a common pathogen in dogs and oxacillin resistance has emerged over recent decades. This, which confers resistance to all B-lactam drugs, limits therapeutic options in cases of infections in the clinical routine. *S. pseudintermedius* can colonize or cause infections in healthy and sick dogs and cats, posing a potential risk of transmitting these bacteria to humans. BRCAS was created in Brazil in 2016 with the objective of standardizing bacterial sensitivity tests and therefore new epidemiological studies are encouraged to generate population data. The aim of the study was to determine the susceptibility of clinical isolates of *S. pseudintermedius* to oxacillin by determining the minimum inhibitory concentration (MIC), from the diffusion disc test, and the presence of *mecA* and *mecC* in clinical isolates; compare these results with CLSI and BRCAS determining the ECOFF of the studied population. 211 samples were identified by the PCR technique as *S. pseudintermedius*, of which 28.9% are considered *S. pseudintermedius* resistant to oxacillin due to the presence of the *mecA* gene; and 22.37% for resistance to oxacillin by the disk diffusion test and 27.48% by MIC. 17 samples was identified presence of the *mecC* gene. The agreement between the tests for the detection of oxacillin resistance compared to the presence of *mecA* was: oxacillin by the disk diffusion method (mild agreement), oxacillin MIC (moderate agreement) and cefoxitin by the disk diffusion method did not show agreement. ECOFFs calculated with 95% of the studied population showed a cutoff point of 0.5ug / L, compatible with that of CLSI (2019). 45% of *S. pseudintermedius* samples are multiresistant. The three antibiotics with the most resistant samples in the diffusion disc were: tetracycline (54.02%), penicillin (49.76%) and sulfamethoxazole-trimethoprim (40.28%).

Keywords: *Staphylococcus pseudintermedius*, antibiotics, cutoff points, minimum inhibitory concentration, ECOFF

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Metodologia da Concentração Inibitória Mínima (CIM) utilizada no estudo. São Paulo, 2020	29
Figura 2 - Interpretação do valor estatístico de κ , retirado de Landis JR, Koch GG. The measurement of observer agreement for categorical data. Biometrics. 33(1):159-74, 1977.....	30
Figura 3 - Resultado da AFLP de <i>S.pseudintermedius</i> de cães. São Paulo, 2020.....	31
Figura 4 – Heatmap com o resultado da disco difusão de 95 amostras multiresistentes..	34

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Quantitativo da diferença entre a interpretação dos resultados da disco difusão com referências de pontos de corte do CLSI(2019) e BRCAS(2019).....	37
Tabela 2 - Distribuição do tamanho obtido nos testes de disco difusão de 12 antibióticos para as 211 amostras. São Paulo, 2020.....	39
Tabela 3 - Quantidade de amostras segundo o teste de disco difusão. São Paulo, 2020	40
Tabela 4 - Concentração inibitória mínima para oxacilina das 211 amostras utilizadas no estudo. São Paulo, 2020.....	41
Tabela 5 - Resultado de ECOFF da Oxacilina para <i>S. pseudintermedius</i> . São Paulo, 2020	43
Tabela 6 - Resultados (número de amostras e sua proporção) de 4 testes para a detecção de resistência aos β -lactâmicos com o valor de p das comparações. São Paulo, 2020...	49
Tabela 7 - Valores de concordância com o método MecA (κ C) entre os outros três métodos; e distribuição da discordância por método de detecção (N e %).....	50
Tabela 8 – Abordagem diagnóstica do teste de disco difusão de acordo com ponto de corte do CLSI (2019) e BRCAS (2019) considerando a presença do gene <i>mecA</i> como teste ouro	51
Tabela 9 – Abordagem diagnóstica do teste Concentração Inibitória Mínima considerando a presença do gene <i>mecA</i> como teste ouro	52
Tabela 10 - Características das 211 amostras utilizadas no estudo. São Paulo, 2020.....	53

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1 - Resultado do teste de Disco Difusão de 211 amostras de <i>S. pseudintermedius</i> utilizadas no estudo. São Paulo, 2020.....	33
Gráfico 2 - Resultados do ECOFFinder para a distribuição CIM de oxacilina de <i>S. pseudintermedius</i> do estudo	42
Gráfico 3 - Resultado do teste de PCR para identificação de gene <i>mecA</i> em 211 amostras de <i>S.pseudintermedius</i> de cães. São Paulo, 2020.....	46
Gráfico 4 - Resultado do teste de PCR para identificação de gene <i>mecC</i> em 211 amostras de <i>S.pseudintermedius</i> de cães. São Paulo, 2020.....	49
Gráfico 5 - Dados epidemiológico da Raça dos animais da amostragem.....	54

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 - Valores de ponto de corte de CIM e DD do CLSI e EUCAST nos anos de 2018 e 2019.....	23
Quadro 2 - Diferença entre os pontos de corte do CLSI(2019) e BrCAST(2019) considerados no estudo.....	38
Quadro 3 - Diagrama de dispersão de diâmetro de halo da Disco Difusão e CIM de 211 isolados de <i>S. pseudintermedius</i> avaliados pelos pontos de interrupção do BrCAST 2019 (linhas pretas)	44
Quadro 4 - Diagrama de dispersão de diâmetro de halo da Disco Difusão e presença de <i>mecA</i> de 211 isolados de <i>S. pseudintermedius</i> avaliados pelos pontos de interrupção do BrCAST 2019 (linhas pretas). São Paulo, 2020.....	47
Quadro 5 - Diagrama de dispersão de diluições de CIM e presença de <i>mecA</i> de 211 isolados de <i>S. pseudintermedius</i> avaliados pelos pontos de interrupção do CLSI 2019 (linhas pretas). São Paulo, 2020.	48

ANEXOS

Anexo 1 - Resultado da Disco difusão de 95 amostras multiresistentes. São Paulo, 2020.. 56

Anexo 2 - Diferença entre a interpretação dos resultados da disco difusão com referências de pontos de corte do CLSI(2019) e BrCAST(2019) 57

LISTA DE ABREVIATURAS

MIC = concentração inibitória mínima em inglês (minimum concentration inhibitory)

CIM = concentração inibitória mínima

DD = disco difusão

PCR = reação em cadeia pela polymerase

OXA = oxacilina

CFO = cefoxitina

CVN = cefovecina

AMI = amicacina

ENRO = enrofloxacin

LZN = linezolida

PEN = penicilina

CLI = clindamicina

SUT = sulfametoxazol-trimetoprim

EST = estreptomicina

GEN = gentamicina

TET = tetraciclina.

AFLP = Polimorfismo de Comprimento de Fragmentos Amplificados (Amplified Fragment Length Polymorphism)

MRSP = *Staphylococcus pseudintermedius* resistente à meticilina

MRSA = *Staphylococcus aureus* resistente à meticilina

CLSI = The Clinical & Laboratory Standards Institute (Instituto de Padrões Clínicos e Laboratoriais)

EUCAST = Comitê Europeu de Testes de Susceptibilidade a Antimicrobianos (European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing)

BrCAST = Comitê Brasileiro de Testes de Susceptibilidade a Antimicrobianos (Brazilian Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing)

ECV = valor de corte epidemiológico

ECOFF = epidemiologic cutoff values (ponto de corte epidemiológico)

SIG = *staphylococcus intermedius* group

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	17
2	REVISÃO DE LITERATURA.....	20
3	OBJETIVOS	24
3.1	Objetivo geral	24
3.2	Objetivo específico	24
4	MATERIAIS E MÉTODOS.....	25
4.1	Amostras.....	25
4.2	Armazenamento das amostras	25
4.3	Extração do DNA.....	25
4.4	Testes genotípicos	26
4.4.1	Identificação genotípica de <i>S. pseudintermedius</i>	26
4.4.2	Identificação do gene <i>mecA</i>	26
4.4.3	Testes de Diversidade Molecular - Técnica de Polimorfismo do Comprimento de Fragmentos Amplificados (AFLP).....	27
4.5	Teste de susceptibilidade antimicrobiana	27
4.5.1	Avaliação qualitativa (disco difusão).....	28
4.5.2	Concentração inibitória mínima (CIM).....	28
4.5.3	Análise estatística	29
4.5.4	ECOFF da CIM.....	30
4.5.5	Abordagem diagnóstica	31
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	31
6	CONCLUSÕES	55
7	ANEXOS	56
8	REFERÊNCIAS	58

1 INTRODUÇÃO

Staphylococcus pseudintermedius resistente à oxacilina tem emergido e disseminado ao longo dos anos, sendo considerado um sério problema emergente na medicina veterinária de pequenos animais desde então (GREENE et al., 2012). *S. pseudintermedius* é considerado o agente isolado com mais frequência de pioderma canino (DEVRIESE et al., 2009), sendo o motivo mais comum para o uso de antimicrobianos em cães.

Desde seu surgimento em 1999, as proporções de *S. pseudintermedius* resistente à metilicina (MRSP) estão em uma tendência crescente na Europa, variando de 2,0% na Finlândia, 16,9% na França e até 33% na Itália (VENTRELLA et al., 2017; HAENNE et al., 2014). Outros estudos mostram que a ocorrência de MRSP pode variar entre 0 e 66% (MEDLEAU et al., 1986; KANIA et al., 1986; SASAKI et al., 2007; GRIFFETH et al., 2008; KAWAKAMI et al., 2010).

Os estafilococos resistentes à metilicina (MRS) são resistentes a cefalosporinas, amoxicilina / ácido clavulânico, imipenem, ampicilina / sulbactam e outros antimicrobianos β -lactâmicos. O acrônimo MRS (metilicina resistente) é comumente usado, embora a oxacilina seja atualmente o agente de escolha para testes de resistência (CLSI, 2019). O teste mais confiável para identificar a MRS é a PCR que detecta a presença do gene *mecA*, que codifica a proteína suplementar de ligação à penicilina, PBP2a (SCHISLER et al., 2009).

No estudo de Wedley et al. (2014), no Reino Unido em 2008-09, entre as espécies isoladas de *Staphylococcus* coagulase-positivo, *S. pseudintermedius* foi o mais comum (11%) em animais. Segundo Griffeth et al. (2008), *S. pseudintermedius* é mais comumente associado com colonização; e infecção (PENNA et al., 2010) em cães comparados com o *S. aureus*, sugerindo que *S. pseudintermedius* é mais adaptado em colonizar as mucosas e pele de cães. Wendley et al. (2014) cita que ocorre uma variação da prevalência de MRSP entre estudos recentes. Visto isso, é de extrema importância os estudos que demonstrem uma prevalência dessas bactérias cada vez mais resistentes em populações de cães em determinadas regiões do Brasil.

A resistência aos agente antibacterianos está cada vez mais relevante em seres humanos e animais. O uso incorreto desses fármacos resulta na seleção de bactérias resistentes, podendo se tornar predominante em uma população e até transferir material

genético para bactérias susceptíveis, que então adquirem resistência (QUINN et al., 2006). Estes genes de resistência podem ser disseminados por meio de mecanismos de transferência horizontal.

Wielders et al. (2001) evidencia a transferência de genes de *S. aureus* isolados de uma criança e cita que pode ocorrer a transferência do gene *mecA* de MRSP para outras espécies de *Staphylococcus* em seres humanos. Apesar da colonização e infecção com MRSP ser menor em seres humanos, o potencial de transferência do novo elemento *SCCmec* do MRSP para outras espécies de *Staphylococcus* spp. como *S. aureus*, e o subsequente clone se espalhar como um novo clone de MRSA, pode ser uma grande ameaça para a saúde humana no futuro (DUIJKEREN et al., 2011).

Estudos demonstram uma alta prevalência de resistência microbiana em isolados de *S. pseudintermedius* de cães (BOTONI, 2013; WEDLEY et al., 2014) o que torna isso preocupante. O MRSP podem causar infecções em cães e o tratamento pode ser mais difícil se a resistência bacteriana limitar as opções terapêuticas. Esses animais também são um importante reservatório para a transmissão da bactéria para outros animais e humanos (HANSELMAN et al., 2009). No estudo de Somaji et al. (2016) dos 24 casos clínicos em humanos em que foram isolados *S. pseudintermedius*, 91,7% foi confirmado o contato com cães temporariamente com infecções refletindo uma possibilidade de transmissão zoonótica entre as espécies.

Os laboratórios clínicos utilizavam quase predominantemente o agente preditor cefoxitina para detectar a resistência a beta-lactâmicos mediada por *mecA* ao testar isolados de estafilococo de seres humanos (CLSI, 2019). O teste de disco de cefoxitina tem sido mostrado em vários estudos como sendo o preditor mais confiável da presença de *mecA* em *S. aureus* e CoNS. No entanto, o teste é insuficiente para os isolados pertencente ao Grupo de *Staphylococcus intermedius* (SIG) de origem humana e veterinária como demonstrado por Wu et al. (2016). Sendo recomendado o uso da oxacilina para detectar a resistência a beta-lactâmicos (BRCAST, 2019).

Ao contrário dos isolados humanos de *S. aureus*, os isolados veterinários de SIG são tipicamente susceptíveis à meticilina (VAN DUIJKEREN et al., 2004). No entanto, a incidência de *S. pseudintermedius* resistente à meticilina (MRSP) aumentou, apresentando um importante desafio para os veterinários.

No Brasil utilizamos o BrCAST (Brazilian Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing) para interpretação dos testes de sensibilidade microbiana. Este

comitê foi criado em 2016 para padronização dos testes no nosso país. Até este ano, os laboratórios podiam escolher como referência os comitês EUCAST ou CLSI para interpretação dos pontos de corte dos testes. Estas referências utilizadas pelos comitês são baseadas em sua maioria em pesquisas feitas em humanos. Não existem ainda pesquisas com isolados de animais para termos uma referência na Medicina Veterinária no Brasil. Além disso, há diferenças entre os dados do BRCAST e do CLSI, já que são de localidades diferentes, o que pode ocorrer também com os dados no Brasil. Não há pesquisa que demonstre valores de referências do Brasil próximos ao CLSI ou EUCAST. É de suma importância estudos epidemiológicos nacionais para conhecer qual a característica dos nossos isolados em animais.

O ECOFF (epidemiologic cutoff values), utilizado pelo EUCAST, é um valor de ponto de corte epidemiológico de uma população estudada que distingue entre organismos com e sem mecanismos de resistência expressadas fenotipicamente no teste de Concentração inibitória mínima (EUCAST, 2020). No Brasil não há estudos determinando o ECOFF de *S.pseudintermedius* para nenhum antibiótico.

Contudo, os pontos de corte estão sendo revistos e há um incentivo aos pesquisadores nacionais a testarem os isolados brasileiros frente a vários antimicrobianos a fim de criar pontos de corte próprios. É preciso fazer uma análise crítica e avaliar qual a melhor metodologia se adequa à nossa realidade.

2 REVISAO DE LITERATURA

Os estafilococos mais relevantes clinicamente na medicina veterinária são *S. aureus* e os membros do grupo *S. intermedius*, particularmente *S. pseudintermedius* (WEESE et al., 2010). O grupo de estafilococos coagulase positiva inclui: *S. aureus*, *S. intermedius*, *S. pseudintermedius* e *S. delphini*, os três últimos são referidos como Grupo de *Staphylococcus intermedius* (SIG) (WU et al., 2015). Em 2005 foi descrito *S. pseudintermedius* isolados de cães, gatos, cavalos e papagaio (DEVRIESE et al., 2005). Recentemente os isolados identificados como *S. intermedius* pelas características fenotípicas foram reclassificados e o grupo foi dividido em 3 espécies: *S. intermedius*, *S. pseudintermedius* e *S. delphini* baseado no sequenciamento do nucleotídeo do gene *sodA* e *hsp60* (SASAKI et al., 2007). A diferenciação dos membros desse grupo requer análise molecular (SASAKI et al. 2010), embora a espectrometria de massa por tempo de voo por ionização por dessorção a laser assistida por matriz (MALDI-TOF MS) também tenha mostrado promessa de diferenciação confiável dos membros do SIG (SASAKI et al. 2007; DEVRIESE et al. 2005).

S. pseudintermedius pode ser normalmente isolado em mucosas e pele de cães e gatos saudáveis, assim como em doença inflamatória de pele (ABRAHAM et al., 2008; GRIFFETH et al., 2008). Apesar de colonizar pele e mucosas de cães hígidos, é a principal causa de infecções em pele, como piodermite, otite externa, feridas infeccionadas e abscessos, mas também pode ser isolado em outros tecidos e cavidades (COX et al., 1984; MORRIS et al., 2006). Alguns estudos relatam bacteremia em seres humanos por *S. pseudintermedius* tendo como origem catéteres (CHUANG et al., 2010; VANDENESCH et al., 1995). Os animais portadores assintomáticos ou sintomáticos podem transmitir *S. pseudintermedius* para outros animais e seres humanos, facilitando a disseminação dos genes de resistência (WEDLEY et al., 2014), demonstrando que o *S. pseudintermedius* tem potencial zoonótico (WEESE et al., 2010; PERRETEN et al., 2010). Além da transmissão do próprio *S. pseudintermedius* do cão doente para o seu tutor (FRANK et al., 2009), também já foi comprovado que pode ter a transferência dos genes de resistência a antibióticos para outras espécies de *Staphylococcus* (WIELDERS et al., 2001).

Dentro do seu gênero *Staphylococcus*, é possível verificar uma relevante capacidade de adquirir resistência a antibióticos entre as diversas espécies deste gênero (WEESE, DUIJKEREN, 2010). *S. pseudintermedius* resistente a meticilina (MRSP) está sendo reportado com mais frequência, e esta resistência é mediada pelo gene *mecA*,

tornando a bactéria resistente a todos os β -lactâmicos (penicilinas, cefalosporinas, carbapenens) (GREENE et al., 2012). O gene *mecA* codifica a produção de uma proteína modificada ligada a penicilina (PBP). Normalmente, os antibióticos β -lactâmicos se ligam ao PBP do *S. pseudintermedius* para evitar o desenvolvimento da parede celular da bactéria. O PBP modificado do MRSP tem uma baixa afinidade pelos β -lactâmicos e consequentemente não há a inibição da formação da parede celular. O gene *mecA* está localizado no *Staphylococcal chromosomal cassette (SCCmec)* e pode ser transferido entre diferentes espécies de *Staphylococcus*. A resistência aos β -lactâmicos dificulta o tratamento de animais acometidos pelo MRSP, pois estes fármacos são de escolha para a terapêutica de infecções por *S. pseudintermedius* (WEESE et al., 2010; BECK et al., 2012; MILLER et al., 2013).

Além do *mecA*, MRSP também contém uma ampla variedade de genes resistentes a outras classes de antibióticos (WETTSTEIN et al., 2008). Um estudo com 103 isolados de países da Europa e América do Norte demonstrou uma resistência a 11 outros antibióticos, além dos β -lactâmicos. Estes fármacos incluem todos os utilizados por via oral na rotina clínica de tratamento de pequenos animais e os medicamentos que eles permanecem susceptíveis não são autorizados para uso em animais (PERRETEN et al., 2010). No Brasil, Botoni (2013) identificou que 35% das amostras isoladas de cães eram MRSP, além de observarem que 62% era resistente a tetraciclina e 77% a sulfametoxazol-trimetoprim.

Casos severos de zoonoses transmissíveis de *Staphylococcus pseudintermedius* susceptíveis a meticilina (MSSP) e resistente a meticilina (MRSP) entre cães e seres humanos estão sendo cada vez mais notificados por todo o mundo (KADLEC et al., 2016; WEESE et al., 2010; PERRETEN et al., 2010). Guardabassi et al (2004) estudaram proprietários de cães com piodermite e constataram que 46% dos proprietários apresentaram estirpes idênticas aos cães e foi observado uma resistência à 5 dos antibióticos testados. Outro estudo demonstrou uma prevalência de 4,1% de *S. pseudintermedius* em pessoas que vivem com cães e gatos, e profissionais veterinários uma prevalência alta de 42,5% (HANSELMAN et al., 2009).

Existem estudos de prevalência de MRSP que relatam uma variação nos achados entre 1,5 a 2% dos cães a domicílio e os que estiveram em hospitais (GRIFFETH et al., 2008; HANSELMAN et al., 2007; VENGUST et al., 2006), 0 a 7% em cães com doenças de pele (GRIFFETH et al., 2008; KANIA et al., 2004; MEDLEAU et al., 1986), e 30% em cães de clínica veterinária no Japão (SASAKI et al., 2007). No estudo de Nienhoff et

al (2011) mostra que hospitalização prévia e tratamento com antibióticos teve associação com colonização de MRSP em cães admitido em hospital de pequenos animais.

Um estudo realizado no Rio de Janeiro, Brasil com 151 isolados de otite externa demonstrou a presença de 60,3% de *Staphylococcus* spp., destes 38,4% foram de *S. pseudintermedius*, 15,4% de *S. schleiferi* e 14,3% de *S. aureus*, sendo que 3 isolados foram resistentes a todos os antibióticos testados (PENNA et al., 2010). Outro estudo no Brasil, em Belo Horizonte, também demonstrou uma prevalência alta de otite por *S. pseudintermedius*, com uma positividade de 59,6% (SCHERER et al., 2018). Quitoco et al (2013) reportaram a primeira vez no Brasil o clone USA1100 *S. aureus* meticilina resistente (CA-MRSA; Southwest Pacific clone) e o clone ST71 MRSP (clone da Europa) colonizando animais de companhia, demonstrando a disseminação da bactéria com potencial zoonótico. Um estudo dinamarquês conclui que isolados de MRSP são genotipicamente diversos indicando múltipla aquisições de *SCCmec* por acontecimentos genéticos distintos e evolução rápida de certos clones como o ST258 (DAMBOR et al., 2006).

O padrão ouro para o diagnóstico de MRSP é a detecção do gene *mecA* pela reação em cadeia pela polimerase (PCR). Até agora, a falta de marcadores fenotípicos únicos para *S. pseudintermedius* em comparação com os outros membros do SIG impediu sua identificação sem sequenciamento de DNA (BANNOEHR et al., 2008). É importante ressaltar que, devido à presença de marcadores fenotípicos comuns, o *S. pseudintermedius* é ocasionalmente identificado como *S. aureus* em laboratórios de diagnóstico clínico humano (POTTUMARTHY et al., 2004). O antibiótico mais comumente usados em testes laboratoriais para determinar se é um isolado resistente a meticilina é o uso da oxacilina como um substituto para meticilina nos seguintes formatos: microdiluição em caldo (MIC), difusão em disco e teste de oxacilina em ágar sal (CHAMBERS et al., 1997). Schissler et al (2009) sugerem que o disco de difusão com o antibiótico cefoxitina é inapropriado para testar a resistência por meticilina em cães com *S. pseudintermedius*. Um estudo com 30 isolados de MRSP com PCR para o gene *mecA* testou a sensibilidade da MIC para oxacilina resultando em 73,3% (22/30) com referências de pontos de corte do CLSI 2008 e 97% (29/30) com pontos de corte de 2004. Entretanto, o teste de difusão em disco para oxacilina, interpretada de 2008, apresentou sensibilidade de apenas 70% (21/30) (SCHISLER et al., 2009).

Outros mecanismos não *mecA* podem levar à resistência da oxacilina. Os genes da resistência compreendem os *mec* genes (*mecA* , *mecB* , *mecC* , e *mecD*) causando

resistência à oxacilina em membros dos gêneros *Staphylococcus* e *Micrococcus*; e a produção de outras PBPs alteradas (não mediadas pelo *mecA*) (BECKER et al., 2018; CANTÓN et al., 2012).

O CLSI e EUCAST são comitês internacionais que determinam o padrão de sensibilidade aos antimicrobianos para o uso clínico em seres humanos, tem como origem estudos dos Estados Unidos e Europa respectivamente. Atualmente utilizamos como referência estes dados de seres humanos para os isolados de animais no Brasil e no mundo.

Em 2016, iniciou o BrCAST, um comitê com o objetivo de representar o Brasil nas instituições que atuam ativamente na padronização de testes de sensibilidade aos antimicrobianos. Este apresentou documentos para o uso em laboratórios, com os princípios do EUCAST, mas que estão adicionando dados de pesquisas nacionais. Foi criado um subcomitê veterinário para avaliação dos pontos de corte e dados exclusivamente em isolados bacterianos de animais.

O quadro 1 representa os valores de referência dos testes de Disco Difusão e Concentração Inibitória Mínima do CLSI e BRCAST dos anos de 2018 e 2019. Este, mostra que não houve mudanças entre o ano de 2018 e 2019, porém existe diferença entre CLSI e BRCAST no valor de referência entre o ponto de corte da Disco difusão da oxacilina em 2019.

Quadro 1 - Valores de ponto de corte de CIM e DD do CLSI e BRCAST nos anos de 2018 e 2019.

Susceptibilidade	Ponto de corte da Oxacilina					
	Diâmetro do halo (mm)			Valor CIM (µg/ml)		
	CLSI 2018	CLSI 2019	BRCAST 2019	CLSI 2018	CLSI 2019	BRCAS T 2019
S	>18	>18	>20	≤0,25	≤0,25	NA
I	NA	NA	NA	NA	NA	NA
R	<17	<17	<20	≥0,5	≥0,5	NA

NA: não há dados

É possível observar no quadro 1, que o valor de referência da CIM de oxacilina do ano de 2019 pelo BrCAST está sem dados. Estes e outros são motivos de pesquisas epidemiológicas constantes para aumentar o banco de dados nacional.

O ECOFF (epidemiologic cutoff values) é um valor de ponto de corte epidemiológico que distingue entre organismos com e sem mecanismos de resistência expressadas fenotipicamente no teste de Concentração inibitória mínima (EUCAST, 2020). Para estabelecer o ponto de corte é preciso determinar uma distribuição dos resultados de CIM da população estuda. E através da planilha fornecida no site do EUCAST(https://www.eucast.org/fileadmin/src/media/PDFs/EUCAST_files/MIC_distributions/ECOFFinder_XL_2010_v2.1_web_version.xlsm) é possível determinar os pontos de corte de 95% até 99,9% das amostras.

Outro dado epidemiológico que pode ser avaliado é a análise de diversidade genética AFLP. Ela permite a detecção do polimorfismo genético em organismos de uma mesma população, a partir da amplificação seletiva por PCR dos fragmentos de DNA genômico, digeridos por enzimas de restrição. Esta técnica tem como objetivo demonstrar a heterogenicidade genética da população estudada.

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo principal

Determinar a susceptibilidade de *S. pseudintermedius* obtidos de cães e gatos à oxacilina através da determinação da concentração inibitória mínima (CIM).

3.2. Objetivos específicos

3.2.1 Determinar os pontos de corte epidemiológicos das CIMs da oxacilina e comparar com os resultados do CLSI e EUCAST

3.2.2 Avaliar a distribuição populacional das CIMs da oxacilina e comparar com os resultados do CLSI e EUCAST

3.2.3 Determinar o perfil de susceptibilidade de *S. pseudintermedius* a antimicrobianos pelo teste de disco difusão

3.2.4 Determinar a frequência da presença do gene *mecA*

3.2.5 Avaliar se tem heterogenicidade genética através de triagem molecular (AFLP)

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. Amostras

Os isolados de *S. pseudintermedius* foram amostrados por conveniência, sendo obtidos nos bancos de microrganismos do Laboratório de Análises Clínicas Veterinárias (LACVET) da Universidade Regional de Blumenau (FURB) e no Laboratório de Zoonoses Bacterianas do Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Animal da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo (USP). As amostras foram processadas no laboratório de Microbiologia Clínica da Universidade Regional de Blumenau e no Laboratório de Zoonoses Bacterianas do Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Animal da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo. As amostras foram isoladas no período de 2018 e 2019.

Todas as colônias foram submetidas a avaliação bioquímica para identificação de estafilococos, conforme descrito por QUINN et al. (2006) e BANNOEHR & GUARDABASSI (2012). Os exames bioquímicos analisaram a produção de catalase, oxidase, coagulase e urease, fermentação de carboidratos (manitol, sacarose e trealose), produção de arginina, Voges Proskauer (para produção de acetoína) e resposta a polimixina B.

4.2 Armazenamento das amostras

As amostras foram armazenadas em caldo BHI-Glicerol 15% (Plastilabor) e congeladas a -80°C. Após descongelamento, foram semeadas em caldo BHI (Laborclin) e incubadas por 12 horas a 35°C. Posteriormente, foram semeadas em ágar sangue de carneiro a 5% e incubadas por 24 horas a 35°C. Após crescimento, foram selecionadas duas colônias com morfologia semelhantes de coloração branca, tamanho médio, e identificadas pela coloração de Gram como cocos Gram positivos dispostos em conformação de "cachos de uva".

4.3 Extração de DNA

As amostras armazenadas a -80 °C foram transferidas para refrigerador com

temperatura de 2 e 4 °C por 12 h para posteriormente serem descongeladas a temperatura ambiente a 25 °C. Após, os isolados foram estriados em ágar Sangue de carneiro a 5% e incubados a 37 °C, por 24 h. Uma colônia foi coletada por alça flambada e inoculada em microtubos contendo 20 uL de água Mili-Q. Posteriormente este material foi submetido a uma temperatura de 100 °C durante 15 min para a liberação do DNA do meio. Após a fervura, os isolados foram centrifugados a 10.000 G por 5 min, para separação do sobrenadante, que foi coletado com pipeta.

4.4 Testes genotípicos

4.4.1 Identificação genotípica de *S. pseudintermedius*

A identificação foi feita através do método descrito por Sasaki et al (2010) que utiliza a identificação do gene *nuc*. Cada reação de amplificação é realizada com um volume final de 15 µL, utilizando o kit Go Taq Master Mix (2x) (Promega®). Os primers são os preconizados por Sasaki et al (2010), F2 TRGGCAGTAGGATTCGTTAA; R5 CTTTTGTGCTYCMTTTTGG, com o seguinte protocolo, desnaturação a 95 °C por 2 min; 35 ciclos de amplificação (desnaturação a 95 °C por 45 s, anelamento a 56 °C por 1 min e extensão a 72 °C por 1 min) e extensão final a 72 °C por 2 min. *S. pseudintermedius* MRSP 3279 foi utilizado como controle positivo, e solução de amplificação sem DNA como controle negativo. Os amplificadores resultantes foram analisados por meio de eletroforese horizontal em gel de agarose a 1,5% com adição de Sybr Safe DNA Gel Stein (Thermo Scientific®) e visualizados sob luz ultravioleta. A banda de tamanho molecular esperada é de 926 pb.

4.4.2 Identificação do gene *mecA* e *mecC*

A identificação do gene *mecA* foi feita pelo método descrito por Merothra et al. (2000). Utilizando os primers F ACTGCTATCCACCCTCAAC, R CTGGTGAAGTTGTAATCTGG. Cada reação de amplificação foi realizada com um volume final de 15 µL, utilizando o kit Go Taq Master Mix (2x) (Promega®), com o seguinte protocolo, desnaturação a 94 °C por 5 min; 35 ciclos de amplificação (desnaturação a 94 °C por 30 s, anelamento a 56 °C por 30 s e extensão a 72 °C por 30 s) e extensão final a 72 °C por 2 min. Os marcadores positivos foram *S. pseudintermedius* MRSP 3279 e como controle negativo uma solução de amplificação sem DNA.

Os amplificadores resultantes foram analisados por meio de eletroforese horizontal

em gel de agarose a 1,5% com adição de Sybr Safe DNA Gel Stein (Thermo Scientific®) e visualizados sob luz ultravioleta. A banda de tamanho molecular esperada é de 163 pb.

A identificação do gene *mecC* foi feita pelo do método descrito por Merothra et al. (2000). Utilizando os primers 1A 5'-CATTAAAATCAGAGCGAGGC-3' e 1B 5'-TGGCTGAACCCATTT TTTGAT-3'. Cada reação de amplificação será realizada com um volume final de 15 µL, utilizando o kit Go Taq Master Mix (2x) (Promega®), com o seguinte protocolo, desnaturação a 94 °C por 5 min; 35 ciclos de amplificação (desnaturação a 94 °C por 30 s, anelamento a 56 °C por 30 s e extensão a 72 °C por 30 s) e extensão final a 72 °C por 2 min. Os marcadores positivos serão *S. pseudintermedius* MRSP 3279 e *S.aureus* MRSA USA 100 e como controle negativo uma solução de amplificação sem DNA.

Os amplificadores resultantes foram analisados por meio de eletroforese horizontal em gel de agarose a 1,5% com adição de Sybr Safe DNA Gel Stein (Thermo Scientific®) e visualizados sob luz ultravioleta. A banda de peso molecular esperada é de 188 pb.

4.4.3 Teste de Diversidade Molecular - Técnica de Polimorfismo do Comprimento de Fragmentos Amplificados (AFLP)

Para garantir que os isolados utilizados no estudo não são pertencentes à um único complexo clonal, foi utilizada a técnica de Polimorfismo do Comprimento de Fragmentos Amplificados (AFLP). Para tanto, o AFLP será realizado segundo protocolo descrito por McLaughlin et al. (2000) utilizando a endonuclease *Hind* III (New England Biolabs). Resumidamente, o DNA bacterino (4 µL) foi clivado pela *Hind* III (24 U) por 12 h a 37 °C. Em seguida foi feita a etapa de ligação dos adaptadores, onde 5 uL do DNA clivado é adicionado aos adaptadores ADH1 e ADH2 (0,2 µg), a 1 U de T4 DNA Ligase (Promega®), mais tampão da enzima e incubado por 3 h a temperatura ambiente. Após a incubação a enzima é inativada por aquecimento a 80 °C por 10 min. Em seguida foi feita a PCR, utilizando 2 uL de DNA ligado mais o kit Go Taq Master Mix (2x) (Promega®) e primer (HI-X, 300ng). Para a reação será feito um passo de desnaturação de 94 °C por 4 min seguido de 35 ciclos de 1 min a 94 °C, 1 min a 60 °C, 2,5 min a 72 °C.

A detecção dos produtos de amplificação foi realizada em eletroforese horizontal em gel de agarose a 2%, corados Sybr Safe DNA Gel Stein (Thermo Scientific®), sob luz ultravioleta.

4.5 Teste de susceptibilidade antimicrobiana

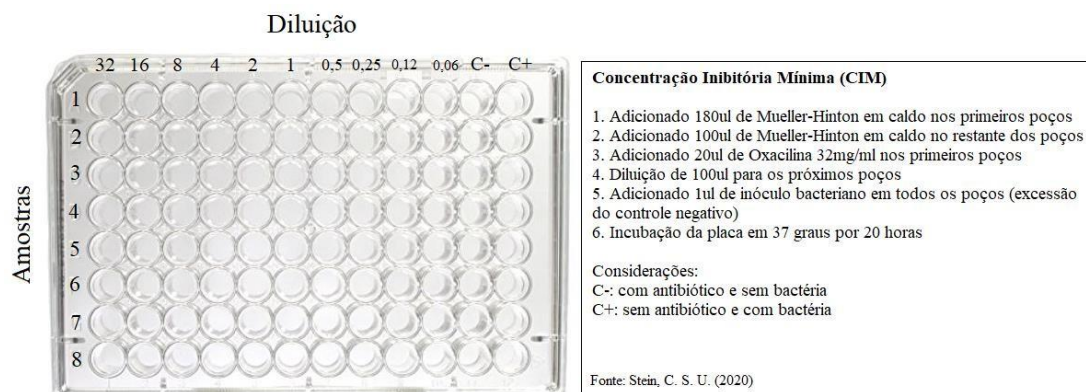
4.5.1 Técnica de difusão em disco

O antibiograma de todas as amostras foi feito por meio da técnica de difusão em disco e o método de concentração inibitória mínima (CIM). Os antibióticos que foram utilizados são: amicacina 30ug, cefovecin 30ug, linezolida 30ug, cefoxitina 30ug, clindamicina 2ug, enrofloxacina 5ug, estreptomicina 30ug, gentamicina 10ug, oxacilina 1ug, penicilina 10ug, tetraciclina 30ug e sulfametoxazol-trimetoprim 1,25/23,75ug, da marca DME, de acordo com as recomendações do EUCAST (2019) para testes de susceptibilidade de *Staphylococcus* spp. (Figura 1). O CLSI (2019) também foi utilizado para referência de pontos de corte para alguns discos que não foram apresentados no EUCAST.

4.5.2 Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM)

A técnica da microdiluição em caldo foi realizada com o objetivo de definir a Concentração Inibitória Mínima (CIM) à oxacilina. A metodologia utilizada neste teste é baseada no EUCAST (2019) e demonstrada na figura 1. Para a realização da técnica foram utilizadas placas com poços estéreis de fundo redondo contendo caldo Mueller Hinton com concentração de cátions ajustada. Sobre cada poço, foram adicionado 20ug de antibiótico a ser testado, em diluição serial, posteriormente, o inóculo do isolado bacteriano testado (também preparada na concentração de 10^8 UFC/ml). A placa é incubada a 35 °C por 20h. A CIM à oxacilina é baseada na menor concentração do antimicrobiano necessária para a completa inibição do crescimento do inóculo, analisada a olho nu com adição de Cloreto de 2,3,5-Trifenil Tetrazólio. Como controle foi utilizada cepa ATCC 29213 de *Staphylococcus aureus*, com CIM para oxacilina de 0,12 a 0,5 µg/mL.

Figura 1 – Metodologia da Concentração Inibitória Mínima (CIM) utilizada no estudo. São Paulo, 2020.



4.5.3 Análise estatística

Todas as análises estatísticas foram feitas pelo software R Core Team (2019). O valor de alfa estabelecido para considerar o resultado significativo foi de 0.05 ($\alpha = 5\%$ ou valor de $p < 0.05$).

Foram realizadas comparações para teste de disco difusão da oxacilina (OXI), teste de disco difusão da cefoxitina (CFO), concentração inibitória mínima de oxacilina (CIM) e o PCR para identificação do gene *mecA*. A comparação entre essas formas de detecção da resistência foram testadas através do teste de qui-quadrado (χ^2).

A determinação do ponto de corte epidemiológico (ECOFF) para a concentração inibitória mínima (CIM) do antibiótico oxacilina para a bactéria *S. pseudintermedius* será realizada através da calculadora ECOFFfinder versão 2.03. Os valores de ECOFF foram calculados a partir das estimativas do log₂ da média e do desvio padrão gerado por ajuste de curva de regressão não linear de conjuntos de dados cumulativos agrupados.

A concordância entre as formas de avaliação de resistência a β -lactâmicos pode ser avaliada através do teste κ que é uma metodologia estatística geral para a análise de dados categóricos multivariados decorrentes de estudos de confiabilidade entre observadores (ou entre diferentes métodos de classificação), isto é, a "intensidade" de concordância entre os observadores (ou entre os diferentes métodos de classificação). O teste Kappa de Cohen (κ_C) mede a concordância entre apenas dois avaliadores (ou métodos de classificação/diagnóstico). Para uma avaliação semelhante de concordância utiliza-se o teste Kappa de Fleiss (κ_F) quando houver mais de dois avaliadores (ou métodos de classificação/diagnóstico). A figura 2 mostra como pode ser feita a interpretação do κ_C ou κ_F , lembrando que para avaliar a significância dos κ 's deve-se

verificar o valor de p.

<u>Kappa Statistic</u>	<u>Strength of Agreement</u>
<0.00	Poor
0.00–0.20	Slight
0.21–0.40	Fair
0.41–0.60	Moderate
0.61–0.80	Substantial
0.81–1.00	Almost Perfect

Figura 2: Interpretação do valor estatístico de κ , retirado de Landis et al. (1977).

4.5.4 ECOFF da CIM

ECOFF, corresponde ao ponto de corte epidemiológico que separa microrganismos sem resistência adquirida (tipo selvagem) e com resistência adquirida (tipo não selvagem) da bactéria ou fungo em questão.

O cálculo do ECOFF realizado nesse estudo demonstra os valores de corte epidemiológico da oxacilina separando as bactérias *S. pseudintermedius* sem mecanismos de resistência (tipo selvagem) das *S. pseudintermedius* com mecanismos de resistência adquiridos (tipo não selvagem). As quatro colunas da esquerda representam os dados de distribuição de MIC agrupados. As colunas "Fitted values" e "Fitted%" mostram a frequência e a porcentagem de isolados em cada MIC na distribuição estimada de tipo selvagem. A área central, na parte superior, mostra o subconjunto dos dados brutos que deram o melhor ajuste e os parâmetros estatísticos que definiram a distribuição log-normal com o melhor ajuste. Abaixo, há o intervalo de ECOFFs que podem ser escolhidos de acordo com a porcentagem do tipo selvagem que o usuário deseja incluir, incluindo o ECOFF "exato" (Concentração exata estimada ($\mu\text{g/ml}$), o ECOFF arredondado para a próxima diluição dupla (Concentração "diluição dupla" ($\mu\text{g/ml}$)) e a porcentagem de isolados nos dados brutos observados que estavam acima do ECOFF arredondado. O gráfico exibe os dados brutos no formato de barras e curva vermelha e a população estimada de tipo selvagem mais adequada na curva em verde. A parte "Parked data" no centro inferior é usada quando existe uma moda alta da população do tipo não selvagem que é maior que a moda na população do tipo selvagem. Os botões "Clear Data", "Clear

Bug” e “Clear Drug” são controles que ativam macros para limpar a planilha de alguns ou todos os elementos de entrada de dados para reutilização do ECOFFinder.

4.5.5 Abordagem diagnóstica da Disco difusão

Os valores da Disco difusão foram calculados utilizando pontos de corte do CLSI (2019) e BrCAST (2019) determinando o melhor desempenho nos testes. Foram calculados valores de: sensibilidade, especificidade, acurácia, valor preditivo positivo e negativo. A presença do gene *mecA* foi considerado como teste ouro para efeitos de comparação com teste de Disco difusão e CIM.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

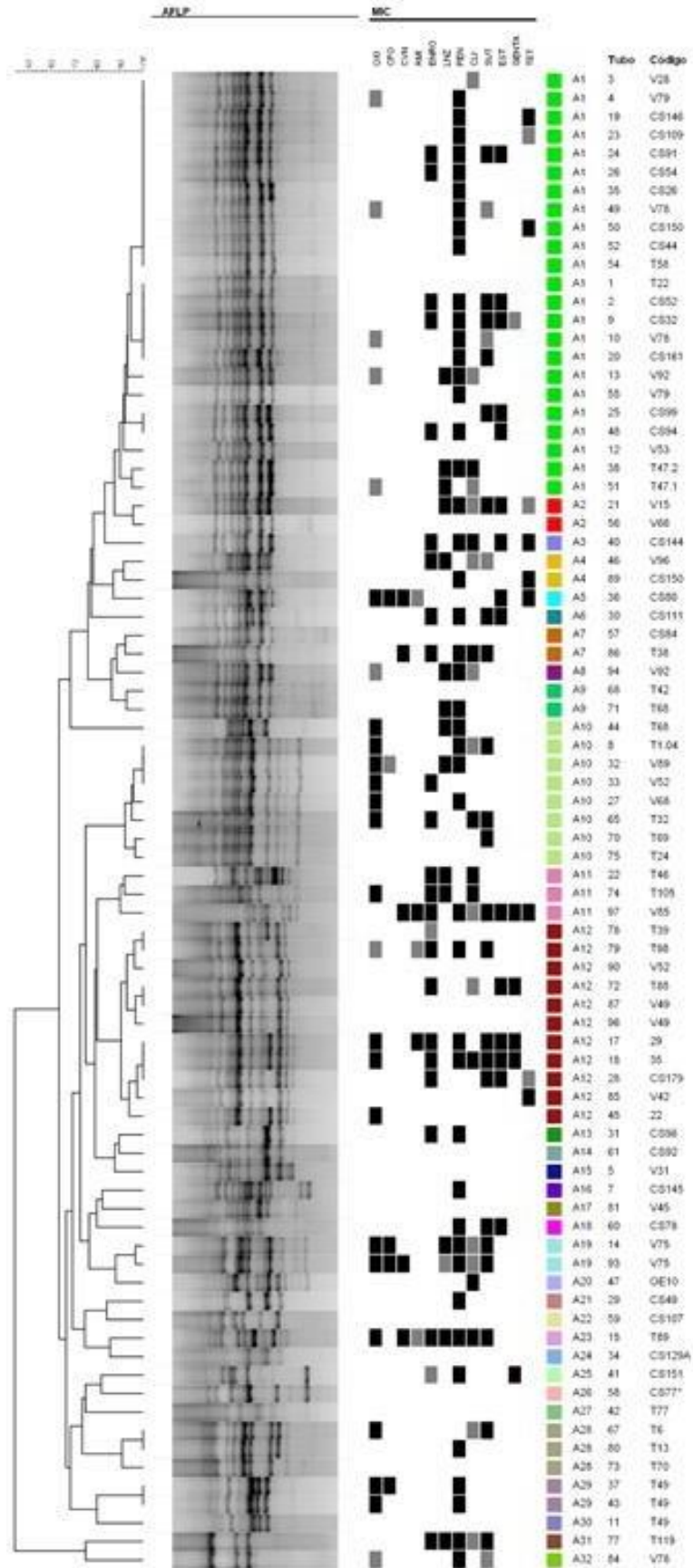
5.1 IDENTIFICAÇÃO GENOTÍPICA DE *S.pseudintermedius*

Das 326 amostras identificadas bioquimicamente como *Staphylococcus* spp. pertencentes ao grupo SIG, 211 tiveram identificação confirmada pela técnica de PCR para *S. pseudintermedius*, ou seja, 64,72% das amostras tiveram espécie confirmada. As demais espécies que não foram confirmadas foram excluídas do estudo.

5.2 AFLP Polimorfismo de Comprimento de Fragmentos Amplificados

A figura 3 demonstra o resultado da AFLP das amostras estudadas, evidenciando uma população heterogênia.

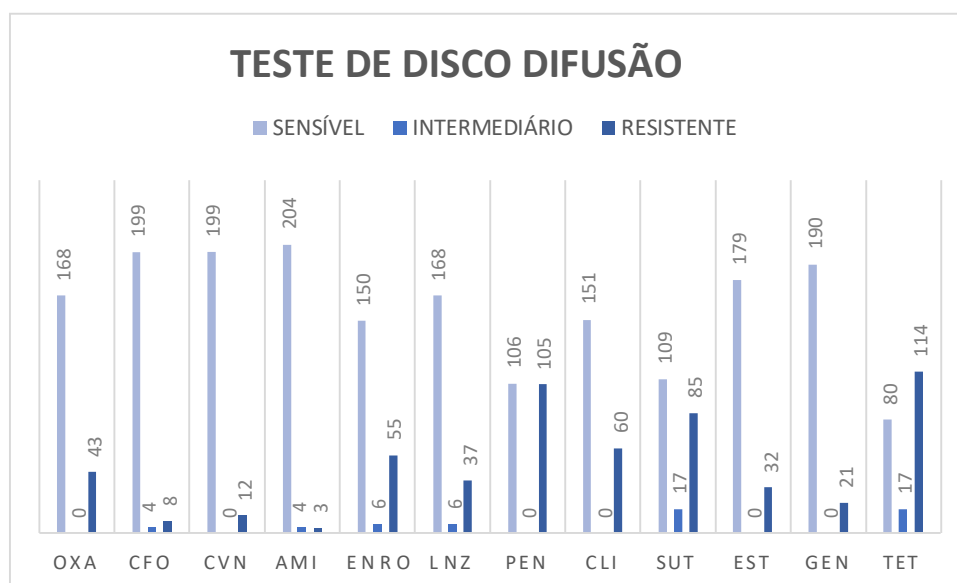
Figura 3. Resultado da AFLP de *S.pseudintermedius* de cães. São Paulo, 2020.



5.3 TESTE DE DISCO DIFUSÃO

Perfil de resistência ou resistência intermediária a pelo menos um dos antibióticos testados foi encontrado em 99,52%(210/211) das estirpes, sendo mais frequente a resistência a tetraciclina em 54,02%(114/211), penicilina em 49,76 %(105/211), sulfametoxazol-trimetoprim em 40,28% (85/211), enrofloxacina em 26,06%(55/211), e oxacilina em 22,37% (43/211). Com uma menor frequência foi definido resistência à linezolida em 17,53% (37/211) das estirpes, estreptomicina em 15,16% (32/211), clindamicina em 14,21%(30/211), gentamicina em 9,95% (21/211), cefovecin em 5,68% (12/211), cefoxitina em 3,79% (8/211), amicacina em 1,42% (3/211), dados demonstrados no gráfico 1.

Gráfico 1 – Resultado do teste de Disco Difusão de 211 amostras de *S. pseudintermedius* utilizadas no estudo. São Paulo, 2020.



Oxa: oxacilina; CFO: cefoxitina; CVN: cefovecin; AMI: amicacina; ENRO: enrofloxacina; LZN: linezolida; PEN: penicilina; CLI: clindamicina; SUT: sulfametoxazol-trimetoprim; EST: estreptomicina; GEN: gentamicina; TET: tetraciclina.

Neste estudo, 99,52% das estirpes testadas apresentaram resistência ou resistência intermediária a pelo menos um dos antibióticos, e 45% (95/211) são consideradas multiresistentes com pelo menos resistência a 3 classes de antibióticos (MAGIORAKOS et al 2012). Foram separados 76 perfis correspondentes ao resultado da disco difusão de 95 amostras multiresistentes demonstrados na figura 4. As amostras que apresentaram resultados divergentes podem ser visualizados no anexo 1.

Figura 4. Heatmap com o resultado da disco difusão de 95 amostras multiresistentes. Interpretação: S – Sensível I – intermediário; R – Resistente.



OXI: oxacilina; CFO: cefoxitina; CVN: cefovecin; AMI: ampicilina; ENRO: enrofloxacin; LZN: linezolida; PEN: penicilina; CLI: clindamicina; SUT: sulfametoxazol-trimetoprim; EST: estreptomicina; GEN: gentamicina; TET: tetraciclina.

Um estudo que examinou 103 isolados da América do Norte e de diferentes países europeus descobriu que, além da resistência aos antibióticos β -lactâmicos, cerca de 90% eram resistentes à ciprofloxacina, clindamicina, eritromicina, canamicina, estreptomicina e trimetoprim; resistência à gentamicina e tetraciclina foi observada em 70% e ao cloranfenicol em 57% (PERRETEN et al 2010). Dados que também demonstraram uma alta resistência à tetraciclina, que no presente estudo foi de 54,02%, sendo o maior percentual de resistência entre os antibióticos testados. No estudo de Botoni et al (2016) relatou mais percentual de resistência que variou de 7% (4/62, ampicilina) a 77% (48/62,

sulfamethoxazol + trimetoprim), com 34% (21/62) das amostras sendo resistente a oxacilina, com 25 amostras positivas para o gene *mecA*.

Alguns estudos revelam altos níveis de resistência às tetraciclinas no MSSP e no MRSP (PERRETEN et al 2010; GANIERE et al 2005; FRANK et al 2009). A resistência às tetraciclinas é mediada pelos genes *tet* (K) e *tet* (M), com o *tet* (K) conferindo resistência à tetraciclina. Frank et al (2009) relatam que foi encontrado uma resistência de 90% a trimetoprim, o que diverge do atual (40,28%). O estudo de Botoni et al. (2016) relatou 77% de resistência à sulfametoxazol-trimetoprim.

Uma coleção de 72 isolados de *S. pseudintermedius* de diferentes regiões da Alemanha apresentou taxas de resistência ainda mais altas, pois 97,8% eram resistentes a fluoroquinolonas, aminoglicosídeos e macrólidos (RUSCHER et al 2009). Stefanetti et al (2017) relata 76% de amostras resistentes à enrofloxacina; e Botoni (2013) 38%. Dados que superam os resultados do presente estudo, com 26,06% de resistência à enrofloxacina. A resistência às fluoroquinolonas, entre as cepas de MRSP é bastante alta e, portanto, tem pouco valor como modalidade terapêutica segundo Perreten et al (2010). Entretanto, não foi encontrado percentual tão alto neste estudo.

Em relação a resistência à penicilina (49,76%) e oxacilina em (22,37%), o estudo de Stefanetti et al (2017) demonstra valor superior, de 90% e 59% respectivamente, ao encontrado no nosso estudo. Botoni et al (2016) também, encontraram com resistências de 77% e 34% respectivamente.

Os três antibióticos com menor percentual de resistência foram: amicacina (1,42%), cefoxitina (3,79%) e cefovecin (5,68%). Resultado divergente se considerado resistência de 86% à amicacina e 39% ao cefovecin encontrado no estudo de Stefanetti et al (2017). Já Botoni (2013) relatou valor superior ao nosso estudos com 7% de amostras resistente à amicacina.

Clindamicina também teve baixa resistência (14,21%). O aumento da prevalência de “resistência à metilina” e resistência a múltiplas drogas em *S.pseudintermedius* resultou em maior uso de clindamicina no tratamento da pioderma canina devido à sua eficácia clínica percebida e boa distribuição na pele (FRANK et al 2012; GUARDABASSI et al).

Outros antibióticos que tiveram um baixo percentual de resistência como a linezolida (17,53%) e estreptomicina (15,16%), o seu uso efetivamente é baixo no tratamento de infecções estafilocócicas resistentes à oxacilina em cães e gatos (MURPHY

et al 2008), não há relatos publicados sobre o uso efetivo em animais em um ambiente clínico. O uso desses antimicrobianos em animais, segundo Weese et al (2008), deve ser fortemente desencorajado à luz de seu lugar no tratamento de infecções sérias e potencialmente fatais por MRSA em pessoas. No estudo de Botoni (2013), foi encontrado 40% de resistência à Estreptomicina, superior do que foi relatado em nosso estudo.

Ao comparar estudos acima citados, de outros países, é possível observar um maior percentual de resistência microbiana. Entretanto, quando visto o estudo de Botoni (2013) que foi realizado no Brasil, pode-se observar menor resistência comparado a outros países, o que ocorre com os nossos resultados também.

5.4 DIFERENÇAS ENTRE OS COMITÊS DO CLSI E BRCAST

É importante considerar a variação na interpretação dos resultados do teste de Disco Difusão e CIM, pois podem ser diferentes entre os autores dos estudos se estes consideram os valores de pontos de corte do CLSI ou do EUCAST. O Instituto de Padrões Clínicos e Laboratoriais (CLSI) é uma organização de desenvolvimento de padrões orientada por voluntários, apoiada por membros e sem fins lucrativos. O CLSI promove o desenvolvimento e o uso de padrões e diretrizes voluntários de consenso laboratorial na comunidade de saúde. A diferença entre os comitês está baseada em estudos científicos, muitas vezes epidemiológicos de determinada população em estudo, visto que o CLSI foi criado nos Estados Unidos e o EUCAST na Europa. Por fim, o BrCAST é o comitê criado para padronizar os dados no Brasil. Contudo, essa diferença entre os comitês pode alterar a interpretação dos resultados dos testes de Disco Difusão e CIM pelos laboratórios influenciando no tratamento médico, visto que, cada um utiliza um comitê de referência de acordo com a sua escolha (CLSI ou EUCAST). Atualmente, no Brasil recomenda-se o uso do BrCAST para padronizar a interpretação destes testes laboratoriais. No entanto, não há dados suficientes ainda sobre o *S. pseudintermedius*, portanto o presente estudo visa comparar os dados epidemiológicos da população estudada com os dados dos comitês.

A tabela 1 apresenta a quantidade absoluta (número) e relativa (%) de amostras que tiveram divergência ou a mesma interpretação segundo os pontos de corte do CLSI (2019) e BrCAST (2019). As amostras que tiveram interpretações diferentes serão demonstrados no anexo 2.

Tabela 1. Quantitativo da diferença entre a interpretação dos resultados da disco difusão com referências de pontos de corte do CLSI(2019) e BRCAST(2019).

Antibióticos	Divergente	Igual
OXI	5 (2.4%)	206 (97.6%)
AMI	5 (2.4%)	206 (97.6%)
PEN	9 (4.3%)	202 (95.7%)
SUT	8 (3.8%)	203 (96.2%)
GENTA	5 (2.4%)	206 (97.6%)
TET	15 (7.1%)	196 (92.9%)

No anexo 2, quando interpretado o resultado do disco de oxacilina, 5 amostras foram resistentes considerando a referência do BRCAST (2019), o que difere do CLSI. Em relação à amicacina, 5 amostras foram diferentes, levando em conta que a maioria foi considerada sensível ou intermediário com referência do CLSI, e intermediário ou resistente pelo BrCAST. Já os resultados da penicilina com interpretação do CLSI, 9 amostras são resistentes, divergente do BrCAST, que são consideradas sensíveis. No caso do sulfametoxazol-trimetoprim, 8 amostras são consideradas intermediário pelo CLSI e consideradas sensíveis pelo BrCAST. Na gentamicina 2 amostras foram sensíveis pelo CLSI e resistente pelo BrCAST, e uma amostra resistente pelo CLSI e sensível pelo BrCAST. Por último, na tetraciclina, 12 amostras foram consideradas sensíveis pelo CLSI e resistentes pelo BrCAST. Os discos de linezolida, clindamicina, enrofloxacina, estreptomicina, cefoxitina e cefovecin não apresentaram valores de referência pelo BrCAST para comparação dos resultados.

Quando comparado as interpretações do CLSI e BrCAST de 2019, no presente estudo é possível observar valores mais conservativos pelo BrCAST, tendendo mais amostras resistentes para os disco de oxacilina, amicacina, tetraciclina e gentamicina. Ou seja, não seriam considerados como opção terapêutica médica por serem resistentes. Já o CLSI, apresentou valores mais conservativos para os discos de penicilina e sulfametoxazol-trimetoprim, com amostras mais resistentes comparado ao BrCAST. Este último, seria compatível com a exclusão de dois antibióticos que apresentam maiores porcentagens de resistência e não são indicados para infecções estafilocócicas.

Quadro 2 – Diferença entre os pontos de corte do CLSI(2019) e BrCAST(2019) considerados no estudo.

ANTIBIÓTICO	CLSI 2019			BRCAST 2019		
	S	I	R	S	I	R
Gentamicina	13-14	NA	>15	18	NA	<18
Amicacina	<14	15-16	>17	18	16-17	<16
Linezolida	NA	NA	>21	21	NA	<21
Cloranfenicol	13-17	NA	>18	18	NA	<18
Enrofloxacina	<16	17-22	>23	NA	NA	NA
Estreptomicina	NA	NA	>14	NA	NA	NA
Cefoxitina	<24	NA	>25	NA	NA	NA
Oxacilina	<17	NA	>18	>20	NA	<20
Penicilina	<28	NA	>29	26	NA	<26
Tetraciclina	<17	18-22	>23	22	19-21	<19
Sulfametoxazol-trimetoprim	<15	NA	>16	17	14-16	<17
Cefovecin	<20	21-23	>24	NA	NA	NA

NA: não há dados.

A tabela 2 apresenta valores de mínimo (Min), primeiro quartil (1o Q), mediana (Md), média (μ), terceiro quartil (3o Q) e máximo (Max) dos tamanhos no teste de disco difusão para Oxacilina (OXI), Cefoxitina (CFO), Cefovecin (CVN), Amicacina (AMI), Enrofloxacina (ENR), Linezolida (LNZ), Penicilina (PEN), Clindamicina (CLI), Trimetoprim-sulfametoxazol (SUT), Estreptomicina (EST), Gentamicina (GENTA) e Tetraciclina (TET).

Tabela 2: Distribuição do tamanho obtido nos testes de disco difusão de 12 antibióticos para as 211 amostras. São Paulo, 2020.

Variável	Min	1° Q	Md	μ	3° Q	Max
<i>OXI</i> (mm)	0.0	20.0	25.0	24.3	30.0	46.0
<i>CFO</i> (mm)	0.0	35.0	40.0	38.6	45.0	51.0
<i>CNV</i> (mm)	0.0	36.0	40.0	38.1	44.0	58.0
<i>AMI</i> (mm)	12.0	22.0	26.0	26.5	30.0	41.0
<i>ENR</i> (mm)	0.0	12.5	27.0	22.5	31.0	44.0
<i>LNZ</i> (mm)	0.0	30.0	34.0	32.2	40.0	52.0
<i>PEN</i> (mm)	0.0	19.0	26.0	30.1	45.0	60.0
<i>CLI</i> (mm)	0.0	18.0	25.0	24.6	32.0	49.0
<i>SUT</i> (mm)	0.0	10.0	22.0	19.0	30.0	43.0
<i>EST</i> (mm)	0.0	19.0	23.0	22.5	29.0	39.0
<i>GENTA</i> (mm)	0.0	22.0	28.0	27.0	33.0	52.0
<i>TET</i> (mm)	0.0	15.0	18.0	23.1	34.0	50.0

A tabela 3 apresenta os resultados do teste de Disco difusão usando como referências os pontos de corte do Clinical and Laboratory Standards Institute do ano de 2019 (CLSI–2019) e a versão brasileira do European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing do ano de 2019 (BrCAST–2019). Em vermelho estão destacados os antibióticos que tiveram mais amostras resistentes do que sensíveis.

Tabela 3: Quantidade de amostras segundo o teste de disco difusão. São Paulo, 2020.

Antibiótico	CLSI-2019			BrCAST-2019		
	S*	I**	R***	S	I	R
<i>OXI</i>	173 (82.0%)	–	38 (18.0%)	168 (79.6%)	–	43 (20.4%)
<i>CFO</i>	199 (94.3%)	4 (1.9%)	8 (3.8%)	–	–	–
<i>CNV</i>	199 (94.3%)	–	12 (5.7%)	–	–	–
<i>AMI</i>	207 (98.1%)	3 (1.4%)	1 (0.5%)	204 (96.7%)	4 (1.9%)	3 (1.4%)
<i>ENR</i>	150 (71.1%)	6 (2.8%)	55 (26.1%)	–	–	–
<i>LNZ</i>	168 (79.6%)	6 (2.8%)	37 (17.5%)	–	–	–
<i>PEN</i>	97 (46.0%)	–	114 (54.0%)	106 (50.2%)	–	105 (49.8%)
<i>CLI</i>	151 (71.6%)	30 (14.2%)	30 (14.2%)	–	–	–
<i>SUT</i>	102 (48.3%)	25 (11.8%)	84 (39.8%)	109 (51.7%)	17 (8.1%)	85 (40.3%)
<i>EST</i>	179 (84.8%)	–	32 (15.2%)	–	–	–
<i>GENTA</i>	193 (91.5%)	–	18 (8.5%)	190 (90.0%)	–	21 (10.0%)
<i>TET</i>	80 (37.9%)	29 (13.7%)	102 (48.3%)	80 (37.9%)	17 (8.1%)	114 (54.0%)

Notas: *S: sensível; **I: intermediário; ***R: resistente.

5.5 TESTE DE CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA (CIM)

Das 211 amostras analisadas, 72,51% (153/211) foram sensíveis à oxacilina considerando ponto de corte igual ou inferior a 0,25ug/ml. O restante, 27,48% (58/211) foi considerado resistente com valor igual ou superior a 0,5ug/ml, portanto recebendo o nome de *S. pseudintermedius* resistente à oxacilina.

O termo resistência à metilina ou atualmente usado à oxacilina, é mediada pela presença do gene *mecA*, que confere resistência a todos os antibióticos β -lactâmicos, incluindo cefalosporinas e amoxicilina-clavulanato, independentemente dos resultados *in vitro* (JONES et al 2007). Estudos como o de Humphries et al (2016) demonstra 33% estirpes resistentes à metilina, semelhante a esse estudo. Entretanto, Gold et al (2014) relata apenas 7%.

Os valores da concentração inibitória mínima para oxacilina (CIM) são apresentados na tabela 4. A última concentração testada foi de 0,06 ug/ml, portanto as amostras consideradas positivas neste poço podem ser igual ou inferior a esta concentração por não terem sido testadas concentrações menores.

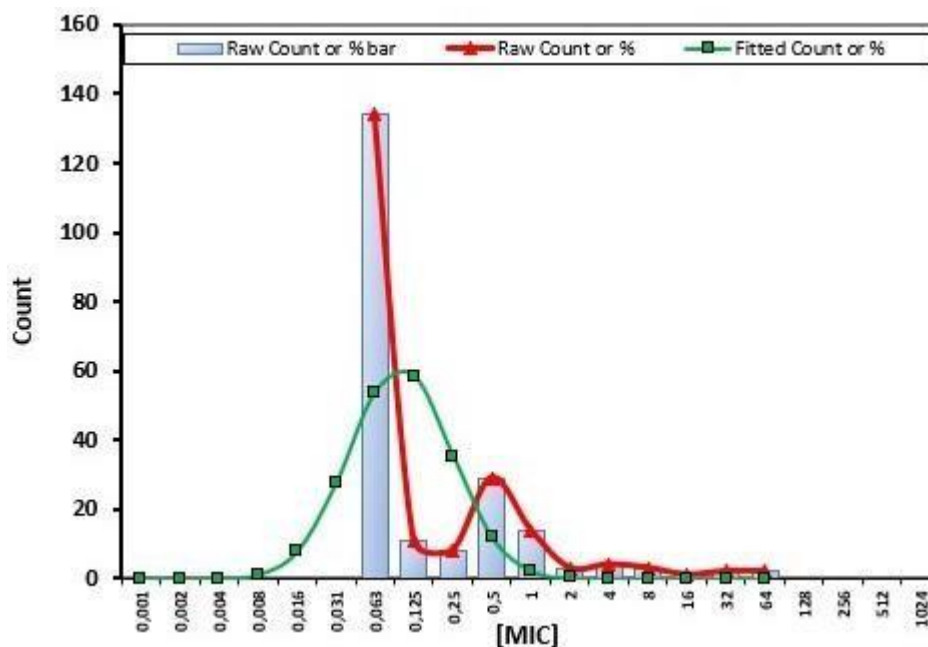
Tabela 4 - Concentração inibitória mínima para oxacilina das 211 amostras utilizadas no estudo. São Paulo, 2020.

MIC ($\mu\text{g/ml}$)	
<0,06	134 (63.5%)
0,12	11 (5.2%)
0,25	8 (3.8%)
0,5	29 (13.7%)
1	14 (6.6%)
2	3 (1.4%)
4	4 (1.9%)
8	3 (1.4%)
16	1 (0.5%)
32	2 (0.9%)
>32	2 (0.9%)

5.6 ECOFF DA CIM DE OXACILINA

O cálculo do ECOFF realizado nesse estudo demonstra os valores de corte epidemiológico da oxacilina separando as bactérias *S. pseudintermedius* sem mecanismos de resistência (tipo selvagem) das *S. pseudintermedius* com mecanismos de resistência adquiridos (tipo não selvagem), isto é, os ECOFFs calculados apresentam os valores de CIM que melhor descrevem onde termina a distribuição do tipo selvagem e na tabela 5 verifica-se 5 pontos de corte calculados. O gráfico 2 exibe os dados brutos no formato de barras e curva vermelha, e a população estimada de tipo selvagem mais adequada na curva em verde.

Gráfico 2 – Resultados do ECOFFinder para a distribuição CIM de oxacilina de *S. pseudintermedius* do estudo.



Curva vermelha = dados brutos; Curva verde = população estimada de tipo selvagem mais adequada

Tabela 5: Resultado de ECOFF da Oxacilina para *S. pseudintermedius*. São Paulo, 2020

ECOFF	Concentração exata estimada ($\mu\text{g/ml}$)	Concentração "diluição dupla" ($\mu\text{g/ml}$)
95.0%	0.2950	0.5
97.5%	0.3898	0.5
99.0%	0.5387	1
99.5%	0.6716	1
99.9%	1.0581	2

Edelstein (2017) explica que uma bactéria com uma droga CIM que é maior que o ECV (valor de corte epidemiológico) provavelmente terá uma forma adquirida de resistência, enquanto uma bactéria com uma droga CIM menor ou igual ao ECV é provavelmente da distribuição de tipo selvagem da bactéria para uma droga específica. O ECV não é o mesmo que um ponto de interrupção de suscetibilidade e é difícil aplicar decisões clínicas relacionadas à antibioticoterapia. Alguns organismos podem ter resistência intrínseca a um medicamento em particular, com o ECV desse medicamento sendo relativamente alto em termos das concentrações possíveis de medicamentos. Nesse caso, mesmo que uma CIM possa ser menor que o ECV, as taxas de falha do tratamento clínico provavelmente seriam altas.

O mesmo autor cita que os ECVs são listados ao invés de pontos de interrupção para algumas combinações de bactérias / medicamentos devido aos dados limitados sobre a correlação entre a CIM e as respostas clínicas, a falta de dados robustos *in vivo* e *in vitro* e a falta de informações sobre a farmacodinâmica dos medicamentos e as relações de resultados. Isso pode significar que apenas as distribuições de CIM são conhecidas, mas não bons dados sobre farmacocinética e farmacodinâmica de medicamentos, e a correlação entre CIM de medicamentos e resultados clínicos.

Na tabela 5 é possível ver que a população é quase do tipo selvagem, com 95% da população sendo do tipo selvagem. O ECV de 0,5mg/L desta população, está no mesmo valor do ponto de interrupção do CLSI (2019).

5.7 RELAÇÃO ENTRE RESULTADOS DO TESTE DE DISCO DIFUSÃO E CIM

O quadro 3 demonstra os dados obtidos das CIM's em relação ao teste de Disco difusão, com os pontos de corte do BrCAST. Do total de amostras, 76,3% (161/211) dos valores obtidos apresentaram resultados compatíveis (sensíveis pelos dois métodos e resistentes pelos dois métodos).

Destes, 64,45%(136/211) são consideradas amostras sensíveis à oxacilina de acordo com os pontos de corte de halo igual ou superior a 20mm no teste de Disco difusão, e nas diluições da CIM iguais ou inferiores a 0,25ug/ml. Entretanto, somente 11,84% (25/211) são consideradas resistentes à oxacilina por ambos os testes, com valor de referência de CIM igual ou maior que 0,5 ug/ml e valores a baixo de 20mm de halo no teste de Disco difusão.

Quadro 3 – Diagrama de dispersão de diâmetro de halo da Disco Difusão e CIM de 211 isolados de *S. pseudintermedius* avaliados pelos pontos de interrupção do BrCAST 2019 (linhas pretas).

Oxacilina		Halos (mm)																												
		0	10	12	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	38	39	40	46
MIC (µg/ml)	<0,06	2		2		3		2	3		6		3	6	8	26	8	4	5	5	19	2	5	4	4	12		1	4	1
	0,12					2					1				1	1		2			1						1	1		
	0,25			1		2							1	1			1		1										1	
	0,5		2		1	5	3	1			6		2	2		4	1	1												1
	1		3		1	1				1	1	1		2		1						1	1	1						
	2		1									1																1		
	4					2					1			1																
	8		1	1									1																	
	16														1															
	32															1														
>32		1										1													1					

Quadrados verdes: resultados sensíveis pelos dois métodos; Quadrados vermelhos: resultados resistentes pelos dois métodos; utilizando os valores de referência do CLSI (2019)

Quando analisamos os dados da CIM e do teste de DD, pode-se observar que 64,4% (136/211) das amostras são sensíveis à oxacilina e 11,8% (25/211) são resistentes. Entretanto, 50 amostras não estão em concordância alguma entre os testes. Dessas, 33 amostras são consideradas sensíveis pela DD, porém resistentes para a CIM. E 17 são sensíveis pela CIM e resistentes pela DD. Não há dados científicos que comprovem ou

relatem a divergência entre estes testes para sensibilidade à oxacilina em *S.pseudintermedius*. Entretanto, levando em consideração algumas divergências nos testes, foi repetido a CIM de 36 amostras pelo método de ETEST, para confirmação dos resultados. Estas amostras retestadas foram escolhidas de acordo com os valores discordantes da relação das CIM's com a presença do *mecA*. Foram encontrados 14 resultados diferentes e 22 iguais. É importante levar em consideração que todas as amostras foram testadas com duplicatas para DD e CIM.

Analisando um estudo com outro antibiótico, Kizerwetter et al (2016) apresentou 13,1% (5/38) das amostras discordantes também, porém justificou que estas foram consideradas intermediária no teste de disco difusão para pradofloxacina, o que não houve no presente estudo pela ausência de intermediários à oxacilina. Smith et al (2018) relata que a CIM observada pode depender do número de bactérias inicialmente inoculadas no ensaio. Este fenômeno é denominado efeito inóculo (IE) e é frequentemente mais pronunciado para β -lactamases em estirpes que expressam enzimas β -lactamase. Esta possibilidade é descartada pela padronização do inóculo feita na CIM e DD. Huse et al (2018) revela que os dados discrepantes foram repetidos pelos testes de PCR e de Disco difusão, e aqueles que permaneceram divergentes foram excluídos do estudo. Porém, o autor não relata a quantidade de amostras que foram divergentes. No presente estudo não foram excluídas estas amostras para não influenciar nos resultados e sim demonstradas para que outros estudos sejam incentivados a fim de elucidar resultados falso positivos e falso negativos destes métodos.

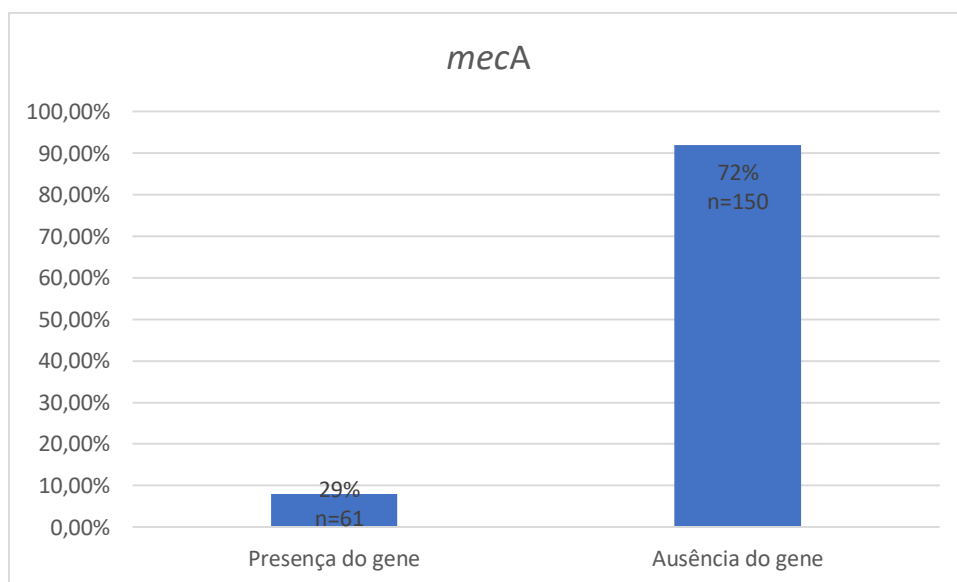
Mimica et al (2007) cita que apesar da CIM possibilitar uma avaliação quantitativa da resistência à oxacilina e de serem métodos muitas vezes considerados padrão, os mesmos parecem não ter acurácia significativamente maior (para a presença do gene *mecA*) do que os testes fenotípicos qualitativos. No entanto, devido à existência de outros mecanismos de resistência, esses métodos podem e devem ser utilizados como confirmatórios e/ou adjuvantes em isolados nos quais o padrão. Este mesmo autor relata diversos estudos com valores variáveis de sensibilidade e especificidade da oxacilina na Disco difusão.

5.8 IDENTIFICAÇÃO DE GENE *MECA* DE RESISTÊNCIA À OXACILINA

No gráfico 3 é demonstrados os valores do teste de PCR para identificação do gene *mecA*, onde 28,9% (61/211) foram amostras positivas e 71,1% (150/211) foram amostras

negativas. Ou seja, 28,9% das amostras são consideradas *S. pseudintermedius* resistente à oxacilina pela presença do gene *mecA*. Chambers et al (1997) cita que a detecção do gene *mecA* por métodos moleculares é considerada o método gold standard para avaliação qualitativa da resistência à oxacilina em *S.aureus*. No entanto, não há literatura sobre o *S.pseudintermedius* em relação ao melhor método diagnóstico. Botoni (2013) encontrou 35% das amostras *S. pseudintermedius* com a presença de gene *mecA* no Brasil. Já no estudo de SKOV et al.(2020) entre amostras da Europa e Estados unidos teve 48,66% (109 amostras) positivas para *mecA*.

Gráfico 3 – Resultado do teste de PCR para identificação de gene *mecA* em 211 amostras de *S.pseudintermedius* de cães. São Paulo, 2020.



No quadro 4, é possível observar que das 169 amostras resistentes à oxacilina pelo método de Disco difusão (halos ≥ 20 mm), 19 tem a presença do gene *mecA* (11,2%). Entretanto, das 61 amostras que tem o gene *mecA*, 42 (68,8%) foram sensíveis pela DD. Os mesmos resultados entre ambos os testes foi de 69,1% (146/211).

Embora a presença dos genes *mecA* serem encontrados em amostras sensíveis para outros métodos, Sturenburg et al (2009) dá um exemplo com amostras clínicas de *S. aureus* e cita que também podem transportar o gene *mecA*, muitas vezes sem expressá-lo. No estudo de Skov et al (2020), uma amostra *mecA* positivo (e *mecC*) teve halo entre 14 e 16 mm para oxacilina e 28 - 29 mm para cefoxitina. Este isolado também foi claramente resistente na investigação de Wu et al. (2016), o mecanismo de resistência para isso não foi elucidado.

Quadro 4 – Diagrama de dispersão de diâmetro de halo da Disco Difusão e presença de *mecA* de 211 isolados de *S. pseudintermedius* avaliados pelos pontos de interrupção do BRCAS 2019 (linha pretas). São Paulo, 2020.

Oxacilina	Halos (mm)																																						
	0	10	12	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	38	39	40	46										
<i>mecA</i> positivo	6	1	1	7	1	1		1	1	3	2	4	5	1	8	3	2	2		4		1	2	1	1		1	2											
<i>mecA</i> negativo	4	1	3	3	7		2	3		11		5	7	9	23	7	5	4	5	17	3	5	3	4	13	1	1	3	1										

O estudo de Skov et al (2020) propõe que 20mm no teste de Disco Difusão à oxacilina é um ponto de corte mais apropriado para distinguir isolados negativos para *mecA* (diâmetro da zona >20 mm) e positivos para *mecA* (diâmetro da zona <20 mm). Segundo o mesmo autor, esse novo ponto de interrupção deve reduzir a frequência do isolados resistentes que testam como suscetíveis em comparação com o atual ponto de interrupção do CLSI. Este valor, é considerado atualmente pelo BrCAST e foi utilizado no presente estudo, entretanto apenas 68,8% tinham halos >20mm na DD e presença de *mecA*, e 15,3% tinham halos <20mm e sem a presença de *mecA*, que não há compatibilidade com a citação do autor anteriormente.

O disco para cefoxitina, atualmente não é recomendado, segundo o BrCAST (2019) tem menor valor preditivo para a presença do gene *mecA* do que em outros estafilococos. Este recomenda que use o disco de oxacilina 1µg com pontos de corte para diâmetro do halo $S \geq 20$. Estudos mostraram também, que o teste de disco com cefoxitina tem baixa sensibilidade para detectar resistência à oxacilina em isolados veterinários de *S. schleiferi* e *S. pseudintermedius* (BEMIS et al 2006; SWENSON et al 2005; WU et al 2016). No presente estudo, 27,9% (59/211) das amostras apresentaram divergência entre os resultados de Disco difusão para Cefoxitina e a presença do *mecA*, enquanto que 30,8% (65/211) das amostras foram divergentes à oxacilina entre DD e *mecA*. Valores semelhantes entre os discos de cefoxitina e oxacilina neste estudo.

No Quadro 6, 18,48% (39/211) das amostras resistentes à oxacilina pelo método de Concentração Inibitória Mínima (diluições maior ou igual a 0,5 ug/ml) tem a presença do gene *mecA*. Uma maior porcentagem comparado ao método de DD (11,2%). Se considerarmos amostras com a presença de *mecA* e CIM resistentes, amostras ausentes de *mecA* e sensíveis na CIM temos 80,5% (170/211) de resultados semelhantes entre os testes. Valor este também superior ao método de DD (69,1%).

Na rotina laboratorial é determinado a realização da CIM quando há resistência na

DD (TEIXEIRA et al. 2014), segundo o presente estudo, esta forma deve ser repensada quando consideramos que a CIM tem valores superiores na detecção da presença de *mecA* comparado a DD.

Segundo o quadro 5, 22 amostras são *mecA* positivo com CIM baixas (menor ou igual a 0,25), tornando os resultados incoerentes. Como já foi discutido anteriormente na comparação entre os outros testes é preciso considerar o valor de sensibilidade e especificidade entre eles, que podem ter valores falsos positivos e falsos negativos. Entretanto, foi repetido o teste de CIM pelo método de ETEST e 22 permaneceram com essa divergência. Uma expliação pode ser a possibilidade da técnica de PCR ter apresentado valores falso positivos por conta de fatores como contaminação ambiental ou reações cruzadas. Visto que, o teste de CIM foi igual para o método de microdiluição em caldo e ETEST dessas amostras. Recomenda-se repetir estas amostras pelo método de PCR; excluir essas amostras para aplicação do ECOFF; ou sequenciar o genoma com objetivo de pesquisar outras PBP's/genes de resistência, já que o *S. pseudintermedius* não tem todos os seus mecanismos de resistência evidenciados.

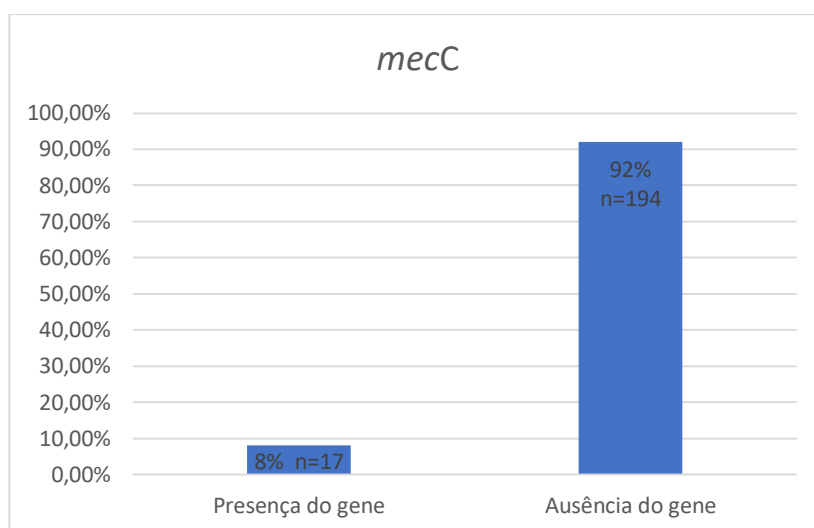
Quadro 5 – Diagrama de dispersão de diluições de CIM e presença de *mecA* de 211 isolados de *S. pseudintermedius* avaliados pelos pontos de interrupção do CLSI 2019 (linha vermelha). São Paulo, 2020.

Oxacilina	Diluições CIM ($\mu\text{g/ml}$)										
	$\leq 0,06$	0,12	0,25	0,5	1	2	4	8	16	32	>32
<i>mecA</i> positivo	19	1	2	15	11	3	4	1	1	1	3
<i>mecA</i> negativo	115	10	6	13	3	0	0	2	0	1	0

5.9 IDENTIFICAÇÃO DE GENES MEC C DE RESISTÊNCIA À OXACILINA

No gráfico 4 é possível visualizar os resultados do teste de PCR para identificação do gene *mecC*, onde foram identificadas 8,05 (17/211) amostras positivas e 91,94% (194/211) amostras negativas. No Brasil não há relatos da presença do gene *mecC* em *S. pseudintermedius* em cães e gatos até o momento.

Gráfico 4 – Resultado do teste de PCR para identificação de gene *mecC* em 211 amostras de cães.



5.10 RELAÇÃO ENTRE DETECÇÃO DE RESISTÊNCIA À OXACILINA

A comparação da detecção de resistência aos β -lactâmicos entre os tamanhos de zona de inibição de disco difusão da oxacilina usando como ponto de corte o BrCAST-2019 (OXIBrCAST), teste de disco difusão da cefoxitina usando como ponto de corte o CLSI-2019 (CFO-CLSI), concentração inibitória mínima de oxacilina usando como ponto de corte o CLSI-2019 (MICOXI) e do PCR para identificação do gene *mecA* é apresentada na tabela 6. Para o cálculo da diferença entre as proporções amostras R e I serão agrupadas, assim serão comparadas as proporções de amostras resistentes do total de cada forma de detecção.

Tabela 6 - Resultados (número de amostras e sua proporção) de 4 testes para a detecção de resistência aos β -lactâmicos com o valor de p das comparações. São Paulo, 2020.

Tipo	OXI-BrCAST	CFO-CLSI	MIC _{OXI}	MecA	p^*
Resistente (n/%)	43 (20.4%) ^a	8 (3.8%) ^b	58 (27.5%) ^a	61 (28.9%) ^a	< 0.01
Sensível (n/%)	168 (79.6%)	199 (94.3%)	153 (%)	150 (71.1%)	
Intermediário (n/%)	0 (0%)	4 (1.9%)	0 (0%)	0 (0%)	

NOTAS: *Valor de p obtido pelo teste de χ^2 para comparação entre proporções; ^{a,b}Letras iguais na mesma linha correspondem a proporções iguais.

Uma ou mais proporções foram diferentes (valor de $p < 0.01$), sendo que as formas de detecção OXI-BrCAST, MIC e o PCR para *mecA* são iguais entre si e melhores do que

CFO-CLSI. É importante observar que essas comparações não levam em conta o método que teoricamente detecta corretamente a amostra resistente, então é só a comparação entre quem detectou uma proporção maior ou menor de resistência, mas que não demonstra qual é o melhor método, pois não se sabe a realidade das amostras.

5.10.1 Teste Kappa (κ)

A detecção do gene *mecA* foi utilizada como o padrão ("gold standard") para a avaliação de concordância entre as formas de avaliação de resistência a β -lactâmicos e 3 testes κ_C foram realizados. Quando foi apenas avaliado se havia concordância entre as formas de avaliação de resistência a β -lactâmicos o teste κ_F foi calculado. A concordância geral entre os quatro métodos apresentou valor de $\kappa_F = 0.24$ ($p < 0.01$). Dados do Teste κ_C e a concordância entre os métodos OXI-BrCAST, CFO-CLSI e MICOXI com o método *mecA* de detecção de resistência estão nas tabelas 7. Os valores considerados para a avaliação de concordância são baseados no valor de p calculado e não isoladamente o percentual de discordâncias na terceira coluna (tabela 7). Sendo que a detecção por OXI-BrCAST teve uma concordância leve ($\kappa_C = 0.17$; $p = 0.01$), MICOXI teve uma concordância moderada ($\kappa_C = 0.53$; $p < 0.01$) e CFO-CLSI não apresentou concordância ($p = 0.32$) com *mecA*.

Tabela 7 - Valores de concordância com o método MecA (κ_C) entre os outros três métodos; e distribuição da discordância por método de detecção (N e %).

Método	κ_C	Valor de p	Discordam (%)
<i>OXI-BrCAST</i>	0.17	0.01	66 (31.3%)
<i>CFO-CLSI</i>	0.05	0.32	63 (29.9%)
<i>MIC_{OXI}</i>	0.52	< 0.01	41 (19.47%)

OXI - BRCAST = disco de oxacilina pelo método de disco difusão; CFO - CLSI = disco de Cefoxitina pelo método de disco difusão; MICoxi = concentração inibitória mínima de oxacilina.

Estes resultados, que demonstraram uma ausência de concordância do disco de Cefoxitina na DD para presença de *mecA* está de acordo com algumas pesquisas recentes (SKOV et al. 2020). Autores concluíram que a difusão do disco de cefoxitina não é confiável para a detecção da MRSP e que os laboratórios devem realizar a difusão do disco de oxacilina ou testes de concentração inibitória mínima com base em caldo (WU et al. 2016) . Isso foi confirmado por Yarbrough et al. (2018), que descobriram que nenhum dos 12 isolados de MRSP foi detectado por difusão de disco de cefoxitina, enquanto todos os 12 foram detectados usando difusão de disco de oxacilina. No estudo de Wu et al (2015) testes de cefoxitina tiveram um desempenho ruim, variando de 3 a 89% de suscetibilidade falsa (erros muito grandes) e 0 a 48% de falsa resistência (erros maiores).

5.10 ABORDAGEM DIAGNÓSTICA

De acordo com a tabela 8, os valores de abordagem diagnóstica considerando o ponto de corte do BRCAS (2019) teve desempenho superior comparado ao CLSI (2019). Além disso, ao comparar as tabelas é possível ver que a CIM em relação a presença de gene *mecA* tem um desempenho melhor do que a DD em relação ao presença do *mecA*.

Tabela 8 – Abordagem diagnóstica do teste de disco difusão de acordo com ponto de corte do CLSI (2019) e BRCAS (2019) considerando a presença do gene *mecA* como teste ouro.

Valores	Pontos de corte	
	CLSI 2019	BRCAS 2019
Sensibilidade	40%	43%
Especificidade	84%	88%
Acurácia	23,60%	25,64%
VPP	46,90%	59,50%
VPN	79,80%	80,40%

VPP: valor preditivo positivo, VPN: valor preditivo negativo

Tabela 9 – Abordagem diagnóstica do teste Concentração Inibitória Mínima considerando a presença do gene *mecA* como teste ouro.

Valores	
Sensibilidade	81%
Especificidade	87%
Acurácia	96,48%
VPP	83,47%
VPN	85,62%

VPP: valor preditivo positivo, VPN: valor preditivo negativo

5.11 DADOS EPIDEMIOLÓGICO DAS AMOSTRAS

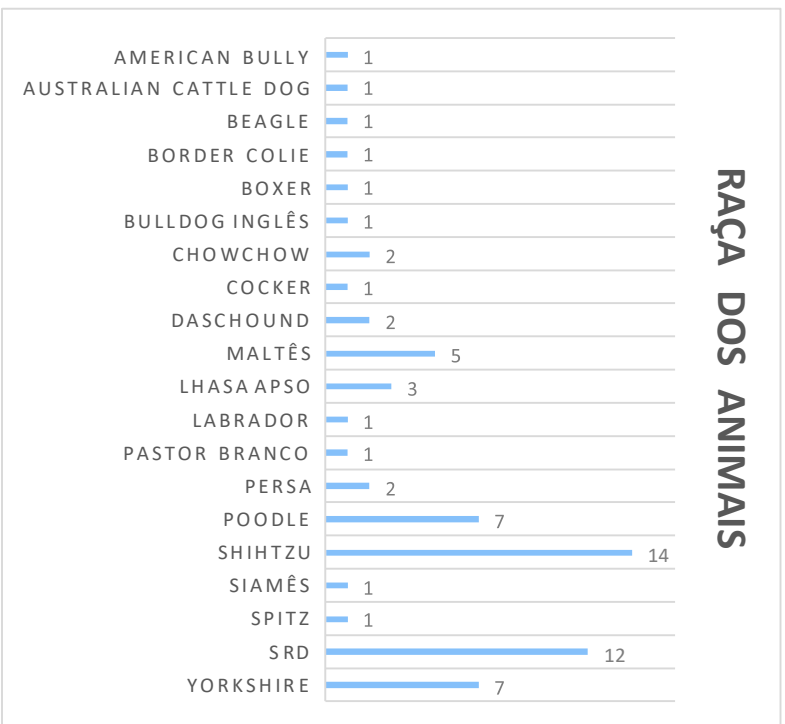
A tabela 10 mostra a distribuição das variáveis Espécie, Sexo, unidade federativa em que a amostra foi coletada (UF), e o sítio anatômico de coleta da amostra.

No estudo de Duim et al (2015), a maioria dos isolados de MSSP foi obtida de casos de otite externa (32,1%), e a maioria de MRSP foi obtida de casos de pioderma (43,7%). Já no presente estudo, 82 (38,9%) amostras eram de otite e 110 (52,1%) amostras eram de pele. Um relato de 72 isolados de MRSP, não especificamente de uma clínica de dermatologia, listou as feridas como a origem da infecção mais frequentemente registrada (39%), seguida pelas orelhas (38%), com apenas 10% de outras pele e mucosas e o restante de infecções do trato urinário (5%), infecções sistêmicas (5%) e outros locais (RUSCHER et al 2009). Não há estudos com dados em relação a raça, espécie e sexo dos animais.

Tabela 10 - Características das 211 amostras utilizadas no estudo. São Paulo, 2020.

Variável	Categoria	Amostras n(%)	Sem informações
<i>Espécie</i>	Cães Gatos	206 (97,6%) 5 (2,3%)	0 (0%)
<i>Sexo</i>	Fêmea Macho	48 (23%) 27 (13%)	136 (64%)
<i>UF</i>	Minas Gerais Santa Catarina São Paulo	23 (10,9%) 185 (87,7%) 3 (1,4%)	0 (0%)
<i>Sítio anatômico</i>	Incisão cirúrgica Mastite Abscesso Ocular Ferida Urina Ouvido Pele	1 (0,5%) 1 (0,5%) 2 (0,9%) 2 (0,9%) 2 (0,9%) 11 (5,2%) 82 (38,9%) 110 (52,1%)	0 (0%)

Gráfico 5 – Dados epidemiológico da Raça dos animais da amostragem



6. CONCLUSÃO

- A frequência de MRSP tanto fenotípica como genotípica foram altas, com valores acima de 20%.
- Foi identificado pela primeira vez isolados de *S. pseudintermedius* (17 isolados) contendo o gene *mecC*.
- A concordância entre os testes na detecção de resistência à oxacilina comparado a presença de *mecA* foi: concordância leve pelo disco de oxacilina no método de disco difusão; concordância moderada pela CIM de oxacilina; cefoxitina pelo método de disco difusão não apresentou concordância. Indicando portanto o uso dos testes de disco difusão (oxacilina) e CIM.
- ECOFFs calculados com 95% das amostras apresentaram ponto de corte de 0,5ug/L, compatível com CLSI (2019).
- O três antibióticos com mais amostras resistentes na disco difusão foram: tetraciclina (54,02%), penicilina (49,76 %) e sulfametoxazol-trimetoprim (40,28%). Outros: enrofloxacina (26,06%), oxacilina (22,37%), linezolida (17,53%), estreptomicina (15,16%), clindamicina (14,21%), gentamicina (9,95%), cefovecin (5,68%), cefoxitina (3,79%), ampicacina (1,42%).
- A frequência de *S. pseudintermedius* foi alta, acima de 40%..
- A abordagem diagnóstica (valores de sensibilidade, especificidade, acurácia, valor preditivo positivo e negativo) do teste de CIM apresentou melhor desempenho do que a Disco difusão utilizando a presença de *mecA* como teste ouro.

Anexo 2 – Diferença entre a interpretação dos resultados da disco difusão com referências de pontos de corte do CLSI(2019) e BRCAS(2019).

Oxacilina			Amicacina			Gentamicina		
	CLSI	BRCAS		CLSI	BRCAS		CLSI	BRCAS
Amostra 86	S	R	Amostra 31	I	R	Amostra 56	S	R
Amostra 118	S	R	Amostra 107	S	I	Amostra 148	R	S
Amostra 197	S	R	Amostra 108	I	R	Amostra 102	S	R
Amostra 201	S	R	Amostra 129	S	I			
Amostra 210	S	R	Amostra 144	S	I			
SUT			Penicilina			Tetraciclina		
	CLSI	BRCAS		CLSI	BRCAS		CLSI	BRCAS
Amostra 9	I	S	Amostra 6	R	S	Amostra 103	I	R
Amostra 125	I	S	Amostra 39	R	S	Amostra 109	I	R
Amostra 133	I	S	Amostra 42	R	S	Amostra 110	S	R
Amostra 139	I	S	Amostra 61	R	S	Amostra 119	I	R
Amostra 147	I	S	Amostra 66	R	S	Amostra 122	I	R
Amostra 155	I	S	Amostra 70	R	S	Amostra 152	I	R
Amostra 182	I	S	Amostra 84	R	S	Amostra 176	I	R
Amostra 192	I	S	Amostra 118	R	S	Amostra 179	I	R
			Amostra 186	R	S	Amostra 180	I	R
						Amostra 184	I	R
						Amostra 185	I	R
						Amostra 187	I	R

8.REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ATALAY, B; ERGIN, F; CEKINMEZ, M; CANER, H; ALTINORS,N. Brain abscess caused by *Staphylococcus intermedius*. Acta Neurochir. N.142, p. 347-348, 2005.
- BANNOEHR, J; FRANCO, A; IURESCIA, M; BATTISTI, A; FITZGERALD, R. Identificação molecular do diagnóstico de *S. pseudintermedius*. Microbiologia Clínica Veterinária, 2008.
- BANNOEHR, J.; GUARDABASSI, L. *Staphylococcus pseudintermedius* in the dog: Taxonomy, diagnostics, ecology, epidemiology and pathogenicity. Veterinary Dermatology, v. 23, n. 4, p. 1-16, 2012
- BEMIS, D. A.; JONES, R. D; HIATT, L. E. et al. Comparison of Tests to Detect Oxacillin Resistance in *Staphylococcus intermedius*, *Staphylococcus schleiferi*, and *Staphylococcus aureus* Isolates from Canine Hosts. J. of Clin. Microbiol., v.44, n.9, p.3374-3376, 2006.
- BECK, K.M; WAISGLASS, S.E; DICK, H.L.N; et al. Prevalence of methicillinresistant *Staphylococcus pseudintermedius* (MRSP) from skin and carriage sites of dogs after treatment of their methicillinresistant or methicillin-sensitive staphylococcal pyoderma. Vet Dermatol, n. 23, p.369–67, 2012.
- BOTONI, Larissa S. Prevalência de *Staphylococcus pseudintermedius* resistente à metilina (MRSP) em cães com piodermite superficial atendidos no Hospital Veterinário da UFMG entre março e julho de 2013. 2013. 53 pag. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Minas Gerais, Escola de Veterinária.
- BOTONI, L.S.; SCHERER, C.B.; SILVA, R.O.; COURA, F.M.; HEINEMANN, M.B.; PAES-LEME, F.O.; COSTA-VAL, A.P. 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.
- BECKER, K.; VAN, A.S.; IDELEVICH, E.A.; SCHLEIMER, N.; SEGGEWIB, J.; MELLMANN, A. et al. Resistência à metilina mediada por mecB transferível codificada por plasmídeo e em *Staphylococcus aureus* . Emerg Infect Dis ., v. 24 : 242–248, 2018.
- CHAMBERS, H.F. Methicillin resistance in staphylococci: molecular and biochemical basis and clinical implications. Clin. Microbiol. n. 10, p.781-791, 1997.
- CHUANG, CY; YANG, YL; HSUEH, PR, et al. Catheter-related bacteremia caused by *Staphylococcus pseudintermedius* refractory to antibiotic-lock therapy in a hemophilic

- child with dog exposure, J Clin Microbiol, vol. 48, pg. 1497-8, 2010.
- COX, H.U; NEUMAN, S.S; ROY, A.F; HOSKINS, J.D. Species of *Staphylococcus* isolated from animal infection . Cornell Vet. v.74, p. 124-135, 1984.
- DEVRIESE, L.A; VANCANNEYT, M; BAELE, M et al. *Staphylococcus pseudintermedius* sp. coagulase-positive species from animals. Int J Syst Evol Microbiol, n. 55, p. 1569 – 1573, 2005.
- DEVRIESE, LA; HERMANS, K; BAELE, M. et al. *Staphylococcus pseudintermedius* versus *Staphylococcus intermedius*. Veterinario. Microbiol., V.133, p.206-207, 2009.
- DUIM, B; VERSTAPPEN, E. M. B; LAARHOVEN, L. M; DUIJKEREN, E. V; HORDJJK, J; HEUS, P; SPANANINKS, M; TIMMERMAN, A.J; WAGENAAR, J. A. Alterações na população de *Staphylococcus pseudintermedius* resistente à meticilina e disseminação de fenótipos resistentes a antimicrobianos na Holanda, 2015.
- DUIJKEREN, E,V; CATRY, B; GREKO, C; MORENO, M; et al. Review on methicillin-resistant *Staphylococcus pseudintermedius*. J Antimicrob Chemother, v. 66 (12): p. 2705-2714, 2011.
- EDELSTEIN, P.; Rapid detection of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* directly from clinical samples: methods, effectiveness and cost considerations. Ger Med Sci., v. 7, n. 1, pag. 1-19, 2009.
- FRANK, L. A; KANIA, S. A.; KIRZEDER, E. M. et al. Risk of colonization or gene transfer to owners of dogs with methicillin-resistant *Staphylococcus pseudintermedius*. Vet Dermatol. v. 20, p. 496-501, 2009.
- FRANK, LA; LOEFFLER, A. *Staphylococcus pseudintermedius* resistente à meticilina : desafio clínico e opções de tratamento . Veterinario. Dermatol., vol. 23, pag.283 – 291, 2012.
- GANIERE, JP; MEDAILLE, C; MANGION, C . Susceptibilidade a medicamentos antimicrobianos de isolados clínicos de *Staphylococcus intermedius* de pioderma canino . J Vet Med B, vol. 52, pag. 25 – 31, 2005 .
- GERSTADT, K; DALY, J.S; MITCHELL, M; WESSOLOSSKY,M; CHEESEMAN, S.H. Methicillin-resistant *Staphylococcus intermedius* pneumonia following coronary artery bypass grafting. Clin Infect Dis. N.29, p.218-219, 1999.
- GOLD, R. M; LAWHON, S. D. Amikacin Resistance in *Staphylococcus pseudintermedius* Isolated from Dogs. Clinical Veterinary Microbiology, 2014.
- GREENE, Craig. Infectious diseases of the dog and cats. 4 Edição. USA: Saunders, 2012. pag.340-347.

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

GUARDABASSI, L; HOUSER, GA; FRANK, LA; PAPICH, MG. Diretrizes para uso Antimicrobiano em cães e gatos , p 183 - 206 . Em Guardabassi L, Jensen LB, Kruse H (ed), Guia para uso antimicrobiano em animais . Blackwell Publishing, Ltd. Ames, IA . 2008

GUARDABASSI, L; LOEBER, ME; JACOBSON, A. Transmission of multiple antimicrobial-resistant *Staphylococcus intermedius* between dogs affected by deep pyoderma and their owners, Vet Microbiol, vol. 98, pg. 23-7, 2004.

HAENNI, M.; MORAES, N. A.; CHATRE, P.; MOODLEY, A.; MADEC, J.Y. Caracterização clínica de *Staphylococcus pseudintermedius* resistente à meticilina e suscetível à meticilina na França. Journal of Antimicrobial resistência global , vol. 2, pag. 119 – 123, 2014.

HAENNI, M.; GARCH, F.E.; MIOSSEC, C.; MADEC, J.Y.; HOCQUET, D.; VALOT, B. Alta diversidade genética em *S. pseudintermedius* suscetível à meticilina em cães na Europa. Jornal de resistência antimicrobiana global. 2020.

HANSELMAN, BA; KRUTH, SA; ROUSSEAU, J, et al. Coagulase positive staphylococcal colonization of humans and their household pets, Can Vet J, vol. 50, pg. 954-8, 2009.

HANSELMAN, B.A.; KRUTH, S.; WEESE, J.S.; Methicillin-resistant staphylococcal colonization in dogs entering a veterinary teaching hospital. Vet. Microbiol. vol. 126, p.277-281, 2007.

HUMPHRIES, M; WU, T; WESTBLADE, F. L; ROBERTSON, A. E; WALLACE, M.; BURNHAM, C. D; BURD, M; LAWHON, S; HINDLER, J. A. In Vitro Antimicrobial Susceptibility of *Staphylococcus pseudintermedius* Isolates of Human and Animal Origin Romney. M. Humphries. Journal of Clinical Microbiology, vol. 54, p. 1391-1392, 2016.

HUSE, HK; MILLER, S.A; CHANDRASEKARAN, S. et al. Avaliação da Oxacilina e Cefoxitina Disco Difusão e CIM pontos de interrupção estabelecidas pelo instituto clinical na laboratory standards para detecção de *mecA* mediada por resistência à oxacilina em *S. Schleiferi*. J Clin Microbiol, vol. 56 (2), pag. e01653-17, 2018.

IDAWIDA, M.K.; CHMIEL, D.C.; RZEWUSKA, M. Resistência de cepas de *S. pseudintermedius* resistentes à meticilina à Pradofloxacina. Journal of Veterinary Diagnostic Investigation, vol. 28, ed. 5, pág. 514-518, 2016.

- JONES, RD; KANIA, SA; ROHRBACH, WB; et al. Prevalência de estafilococos resistentes a oxacilina e multidrogas em amostras clínicas de cães: 1.772 amostras (2001-2005). J Am Vet Med Assoc, vol. 230, pag. 221 – 227, 2007.
- JUNJAPPA, R; SRIVIDYA, D; PANCHALI, R; NAGALAKSHMI, N; JULIET, R; et al. Efficacy of anti-staphylococcal protein P128 for the treatment of canine pyoderma: potential applications. Veterinary Research Communications, Vol.37(3), p.217-228, 2013.
- KANIA, S.; WILLIAMSON, N.; FRANK, L.; WILKES, R.; JONES, R.; BEMIS, D. Methicillin resistance of staphylococci isolated from the skin of dogs with pyoderma. Am. J. Vet. Res. v. 65, p. 1265-1268, 2004.
- KADLEC, K. Characterization of canine and feline methicillin-resistant *Staphylococcus pseudintermedius* (MRSP) from Thailand. Veterinary microbiology, vol. 194, pg. 93- 97, 2016.
- KANIA, SA; WILLIAMSON, NL; FRANK, LA et al. Resistência à meticilina de estafilococos isolados da pele de cães com pioderma. Sou. J. Vet. Res., V.65, p.1265-1268, 2004.
- KAWAKAMI, T .; SHIBATA, S .; MURAYAMA, N. et al. Susceptibilidade antimicrobiana e resistência à meticilina em *Staphylococcus pseudintermedius* e *Staphylococcus schleiferi* subsp coagulans isolados de cães com pioderma no Japão. J. Vet. Med. Sci., V.72, p.1615-1619, 2010.
- KIKUCHI, K.; KARASAWA, T.; PIAO, C.; ITODA, I.; HIDAI, H.; YAMAURA, H.; TOTSUKA, K.; MORIKAWA, T.; TAKAYAMA, M. Molecular confirmation of transmission route of *Staphylococcus intermedius* in mastoid cavity infection from dog saliva. J. Infect. Chemother. vol.10, p.46-48, 2004.
- LANDIS, J.R.; KOCH, G.G. The measurement of observer agreement for categorical data. Biometrics. vol. 33, n.1, pag.159-74, 1977.
- LEE, J. *Staphylococcus intermedius* isolated from dog-bite wounds. J. Infect. n. 29, p.105, 1994.
- MAGIORAKOS, A.P.; SRINIVASAN, A.; CAREY, R.B.; CARMELI, Y.; FALAGAS, M.E.; GISKE, C.G.; HARBARTH, S.; HINDLER, J.F.; KAHLMETER, G.; OLSSON-LILJEQUIST, B.; PATERSON, D.L.; RICE, L.B.; STELLING, J.; STRUELENS, M.J.; VATOPOULOS, A.; WEBER, J.T.; MONNET, D.L. Multidrug-resistant, extensively drug-resistant and pandrug-resistant bacteria: an international expert proposal for interim standard definitions for acquired resistance, Clin. Microbiol. Infect. v. 18, p. 268–81,

2012.

MIMICA, M.J.; MENDES, C.M.F. Diagnóstico laboratorial da resistência à oxacilina em *Staphylococcus aureus* Laboratory diagnosis of oxacillin resistance in *Staphylococcus*. J Bras Patol Med Lab, v. 43, n. 6, p. 399-406, 2007.

MEDLEAU, L; LONG, R. E; BROWN, J. Frequency and antimicrobial susceptibility of *Staphylococcus* species isolated from canine pyodermas. Am J Vet Res, vol. 47, p. 229–31, 1986.

MCLAUCHLIN, J1; RIPABELLI, G; BRETT, MM, THRELFALL, EJ. Amplified fragment length polymorphism (AFLP) analysis of *Clostridium perfringens* for epidemiological typing. Int J Food Microbiol., v. 25, p. 21-8, 2000.

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

MORRIS, D. O; ROOK, K. A; SHOFER, F. S. Screening of *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus intermedius*, and *Staphylococcus schleiferi* isolates obtained from small companion animals for antimicrobial resistance: a retrospective review of 749 isolates (2003-04). Vet Dermatol, vol. 17, p.332–7, 2006.

MURPHY, KM. Uso de linezolida no tratamento de infecções estafilocócicas resistentes à meticilina em cães e gatos . Vet Dermatol, vol. 19, pag. 110, 2018.

NIENHOFF, U; KADLEC, K; CHABERNY, IF; et al. Methicillin-resistant *Staphylococcus pseudintermedius* among dogs admitted to a small animal hospital, Vet Microbiol, vol. 150, pg. 191-7, 2011.

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

PERRETEN, V; KADLEC, K; SCHWARZ, S. Clonal spread of methicillin-resistant *Staphylococcus pseudintermedius* in Europe and North America: an international multicentre study, J Antimicrob Chemother , vol. 65, pg. 1145-54, 2010.

POTTUMARTHY, S; SCHAPIRO, JM; PRENTICE, JL;HOUZE, YB; SWANZY, SR; FANG, FC; COOKSON, BT. Isolados clínicos de *Staphylococcus intermedius* mascarados como *Staphylococcus aureus* resistente à meticilina . J. Clin. Microbiol., vol. 42, pag. 5881 -5884, 2004.

QUINN, P.J.; MARKEY, B.K.; CARTER, M.B.; DONNELLY, W.J.; LEONARD, F.C. Microbiologia veterinária e doenças infecciosas. Artmed. Ed 3, 2006. p.369-381.

QUITOCO, I.M.Z; SEVERO, R.M; CICERA, M; RODRIGUES, S.R, et al. First report in South America of companion animal colonization by the USA1100 clone of

community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (ST30) and by the European clone of methicillin-resistant *Staphylococcus pseudintermedius* (ST71). BMC Research Notes, vol.6, p.336, 2013.

RUSCHER, C; LUBKE, B. A; WLEKLINSKI, CG; et al. Prevalência de *Staphylococcus pseudintermedius* resistente à metilina isolada de amostras clínicas de animais de companhia e equídeos. Vet Microbiol, vol. 136, pag. 197 – 201, 2009.

R Core Team (2019). R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria.

SASAKI, T; KIKUCHI, K; TANAKA, Y; et al. Reclassification of phenotypically identified *Staphylococcus intermedius* strains. J Clin Microbiol, v. 45, p. 2770-2778, 2007.

SASAKI, T .; KIKUCHI, K .; TANAKA, Y. et al. Reclassificação de cepas de *Staphylococcus intermedius* identificadas fenotipicamente. J. Clin. Microbiol., V.45, p.2770-2778, 2007.

SASAKI, T.; TSUBAKISHITA, S.; TANAKA, Y.; SAKUSABE, A.; OHTSUKA, M.; HIROTAKI, S. et al. Método de PCR-multiplex para identificação de espécies de estafilococos coagulase-positivos . J Clin Microbiol, v.48, pag. 765-769, 2010.

SCHISLER, J.R.; HILLIER, A .; DANIELS, JB et al. Avaliação dos critérios interpretativos do Clinical Laboratory Standards Institute para *Staphylococcus pseudintermedius* resistente à metilina isolado de cães. J. Vet. Diagn. Invest., V.21, p.684-688, 2009.

SKOV, R; VARGA, A; MATUSCHEK, E; AHMAN, J; BEMIS, D; BENGTSSON, B; SUNDE, M; HUMPHRIES, R; WESTBLADE, L; GUARDABASSI, L; KAHLMETER, G. Critérios de Disco Difusão do EUCAST para detecção de resistência à B-Lactâmicos mediada por mecA em *S. pseudintermedius*: Oxacilina versus Cefoxitina. Microbiologia Clínica e Infecção, vol 26, ed 1, pag. 122.e1-122.e6, 2020.

STEFANETTI, V; BIETTA, A; PASCUCI, L; MARENZONI, M. L; COLETTI, M; FRANCIOSINI, M. P; PASSAMONTI, F; PROIETTI, P.C. Investigation of the antibiotic resistance and biofilm formation of *Staphylococcus pseudintermedius* strains isolated from canine pyoderma. Veterinaria Italiana, vol. 53 (4), pag. 289-296, 2017.

SCHERER, C.B.; BOTONI, LS; COURA, F.; SILVA, R.O.; SANTOS, R.D.; HEINEMANN., M. B.; Costa-Val, A. P. Frequency of *Staphylococcus spp.* and profile of antimicrobial resistance in dogs with otitis externa. Ciencia Rural, v. 48, p. e20170738, 2018.

- SCHISLER, J. R.; HILLIER, A.; DANIELS, J.B; COLE, L.K; GEBREYS, W.A. Evaluation of Clinical Laboratory Standards Institute interpretive criteria for methicillin-resistant *Staphylococcus pseudintermedius* isolated from dogs. J Vet Diagn Invest, v. 21, p. 684–688, 2009.
- SWENSON, J.M.; TENOVER, F.C. Grupo de Estudo de Cefoxitina em Disco. Os resultados dos testes de difusão em disco com cefoxitina se correlacionam com a presença de mecA em *Staphylococcus spp* . J Clin Microbiol, v.43, pag. 3818 – 3823, 2005.
- TANNER, M.; EVERETT, C.; YOUVAN, D. Molecular phylogenetic evidence for noninvasive zoonotic transmission of *Staphylococcus intermedius* from canine pet to a human. J. Clin. Microbiol., vol.38, p.1628-1631, 2000.
- TURNIDGE, et al. Modelling of MIC distributions. Clinical Microbiology and Infection, v.12 n.5, 2006.
- TEIXEIA, J.P.; SILVA, N., FONSECA, L.M.; COSTA, G.M. Uso de PCR Duplex para detecção dos genes femA e mecA e determinação da concentração inibitória mínima (CIM) em *Staphylococcus aureus* isolados de leite cru. Rev Inst Adolfo Lutz. São Paulo, 2014; 73(3):272-9.
- VANDENESCH, F; CELARD, M; ARPIN, D, et al. Catheter-related bacteremia associated with coagulase-positive *Staphylococcus intermedius*, J Clin Microbiol, vol. 33, pg. 2508-10, 1995.
- VAN DUIJKEREN, E.; BOX, A.; HECK, M.; WANNET, W.; FLUIT, A. Methicillin-resistant staphylococci isolated from animals. Vet. Microbiol., vol. 103, p. 91-97, 2004.
- VENGUST, M.; ANDERSON, M.; ROUSSEAU, J.; WEESE, J. Methicillin-resistance staphylococcal colonization in clinically normal dogs and horses in the community. Lett. Appl. Microbiol., vol. 43, p.602-606, 2006.
- VENTRELLA, G.; MOODLEY, A.; GRANDOLFO, E.; PARISI, A.; CORRENTE, M.; BIONAVOGLIA, D. et al. Frequência, suscetibilidade antimicrobiana e distribuição clonal de *Staphylococcus pseudintermedius* resistente à metilina em amostras clínicas de cães submetidos a um laboratório de diagnóstico veterinário na Itália: uma investigação retrospectiva de três anos. Vet Microbiol., v. 211, pag. 103 – 106, 2017.
- WEDLEY, A.L.; DAWSON, S.; MADDOX, W.T; COYNE, K.P; PINCHBECK, G.L; CLEGG, P; JAMROZY, D; FIEDLER, M; DONOVAN, D; NUTTALL; WILLIAMS, N. Carriage of *Staphylococcus* species in the veterinary visiting dog population in mainland UK: Molecular characterisation of resistance and virulence. Vet microbial, n. 170, p. 81-88, 2014.

WEESE, JS. Questões relacionadas ao uso de vancomicina em animais de companhia . J Am Vet Med Assoc, vol. 233, pag. 565 – 567, 2008.

WEESE, S.; VAN DUIJKEREN, E. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus pseudintermedius* in veterinary medicine. Vet Microbiol, n. 140 p. 418–429. 2010.

WETTSTEIN, K; DESCLOUX, S; ROSSANO, A; et al. Emergence of methicillin-resistant *Staphylococcus pseudintermedius* in Switzerland: three cases of urinary tract infections in cats, Schweiz Arch Tierheilkd, vol. 150, pg. 339-43, 2008.

WIELDERS, C. L. C; VRIENS, M. R; BRISSE, S. et al. Evidence for in-vivo transfer of mecA DNA between strains of *Staphylococcus aureus*. Lancet, v. 357, p.1674–5, 2001.

WU, MT; BURNHAM, CA; WESTBLADE, LF; BARD, J. D; LAWHON, SD;

WALLACE, MA; et al. Avaliação do disco de oxacilina e cefoxitina e pontos de interrupção da CIM para predição da resistência à metilina em isolados humanos e veterinários do grupo *Staphylococcus intermedius*. J Clin Microbiol, vol. 54, pag. 535 – 542, 2016.

YARBROUGH, M.L.; LAINHART, W.; BURNHAM, C.A. Epidemiology, Clinical Characteristics, and Antimicrobial Susceptibility Profiles of Human Clinical Isolates of *Staphylococcus intermedius* Group. J Clin Microbiol, v. 56, p.e01788-17, 2018.