

JOANA SOFIA PINTO DEVESA

**RESISTÊNCIA A ANTIBIÓTICOS EM *Staphylococcus
pseudintermedius* DE ISOLADOS CUTÂNEOS DE CÃES
COM PIODERMITE SUPERFICIAL**

Orientadora: Professora Doutora Margarida Alves

Co-Orientadora: Mestre Ana Oliveira

Universidade Lusófona de Humanidades e Tecnologias

Faculdade de Medicina Veterinária

Lisboa

2015

JOANA SOFIA PINTO DEVESA

**RESISTÊNCIA A ANTIBIÓTICOS EM *Staphylococcus
pseudintermedius* DE ISOLADOS CUTÂNEOS DE CÃES
COM PIODERMITE SUPERFICIAL**

Dissertação apresentada para a obtenção do Grau de
Mestre em Medicina Veterinária no curso de Mestrado
Integrado em Medicina Veterinária conferido pela
Universidade Lusófona de Humanidades e Tecnologias

Membros do júri:

Presidente: Professora Doutora Michelle Brasil

Arguente: Professora Doutora Ana Varandas

Orientadora: Professora Doutora Margarida Alves

Co-Orientadora: Mestre Ana Oliveira

Universidade Lusófona de Humanidades e Tecnologias

Faculdade de Medicina Veterinária

Lisboa

2015

Two bacteria walk into a bar.

The bartender says "Get out we don't serve any bacterial drinks here".

The bacteria say "Hey we work here, we are Staph".

AGRADECIMENTOS

Queria agradecer à minha Orientadora Dr.^a Margarida Alves por toda a ajuda, simpatia e paciência.

Um especial agradecimento à minha Co-Orientadora Dr.^a Ana Oliveira por me ter enveredado neste projeto tão interessante, por toda a ajuda e ensinamentos e por ter cultivado o meu gosto pela dermatologia e microbiologia.

A todos os professores da FMV-ULHT por todo o conhecimento transmitido e inspiração.

Gostaria de agradecer a todos do Laboratório de Análises Clínicas e Histopatologia da Faculdade de Medicina Veterinária pela amabilidade em partilhar o seu espaço comigo.

Aos meus pais que sempre me motivaram e ajudaram durante o meu percurso académico e que fizeram de mim a pessoa que sou hoje, dando especial ênfase à minha mãe que teve a coragem de ler a minha tese, não uma, mas duas vezes.

Ao meu melhor amigo e cúmplice, o meu João, não há palavras para descrever a paciência, carinho, e apoio incondicional.

Um especial agradecimento à minha família de outras mães, veterinários ou não, que me acompanharam desde sempre, ou que conheci ao entrar para o curso, e com quem sempre pude contar nos bons e maus momentos. Fico grata por ter pessoas tão especiais na minha vida.

Ao Kyo, Kira, Ryuky, Khaleesi e Dracarys, melhores amigos, pelo amor incondicional. Não há nada que um ronron não solucione.

RESUMO

Staphylococcus pseudintermedius é uma bactéria comensal da pele e mucosa do cão, sendo o principal agente etiológico de piodermite bacteriana superficial e uma das principais causas para prescrição antibiótica em clínica de pequenos animais.

O presente estudo teve como objetivo a determinação do perfil de resistência aos antibióticos recomendados pelas linhas de orientação da *International Society for Companion Animal Infectious Disease* (ISCAID), num grupo de isolados de *S. pseudintermedius* suscetíveis e resistentes à meticilina, provenientes de cães com piodermite superficial. Avaliou-se, igualmente, a incidência de multirresistência e a aplicabilidade das linhas de orientação da ISCAID neste grupo de isolados. Este constitui um estudo prospetivo, tendo sido utilizados 55 isolados de *S. pseudintermedius*, testados para a suscetibilidade à oxacilina pela técnica de Kirby-Bauer e, posteriormente, divididos em dois grupos: *S. pseudintermedius* resistente à meticilina (MRSP, 25/55, 45%) e *S. pseudintermedius* suscetível à meticilina (MSSP, 30/55, 55%).

No grupo MRSP, foi observado 96% de resistência a ambas clindamicina e eritromicina; 92% à amoxicilina-ácido clavulânico, trimetoprim-sulfametoxazol e pradofloxacina; 88% à cefalotina, enrofloxacina e gentamicina; 80% à tetraciclina; 40% à minociclina; 12% ao cloranfenicol e rifampicina; e 8% à amicacina. No grupo MSSP, verificou-se 70% de resistência à tetraciclina; 67% à minociclina; 47% à eritromicina; 43% à clindamicina; 27% ao trimetoprim-sulfametoxazol; 23% ao cloranfenicol; 10% à gentamicina; 7% a ambas enrofloxacina e pradofloxacina; 3% à rifampicina e amicacina; e 0% de resistência à amoxicilina-ácido clavulânico e cefalotina. Foi possível, ainda, verificar que 66% dos isolados demonstraram-se multirresistentes, sendo que 67% eram MRSP e 33% MSSP; 33% demonstraram-se não multirresistentes, dos quais 95% eram MSSP e apenas 5% MRSP.

Verifica-se, assim, a existência de níveis elevados de resistência a antibióticos de primeira escolha, muitas vezes utilizados de forma empírica e sem realização de antibiograma prévio. Este facto limita a sua utilização por parte do Médico Veterinário em isolados MRSP, apesar de no grupo MSSP ainda se detetar evidentes suscetibilidades. O número de isolados multirresistentes é, também, alarmante, diminuindo o número de alternativas antibióticas disponíveis em casos cujas opções antibióticas são limitadas, o que ocorre frequentemente em clínica de referência.

Palavras-chave: *Staphylococcus pseudintermedius*; piodermite bacteriana superficial canina; antibióticos; meticilina; multirresistência.

ABSTRACT

Staphylococcus pseudintermedius is part of the normal microbiota of canine skin and mucosa. It is also the main etiological pathogen of canine superficial pyoderma, in addition to being a major cause for antimicrobial prescription in small animal practice.

This study aimed to determine the resistance of the antibiotics recommended by the guidelines of the International Society for Companion Animal Infectious Disease (ISCAID) guidelines, in a group of *S. pseudintermedius* isolates susceptible and resistant to methicillin, from dogs with superficial pyoderma. The incidence of multidrug resistance and the applicability of the ISCAID guidelines in this group of isolates was also evaluated. This was a prospective study, where 55 isolates of *S. pseudintermedius* were tested for oxacillin susceptibility by the Kirby-Bauer technique and, then, divided into two groups: methicillin resistant *S. pseudintermedius* (MRSP, 25/55, 45%) and methicillin susceptible *S. pseudintermedius* (MSSP, 30/55, 55%).

In the MRSP group, 96% of the isolates evidenced resistance to both clindamycin and erythromycin; 92% to amoxicillin-clavulanic acid, trimethoprim-sulfamethoxazole and pradofloxacin; 88% to cephalothin, enrofloxacin and gentamicin; 80% to tetracycline; 40% to minocycline; 12% to chloramphenicol and rifampicin; and 8% to amikacin. In the MSSP group, 70% of the isolates showed resistance to tetracycline; 67% to minocycline; 47% to erythromycin; 43% to clindamycin; 27% to trimethoprim-sulfamethoxazole; 23% to chloramphenicol; 10% to gentamicin; 7% to both enrofloxacin and pradofloxacin; 3% to rifampicin and 3% to amikacin; and 0% to amoxicillin-clavulanic acid and cephalothin.

It was also determined that 66% of the isolates were multiresistant, in which 67% were MRSP and 33% MSSP; 33% were non multiresistant, with 95% of the isolates being MSSP and only 5% MRSP.

The results reveal the existence of high levels of resistance to first tier antibiotics, often used empirically and without previous susceptibility testing. This limits their use by the Veterinarian in MRSP isolates, although there are still obvious susceptibilities in the MSSP group. The number of multiresistant isolates is also alarming, decreasing the number of antibiotic alternatives available in cases whose options are limited, which often occurs in reference practice.

Keywords: *Staphylococcus pseudintermedius*; canine superficial pyoderma; antimicrobials; methicillin; multiresistant.

ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

®	Marca Registada
™	Marca Registada, do inglês, <i>trademark</i>
°C	Graus Celcius
%	Porcentagem
µg	Micrograma
µm	Micrómetro
µL	Microlitro
ADN	Ácido Desoxirribonucleico
ALP	Fosfatase Alcalina, do inglês <i>Alkaline Phosphatase</i>
ALT	Alanina Transferase, do inglês <i>Alanine Transferase</i>
AK	Amicacina
AMC	Amoxicilina-Ácido Clavulânico
ARN	Ácido Ribonucleico
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
BID	Duas vezes por dia, da locução latina <i>bis in die</i>
CDC	<i>Centers for Disease Control and Prevention</i>
CF	Cefalotina
CLOR	Cloranfenicol
CLSI	<i>Clinical and Laboratory Standards Institute</i>
CLSI-VAST	<i>Veterinary Antimicrobial Susceptibility Testing</i>
CM	Clindamicina
CMI	Concentração Mínima Inibitória
E	Eritromicina
ECDC	<i>European Centre for Disease Prevention and Control</i>
ENR	Enrofloxacin
<i>et al.</i>	E outros, da locução latina <i>et alii</i>
EUA	Estados Unidos da América
EUCAST	<i>European Committee on Antimicrobial Suscetibility Testing</i>
FMV-ULHT	Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade Lusófona de Humanidades e Tecnologias
GGT	Gama Glutamyltransferase, do inglês <i>Gamma-Glutamyl Transferase</i>

GM	Gentamicina
ISCAID	<i>International Society for Companion Animal Infectious Disease</i>
LACH-FMV	Laboratório de Análises Clínicas e Histopatologia da Faculdade de Medicina Veterinária
mg	Miligrama
mg/dL	Miligrama por decilitro
mg/kg	Miligrama por quilograma
mg/L	Miligrama por litro
mg/mL	Miligrama por mililitro
mL	Mililitro
mm	Milímetro
nm	Nanômetro
MH	Minociclina
MLS _B	Fenótipo de resistência a Macrólidos, Lincosamidas e Streptogramina B, do inglês <i>Macrolide-Lincosamide-Streptogramin B</i>
mrMRSP	<i>Staphylococcus pseudintermedius</i> resistente à meticilina multirresistente, do inglês <i>Methicillin-Resistant Staphylococcus pseudintermedius</i>
mrMSSP	<i>Staphylococcus pseudintermedius</i> resistente à meticilina não multirresistente, do inglês <i>Methicillin-Resistant Staphylococcus pseudintermedius</i>
MRSA	<i>Staphylococcus aureus</i> resistente à meticilina, do inglês <i>Methicillin-Resistant Staphylococcus aureus</i>
MRSP	<i>Staphylococcus pseudintermedius</i> resistente à meticilina, do inglês <i>Methicillin-Resistant Staphylococcus pseudintermedius</i>
mSP	<i>Staphylococcus pseudintermedius</i> multirresistente
MSSP	<i>Staphylococcus pseudintermedius</i> suscetível à meticilina, do inglês <i>Methicillin-Susceptible Staphylococcus pseudintermedius</i>
nmSP	<i>Staphylococcus pseudintermedius</i> não multirresistente
OMS	Organização Mundial de Saúde
OX	Oxacilina
P	Pradofloxacina
PABA	Ácido paraminobenzoico, do inglês <i>Paraminobenzoic Acid</i>
PBP	Proteína de ligação à penicilina, do inglês <i>Penicillin Binding Protein</i>
PCR	Reação em cadeia da polimerase, do inglês <i>Polymerase Chain Reaction</i>

pH	Potencial hidrogeniónico
RA	Rifampicina
SID	Uma vez por dia, da locução latina <i>semel in die</i>
SIG	Grupo de <i>Staphylococcus intermedius</i> do inglês <i>Staphylococcus intermedius group</i>
spp.	Espécies
SPSS	<i>Statistical Package for the Social Sciences</i>
SSCmec	Cassete cromossómica estafilocócica <i>mec</i> , do inglês <i>Staphylococcal Cassette Chromosome mec</i>
subsp.	Subespécie
SXT	Trimetoprim-sulfametoxazol
TE	Tetraciclina
TID	Três vezes por dia, da locução latina <i>ter in die</i>
UE	União Europeia
UFC's	Unidades formadoras de colónias
UFC/mL	Unidades formadoras de colónia por mililitro
UI	Unidades internacionais

ÍNDICE GERAL

	Página
I – INTRODUÇÃO	15
1 – Piodermite bacteriana	15
1.1 – Abordagem diagnóstica.....	17
2 – <i>Staphylococcus pseudintermedius</i>	18
2.1 – Características gerais.....	18
2.2 – Taxonomia.....	18
2.3 – Epidemiologia	19
2.4 – Emergência da resistência à meticilina	21
2.5 – Fatores de risco para colonização e infecção	22
3 – Métodos para determinação de resistência a antibióticos.....	22
3.1 – Teste de suscetibilidade de Kirby-Bauer por difusão em disco	22
3.2 – Concentração mínima inibitória	24
4 – Antibioterapia	25
4.1 – Linhas de orientação para tratamento de piodermite bacteriana	25
4.1.1 – Recomendações na seleção da antibioterapia para o Médico Veterinário	26
4.2 – Escolhas antibióticas para o tratamento de piodermite bacteriana.....	28
4.2.1 – Classe dos betalactâmicos	28
4.2.1.1 – Grupo das penicilinas.....	28
4.2.1.1.1 – Oxacilina como marcador para resistência à meticilina ...	28
4.2.1.2 – Grupo das penicilinas associadas a inibidores das betalactamases....	30
4.2.1.2.1 – Amoxicilina-ácido clavulânico	30
4.2.1.3 – Grupo das cefalosporinas.....	31
4.2.1.3.1 – Cefalotina.....	31
4.2.2 – Classe das lincosamidas	32
4.2.2.1 – Clindamicina	32
4.2.3 – Classe dos macrólidos	34
4.2.3.1 – Eritromicina	34
4.2.4 – Classe das sulfonamidas.....	35
4.2.4.1 – Trimetoprim-sulfametoxazol	35
4.2.5 – Classe das tetraciclinas.....	37
4.2.5.1 – Tetraciclina	37

4.2.5.2 – Minociclina	40
4.2.6 – Classe das fluoroquinolonas	41
4.2.6.1 – Enrofloxacin	41
4.2.6.2 – Pradofloxacin	43
4.2.7 – Classe dos fenicóis	44
4.2.7.1 – Cloranfenicol.....	44
4.2.8 – Classe das ansamicinas.....	46
4.2.8.1 – Rifampicina.....	46
4.2.9 – Classe dos aminoglicosídeos	48
4.2.9.1 – Gentamicina e amicacina	48
5 – Conceito de multirresistência	50
6 – Objetivos	51
II – MATERIAL E MÉTODOS	52
1 – Proveniência dos isolados e trabalho experimental	52
2 – Determinação da resistência aos antibióticos	52
2.1 – Cultura bacteriana	52
2.2 – Preparação do inóculo	53
2.3 – Espectrofotometria	53
2.3.1 – Contagem bacteriana	53
2.4 – Inoculação das placas de Mueller-Hinton	54
2.5 – Antibiógrama.....	54
2.6 – Leitura dos resultados.....	56
2.7 – Análise estatística.....	57
III – RESULTADOS	58
1 – Resultado da contagem bacteriana	58
2 – Divisão dos isolados em função da resistência à classe dos betalactâmicos.....	58
3 – Resistências aos antibióticos dos isolados de <i>Staphylococcus pseudintermedius</i>	58
3.1 – Resistência aos antibióticos de primeira escolha	59
3.1.1 – Classe dos betalactâmicos	59
3.1.1.1 – Grupo da amoxicilina-ácido clavulânico	59
3.1.1.2 – Grupo das cefalosporinas	59
3.1.3 – Classe das lincosamidas	59

3.1.4 – Classe dos macrólidos	60
3.1.5 – Classe das sulfonamidas	60
3.2 – Resistência aos antibióticos de segunda escolha.....	61
3.2.1 – Classe das tetraciclina.....	61
3.2.2 – Classe das fluoroquinolonas.....	61
3.2.3 – Classe dos fenicóis	62
3.2.4 – Classe das ansamicinas.....	62
3.2.5 – Classe dos aminoglicosídeos	62
4 – Determinação de multirresistências e relação com MRSP e MSSP	64
V – DISCUSSÃO	65
V – CONCLUSÃO.....	72
VI – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	73
APÊNDICE I.....	i

ÍNDICE DE FIGURAS

	Página
Figura 1: Discos de antibióticos testados.	55
Figura 2: Medição do halo da zona de inibição bacteriana	56
Figura 3: Isolado resistente à oxacilina, clindamicina e eritromicina (esquerda) e isolado suscetível aos mesmos antibióticos (direita)	57
Figura 4: Frequência relativa (%) das estirpes MRSP e MSSP	58
Figura 5: Frequência relativa (%) das resistências a antibióticos no grupo MRSP e MSSP.....	63
Figura 6: Frequência relativa (%) dos isolados multirresistentes e não multirresistentes .	64

ÍNDICE DE TABELAS

Página

Tabela 1: Número de isolados resistentes e suscetíveis a antibióticos de primeira escolha nos grupos MRSP e MSSP	61
Tabela 2: Número de isolados resistentes e suscetíveis a antibióticos de segunda escolha nos grupos MRSP e MSSP	63

I – INTRODUÇÃO

1 – Piodermite bacteriana

A piodermite bacteriana é uma infecção cutânea causada por bactérias piogénicas (Sykes, *et al.*, 2014), embora a presença de pus não possa ser utilizada como diagnóstico, já que este pode não ser visível macroscopicamente (Ihrke, 2006).

Esta infecção é uma das causas mais comuns de doença dermatológica canina, sendo rara em gatos e outros animais domésticos (Ihrke, 2006). O ser uma patologia predominantemente canina pode dever-se ao facto de, nestes animais, o estrato córneo ser mais fino e compacto do que em outras espécies, ser escasso em lípidos intracelulares, possuir poucas defesas nos pontos de abertura dos folículos pilosos e apresentar um pH mais elevado (Miller, *et al.*, 2013).

A pele é o maior órgão, efetua inúmeras funções vitais para a manutenção do estado homeostático do corpo, sendo composta pela epiderme e derme. A epiderme forma a camada mais superficial da pele, sendo composta por quatro camadas, da mais profunda para a mais superficial: basal, espinhosa, granulosa e córnea. A derme é o maior componente estrutural da pele, compondo uma matriz de suporte e estabelecendo ligação com a epiderme e os seus anexos. A hipoderme é composta por tecido conjuntivo laxo e encontra-se subjacente à derme, não sendo, no entanto, considerado um constituinte da pele (Junqueira & Carneiro, 2005; Miller, *et al.*, 2013).

A superfície da pele em animais e no Homem é colonizada por bactérias que residem na superfície da epiderme e no infundíbulo dos folículos pilosos (Miller, *et al.*, 2013). A capacidade de colonização da pele depende de vários fatores, incluindo a habilidade das bactérias em aderir aos corneócitos, utilizarem os nutrientes disponíveis que se encontram na pele, resistirem a bactérias competitivas, bem como lidar com forças abrasivas derivadas do hospedeiro (Saijonmaa-Koulumies & Lloyd, 1996).

Staphylococcus pseudintermedius é um importante agente etiológico da piodermite canina, sendo que a vasta maioria dos isolados caninos pertencem a esta espécie (van Duijkeren, *et al.*, 2011). Descrito em 2005, por Devriese e colaboradores, como uma nova espécie de estafilococos, haviam sido anteriormente descritos, com recurso a meios fenotípicos, como *S. intermedius*. A reclassificação como *S. pseudintermedius* foi justificada com base em novas informações resultantes de análises moleculares (Devriese *et al.*, 2005). O grupo *Staphylococcus intermedius* foi, assim, dividido em três aglomerados: *Staphylococcus*

intermedius, *Staphylococcus pseudintermedius* e *Staphylococcus delphini* (Bannoehr *et al.*, 2007).

Assim sendo, foi recentemente sugerido que todos os isolados identificados através de métodos tradicionais sejam considerados *S. pseudintermedius*, a não ser que seja provado o contrário através de análise genômica (Devriese *et al.*, 2009).

A flora residente da pele canina inclui, ainda, *Micrococcus* spp., estreptococos α -hemolíticos, corineformes aeróbios, *Acinetobacter* spp. e outros anaeróbios (Sykes, *et al.*, 2014). O *Staphylococcus schleiferi*, e menos comumente o *Staphylococcus aureus*, podem igualmente estar envolvidos (Frank *et al.*, 2003; Griffeth *et al.*, 2008). Bactérias Gram-negativas como *Pseudomonas aeruginosa*, *Proteus* spp. e *Escherichia coli* também podem ser isoladas em caso de piodermite profunda (Ihrke, 2006; Miller *et al.*, 2013), embora se pense que a sua invasão seja secundária a alterações ambientais causadas por *S. pseudintermedius* (Sykes, *et al.*, 2014), uma vez que infecções causadas por Gram-negativas sem coinfeção estafilocócica é extremamente rara (Ihrke, 2006).

A piodermite resulta, assim, de uma debilitação nos mecanismos de defesa locais, o que permite invasão bacteriana secundária (Sykes, *et al.*, 2014).

As causas dermatológicas subjacentes mais comuns são a dermatite atópica, patologias endócrinas e ectoparasitas, embora uma variedade de outras patologias dermatológicas possam predispor à piodermite (Bloom, 2013; Sykes, *et al.*, 2014).

A classificação da piodermite é baseada na profundidade das lesões. Assim sendo, pode afetar simplesmente a superfície da pele, criando inflamação sem invasão tecidular, pode ser superficial, envolvendo a epiderme e folículos pilosos, ou profunda, comprometendo estruturas da derme e tecido adiposo subjacente (Ihrke, 2006).

A piodermite de superfície acontece quando bactérias proliferam na superfície da pele e incitam uma resposta inflamatória, sem invasão da pele (Sykes *et al.*, 2014). Esta inclui a piodermite de “prega de pele” (intertigo), dermatite piotraumática e piodermite mucocutânea que, normalmente, afeta o Pastor Alemão (Bassett *et al.*, 2004). O sobrecrecimento microbiano também foi, recentemente, descrito como piodermite de superfície, aquando do envolvimento de bactérias (Ihrke, 2006; Sykes *et al.*, 2014).

Na piodermite superficial, existe infeção bacteriana nas camadas superficiais da epiderme, que se encontram imediatamente abaixo da camada córnea e da porção do folículo piloso acima do ducto sebáceo (o *infundibulum*) (Sykes *et al.*, 2014). É o tipo mais comum de

piodermite e compreende a foliculite bacteriana superficial, piodermite esfoliativa e “*puppy pyoderma*” (também denominado de impetigo ou dermatite pustular juvenil).

A piodermite profunda ocorre devido a uma infecção profunda dentro do folículo piloso, com ou sem rutura do mesmo (furunculose). O Pastor Alemão parece propenso a uma forma mais severa e extensa de piodermite profunda (Rosser Jr., 2006). Outros exemplos incluem foliculite e furunculose podal, piodermite das zonas de pressão, foliculite e furunculose piotraumáticas e foliculite e furunculose (acne canino) do focinho.

Por vezes, a apresentação clínica não é óbvia, não sendo possível classificar a piodermite pela sua aparência típica. Por exemplo, a foliculite bacteriana superficial pode manifestar-se apenas como uma alopecia desigual e aparência de mordedura de traça em cães de pelo curto como os Boxers (Gortel, 2013). Em cães com pelagem sedosa, como o Yorkshire Terrier, uma diminuição da espessura do pelo em algumas localizações pode ser a única alteração (Morris, 2011). Bulldogs Ingleses, por vezes, desenvolvem unicamente zonas de alopecia com hiperqueratose marcada (Miller *et al.*, 2013).

1.1 – Abordagem diagnóstica

O diagnóstico da piodermite bacteriana é realizado com base na anamnese, exame físico e exames diagnósticos adicionais (Gortel, 2013).

É importante a realização de raspagens profundas para descartar possível demodicose (Hillier *et al.*, 2014; Sykes *et al.*, 2014). A demodicose, além de apresentar sintomatologia semelhante, pode ainda ser uma causa predisponente para piodermite bacteriana (Ihrke, 2006).

O exame citológico é simples, económico e constitui um meio auxiliar de diagnóstico importante (Gortel, 2013). Este deve ser realizado por aposição direta de pústulas ou locais de drenagem, sendo que a presença de neutrófilos degenerados e *coccus* intracelulares apoiam o diagnóstico (Ihrke, 2006; Hillier *et al.*, 2014;). A realização de citologia é, também, importante para descartar infecção por *Malassezia pachydermatis* (Hillier *et al.*, 2014; Sykes *et al.*, 2014).

A biópsia de pele pode ser um valioso método de diagnóstico, quando realizado convenientemente (Ihrke, 2006).

A cultura bacteriana e a avaliação de suscetibilidade antibiótica estão indicadas quando se suspeita de infecção mista, previamente determinada por citologia, se a terapia antibiótica empírica não for bem-sucedida ou em casos de piodermite recorrente ou refratária (Ihrke, 2006;

Gortel, 2013). Devem ser recolhidas amostras de pústulas intactas, pápulas, colaretos epidérmicos ou bolhas hemorrágicas intactas (Ihrke, 2006; Hillier *et al.*, 2014).

2 – *Staphylococcus pseudintermedius*

2.1 – Características gerais

O género *Staphylococcus* (do grego σταφυλή, *staphylē*, "uva" e κόκκος, *kókkos*, "granulo") é constituído por bactérias Gram-positivas, com um tamanho entre 0,8 a 1 µm e de aspeto microscópico semelhante a cachos de uvas. É classificado em 49 espécies e 26 subespécies, baseando-se esta classificação em diferenças genótípicas e considerando o seu habitat e processo patogénico. Estas são bactérias mesófilas, ou seja, possuem uma temperatura de crescimento ótimo perto dos 35-37°C, são fermentadoras de hidratos de carbono, aeróbias ou anaeróbias facultativas, catalase positivas e não apresentam motilidade nem esporulação (Quinn *et al.*, 2002; Bond & Loeffler, 2012). Estes microrganismos crescem rapidamente na maioria dos meios nutritivos ou de enriquecimento após 24 horas de incubação, produzindo colónias redondas, lisas, elevadas e brilhantes, com cerca de 1 a 2 mm e com uma coloração que varia entre branco-acinzentado e amarelado. De acordo com a sua capacidade em coagular o citrato no soro, transformando a fibrina em fibrinogénio, e para o qual é necessária a enzima coagulase, dividem-se, ainda, em coagulase positivos e negativos (Bond & Loeffler, 2012). Os estafilococos coagulase positivos incluem *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus pseudintermedius*, *Staphylococcus intermedius*, *Staphylococcus delphini*, *Staphylococcus schleiferi* subespécie *coagulans*, *Staphylococcus hyicus* e *Staphylococcus lutrae*. As restantes espécies do género são classificadas como coagulase negativas (Quinn *et al.*, 2002).

2.2 – Taxonomia

S. intermedius foi descrito pela primeira vez em 1976 por V. Hajeck, tendo sido isolado de pombos, cães, martas e cavalos, permitindo uma importante distinção entre *S. aureus* e a nova espécie (Hajeck, 1976; Devriese *et al.* 2009; Bannoehr & Guardabassi, 2012; Bond & Loeffler, 2012). Apesar de Hajeck ter observado algum grau de heterogeneidade entre as estirpes que descreveu como *S. intermedius*, o nome da espécie permaneceu incontestado e não investigado até ter sido descrito como *S. pseudintermedius* por Devriese *et al.* em 2005.

Isolados fenotipicamente descritos como *S. intermedius* são diferenciados em três espécies estreitamente relacionadas: *S. intermedius*, *S. pseudintermedius* e *S. delphini*, compondo assim o grupo *Staphylococcus intermedius* (SIG, do inglês *Staphylococcus intermedius group*) (Bannoehr *et al.* 2007; Sasaki *et al.*, 2007b).

Assim devido à falta de testes fenotípicos fiáveis e testes comerciais disponíveis, a identificação de rotina de *S. pseudintermedius* em laboratórios de diagnóstico baseia-se no facto de outras espécies do grupo SIG serem virtualmente inexistentes no cão. Desta forma, tem sido proposto que todos os isolados caninos sejam definidos como *S. pseudintermedius*, a não ser que comprovado o contrário através de genotipagem (Fitzgerald, 2009; Bannoehr & Guardabassi, 2012).

Sasaki *et al.* (2007b), num estudo realizado no Japão, recorrendo a métodos moleculares, obtiveram resultados que sugerem que a maioria das estirpes SIG isoladas da flora comensal ou de locais de infeção em cães devem ser reclassificadas como estirpes de *S. pseudintermedius*. Bannoehr *et al.* (2007) chegaram a uma conclusão semelhante na Europa, sendo consensual que, *S. pseudintermedius*, e não *S. intermedius*, é a causa mais comum de piodermite bacteriana em cães.

2.3 – Epidemiologia

Em cães saudáveis, *S. pseudintermedius*, compõe parte da microflora cutânea normal, colonizando a pele, folículos pilosos e, particularmente, regiões mucocutâneas, como o nariz, boca e ânus (Allaker *et al.*, 1992a; Bannoehr & Guardabassi, 2012). Este adere às células epidérmicas da pele de cães saudáveis, no entanto parece demonstrar maior adesão para as de cães atópicos, possuindo estes maior taxa de colonização (Simou *et al.*, 2005; McEwan *et al.*, 2006; Fazakerley *et al.*, 2009). A pele de cachorros é colonizada por *Staphylococcus* spp. pouco tempo após o parto, provavelmente como resultado de transmissão vertical pela progenitora, com uma taxa de colonização relativamente elevada (Allaker *et al.*, 1992b; Saijonmaa-Koulumies & Lloyd, 2003; Paul *et al.*, 2014)

É importante conhecer os locais comuns de infeção, já que colheitas em localizações irrelevantes podem conduzir a falsos negativos, uma subestimação da sua prevalência, bem como aumento do número de culturas bacterianas o que resulta em maior despesa e perda de tempo (Rubin & Trejo, 2011).

S. pseudintermedius constitui cerca de 90% dos estafilococos isolados de cães saudáveis portadores e com doença dermatológica subjacente (Griffeth *et al.*, 2008; Fazakerley *et al.*, 2009; Bannoehr & Guardabassi, 2012). Griffeth *et al.* (2008) conduziram um estudo em 50 cães saudáveis e 59 cães com inflamação cutânea, onde analisaram, por cultura bacteriana, zaragatoas recolhidas de cinco locais. Estes autores concluíram que 68% dos animais saudáveis (34/50) estavam colonizados com *S. pseudintermedius*. Pinchbeck *et al.* (2006) descreveram, ainda, que mais de 94% de *S. pseudintermedius* isolados de lesões dermatológicas de cães com piodermite eram geneticamente idênticos aos isolados recolhidos dos locais de colonização.

Na Dinamarca, Paul e colaboradores (2012) realizaram um estudo em 119 cães saudáveis na Dinamarca tendo observado que a combinação de zaragatoas da mucosa bucal e períneo permite a deteção de aproximadamente 90% dos portadores saudáveis e aumenta a probabilidade da sensibilidade de deteção de portadores em 25% (períneo) e 26% (mucosa bucal) em comparação com a análise de uma única localização.

Além de estar na origem da piodermite canina, *S. pseudintermedius* está, ainda, associado a otite, infeções de feridas e do trato urinário inferior, podendo, no entanto, estar também envolvido em outros tipos de infeções adquiridas (Tse *et al.*, 2011; Bannoehr & Guardabassi, 2012).

Infeções nosocomiais de feridas cirúrgicas em cães e gatos também se encontram descritas, alertando para o risco de transmissão nosocomial de *Staphylococcus pseudintermedius* resistentes à meticilina (MRSP, do inglês *methicillin-resistant Staphylococcus pseudintermedius*) em ambiente hospitalar e enfatizando a necessidade de boas práticas de higiene (Weese & van Duijkeren, 2010).

S. pseudintermedius raramente coloniza a pele de humanos, no entanto, em indivíduos com contacto regular com cães a taxa de colonização aumenta (Guardabassi *et al.*, 2004). Este é considerado um patógeno zoonótico, sendo que infeção pode ocorrer através de ferida por mordida (Tanner *et al.*, 2000). Em 2006, foi identificado o primeiro caso de infeção por *S. pseudintermedius* num humano (Van Hoovels *et al.*, 2006). Sasaki *et al.* (2007b) descreveram, também, a identificação de duas estirpes em humanos como pertencendo a *S. intermedius*, previamente à nova reclassificação.

2.4 – Emergência da resistência à metilicina

No passado, a maioria das infecções causadas por *S. pseudintermedius* em cães eram tratadas com sucesso, com antibioterapia empírica ou baseada em testes de suscetibilidade (Bond & Loeffler, 2012).

A multirresistência, ou seja, resistência a, pelo menos, três classes antibióticas era algo extremamente raro, pelo menos na Europa (Lloyd *et al.*, 1996; Guardabassi *et al.*, 2004; Coombs *et al.*, 2006; Schwarz *et al.*, 2010; Bond & Loeffler, 2012).

A metilicina, um antibiótico semissintético derivado da penicilina, pertencente à classe dos betalactâmicos, foi introduzida em 1959 para combater estafilococos produtores de betalactamases resistentes à penicilina. Pouco tempo depois, estirpes de *Staphylococcus aureus* resistentes à metilicina (MRSA, do inglês *Methicillin-resistant Staphylococcus aureus*) foram isoladas, principalmente em ambiente hospitalar. A resistência à metilicina reflete a expressão do gene *mecA* que codifica uma proteína de ligação à penicilina (PBP2a, do inglês *Penicillin Binding Protein*) cuja baixa afinidade para antibióticos betalactâmicos torna penicilinas e cefalosporinas ineficazes (Loeffler *et al.*, 2007; Bond & Loeffler, 2012). O gene *mecA* encontra-se localizado na cassete cromossômica estafilocócica *mec* (SCC*mec*, do inglês *Staphylococcal Cassette Chromosome mec*), um elemento genético móvel de grandes dimensões. Este mecanismo, bem como outros determinantes genéticos adicionais que serão posteriormente descritos, conferem, frequentemente, resistência concomitante a outros antibióticos clinicamente relevantes (Fitzgerald, 2009; Bond & Loeffler, 2012; Perreten *et al.*, 2013).

A aquisição do SCC*mec* por estirpes de *S. pseudintermedius* levou à dramática emergência de MRSP pela Europa, particularmente entre 2005 a 2006 (Loeffler *et al.*, 2007; Schwarz *et al.*, 2008; Perreten *et al.*, 2010; Bond & Loeffler, 2012).

Apesar da resistência à metilicina em estafilococos não estar sempre associada a multirresistência, a maioria dos MRSP descritos na literatura apresentam resistência à maioria dos antibióticos clinicamente relevantes (Bond & Loeffler, 2012). O clone dominante de MRSP na Europa, *sequence type* (ST)71, é, normalmente, resistente aos betalactâmicos, aminoglicosídeos, macrólidos, lincosamidas, tetraciclina, cloranfenicol, trimetoprim e fluoroquinolonas e suscetível apenas à ampicilina, ácido fusídico, rifampicina, vancomicina, teicoplanina e linezolida, limitando assim as opções terapêuticas do Médico Veterinário (Bond & Loeffler, 2012; Frank & Loeffler, 2012; Perreten *et al.*, 2013).

2.5 – Fatores de risco para colonização e infecção

Apesar de não existirem muitos estudos no que diz respeito a fatores de risco para colonização e infecção em *S. pseudintermedius*, cães com infecções por MRSP teriam sido tratados com antibióticos previamente ao aparecimento de infecção. Tal indica que a utilização de antibióticos constitui um fator de risco para infecções por MRSP (Sasaki *et al.*, 2007a; van Duijkeren *et al.*, 2011).

Hospitalização e tratamento antibiótico prévios também estão associados a colonização por MRSP em cães admitidos à clínica (Nienhoff *et al.*, 2011).

Uma vez que infecções de feridas cirúrgicas são, frequentemente, causadas por MRSP, intervenções cirúrgicas são consideradas potenciais fatores de risco (Międzybrodzki *et al.*, 2010; van Duijkeren *et al.*, 2011).

3 – Métodos para determinação de resistência a antibióticos

O desenvolvimento de resistências bacterianas resultou numa necessidade premente de testar os agentes patogénicos contra variadas concentrações de determinados antibióticos, por forma a determinar a suscetibilidade ou resistência aos mesmos (Hudzicki, 2013).

Existem inúmeros métodos laboratoriais que permitem a determinação de suscetibilidade e resistência, sendo que, de entre os mais utilizados, se encontram os métodos de microdiluição em caldo, de gradiente antimicrobiano, de difusão em disco, entre outros métodos automatizados (Jorgensen & Ferraro, 2009).

Os testes de suscetibilidade são, assim, métodos padronizados utilizados para avaliar a eficácia de antibióticos e outros agentes antibacterianos em organismos patogénicos (Leboffe & Pierce, 2011).

De um modo geral, os métodos atualmente disponíveis fornecem uma informação precisa no que concerne a deteção de mecanismos de resistência, constituindo ferramentas essenciais para a determinação de uma abordagem terapêutica adequada.

3.1 – Teste de suscetibilidade de Kirby-Bauer por difusão em disco

O método original para determinação de suscetibilidade, baseada em métodos de diluição em caldo, apesar de atualmente ser considerado o método de eleição, é bastante

moroso, o que levou ao desenvolvimento do procedimento de difusão em disco (Hudzicki, 2013).

No início dos anos 50, a maioria dos laboratórios de microbiologia clínica nos Estados Unidos tinham adotado o método de difusão em disco para determinar a suscetibilidade de bactérias a antibióticos. Tendo cada laboratório adaptado os procedimentos às suas próprias necessidades, inúmeros investigadores publicaram variações do mesmo, resultando, assim, em múltiplos protocolos e numa falha de uniformidade (Hudzicki, 2013).

Em 1956, W.M.M. Kirby e colegas da *University of Washington School of Medicine and the King County Hospital* propuseram um único método para análise de suscetibilidade a antibióticos de forma a consolidar todas as variantes num único método (Winn Jr. *et al.*, 2006).

A ausência de um método padronizado para determinação da suscetibilidade bacteriana por difusão em disco permaneceu um problema durante o início dos anos 60, levando Kirby e o seu colega A.W. Bauer a realizarem uma revisão exaustiva da literatura existente. Os resultados publicados levaram a Organização Mundial de Saúde (OMS) a desenvolver em 1961 um procedimento padrão para o teste de suscetibilidade por difusão em disco, denominado, a partir desse momento, de teste de suscetibilidade de Kirby-Bauer por difusão em disco (Winn Jr. *et al.*, 2006).

Atualmente, o *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI) é responsável por atualizar e modificar o procedimento original de Kirby e Bauer, através de um processo de consenso (Hudzicki, 2013).

O teste de suscetibilidade de Kirby-Bauer por difusão em disco tem como propósito determinar a suscetibilidade ou resistência de patógenos aeróbios ou bactérias anaeróbias facultativas a vários compostos antibióticos, por forma a auxiliar na seleção de opções de tratamento (Leboffe & Pierce, 2011; Hudzicki, 2013).

A bactéria considerada patogénica é cultivada em meio de agar Mueller-Hinton, na presença de vários discos de papel de filtro de 6 mm impregnados com vários tipos de antibióticos (Hudzicki, 2013).

À medida que o antibiótico difunde através do agar, é estabelecido um gradiente de concentração, sendo que, quando o organismo é suscetível ao mesmo, uma zona mais clara surge em redor do disco onde ocorreu inibição do crescimento (Leboffe & Pierce, 2011). O crescimento bacteriano ocorre na presença do princípio ativo quando a bactéria atinge o ponto de massa crítica e consegue ultrapassar o efeito inibidor do mesmo (Winn Jr. *et al.*, 2006; Hudzicki, 2013). O tempo que a bactéria demora a atingir a massa crítica varia de acordo com

a estirpe, meio e temperatura de incubação (Winn Jr. *et al.*, 2006; Hudzicki, 2013). O ponto em que uma bactéria atinge a massa crítica é apresentado através de uma margem circular, bem demarcada por crescimento bacteriano em torno do disco (Hudzicki, 2013). A concentração de antibiótico nesta margem é denominada de concentração crítica (Winn Jr. *et al.*, 2006). O tamanho da zona de inibição depende da suscetibilidade da bactéria ao agente em específico e o ponto em que a concentração mínima inibitória (CMI) é atingida (Leboffe & Pierce, 2011). A espessura do agar é, também, um fator que determina o tamanho da zona de inibição, já que o princípio ativo se difunde em três dimensões, uma camada mais fina irá produzir uma maior zona de inibição do que uma camada mais espessa (Winn Jr. *et al.*, 2006; Hudzicki, 2013).

A presença ou ausência de crescimento em redor dos discos é um meio indireto de mensuração da capacidade que esse antibiótico possui para inibir o crescimento (ação bacteriostática) sobre a bactéria em teste (Hudzicki, 2013).

Os resultados obtidos através deste método são, assim, do tipo qualitativo, em que a categoria de suscetibilidade (suscetível, intermédio ou resistente) advém do teste ao invés do valor de CMI (Jorgensen & Ferraro, 2009).

As vantagens deste método consistem na simplicidade do mesmo, na não necessidade de equipamento especializado, na obtenção de resultados categóricos facilmente interpretados pelo clínico e na flexibilidade da seleção dos discos de antibióticos selecionados. Este é, ainda, o método para determinação de suscetibilidade menos dispendioso. Como desvantagens apresenta a falta de mecanização e automatização e o facto de nem todas as bactérias fastidiosas ou de crescimento lento poderem ser testadas com precisão (Jorgensen & Ferraro, 2009).

3.2 – Concentração mínima inibitória

A concentração mínima inibitória é definida como a concentração mínima a que uma substância irá inibir o crescimento visível de um organismo em testes de suscetibilidade *in vitro* e após uma incubação de 24 horas (Andrews, 2001).

A CMI é considerada o método de eleição para determinação de suscetibilidade de microrganismos e, por conseguinte, utilizado para avaliar o desempenho de todos os outros métodos de análise de suscetibilidade (Andrews, 2001).

Esta técnica é, ainda, utilizada para que os laboratórios de diagnóstico confirmem resistências pouco comuns e ofereçam uma resposta definitiva quando um resultado

inconclusivo é obtido por outros métodos, ou quando métodos por difusão em disco não são apropriados (Andrews, 2001).

A vantagem desta técnica advém da obtenção de um resultado quantitativo. A principal desvantagem do método de macrodiluição prende-se com a morosidade da preparação das soluções antibióticas para cada teste, da possibilidade de erro na preparação das mesmas e da grande quantidade de reagentes e espaço exigido para cada análise (Jorgensen & Ferraro, 2009).

A miniaturização desta técnica, utilizando um pequeno dispositivo de plástico denominado de placa de microdiluição, tornaram os testes de diluição em caldo práticos e populares (Jorgensen & Ferraro, 2009).

As vantagens da técnica de microdiluição incluem a geração de CMI's, a reprodutibilidade, bem como a conveniência de ter painéis preparados, economia de reagentes e necessidade de um espaço reduzido. A principal desvantagem deste método resulta de alguma inflexibilidade na seleção dos princípios ativos disponíveis nos painéis comercializados (Jorgensen & Ferraro, 2009).

4 – Antibioterapia

4.1 – Linhas de orientação para tratamento de piodermite bacteriana

As linhas de orientação para o diagnóstico e tratamento da foliculite bacteriana superficial canina foram desenvolvidas entre 2011 e 2013 pelo *Antimicrobial Guidelines Working Group* da *International Society for Companion Animal Infectious Disease* (ISCAID). Estas linhas de orientação foram estabelecidas devido à crescente preocupação em relação ao aumento de resistências antibióticas verificada nos últimos anos em *S. pseudintermedius* como agente patógeno na foliculite bacteriana.

É importante salientar que estas linhas de orientação foram desenvolvidas especificamente para o diagnóstico e tratamento de piodermite bacteriana superficial, sendo apenas aplicáveis a cães e, primariamente, direcionadas para ajudar o Médico Veterinário de animais de companhia, em clínica de primeira opinião (Hillier *et al.*, 2014).

Apesar dos princípios gerais relacionados com a utilização de antibióticos na piodermite bacteriana superficial poderem ser aplicáveis a uma variedade de infeções bacterianas dermatológicas caninas, existem diferenças significativas entre as mesmas, o que pode estar associado com a profundidade da infeção e o agente patogénico envolvido. Estas

linhas de orientação não devem, assim, ser aplicadas a outros tipos de infeções sem uma consideração cuidada de cada caso clínico (Hillier *et al.*, 2014).

Quando possível, deve recorrer-se a laboratórios que cumpram protocolos estabelecidos e cujos resultados sejam interpretados de acordo com os valores recomendados pelo *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI), incluindo o subcomité *Veterinary Antimicrobial Susceptibility Testing* (CLSI-VAST), ou o *European Committee on Antimicrobial Suscetibility Testing* (EUCAST) e outras organizações públicas reconhecidas a nível internacional (Hillier *et al.*, 2014).

Segundo as linhas de orientação, os seguintes antibióticos devem ser testados em todos os isolados de estafilococos: eritromicina, clindamicina, tetraciclina (para testar suscetibilidade à doxiciclina), trimetoprim-sulfametoxazol, gentamicina, cefalotina (ou cefazolina, representando cefalosporinas de primeira geração), cefpodoxime (representando cefalosporinas de terceira geração; no entanto, este antibiótico não se encontra à venda em Portugal), amoxicilina-ácido clavulânico, oxacilina (para avaliação da resistência à meticilina) e enrofloxacina (para avaliar a suscetibilidade às fluoroquinolonas). A inclusão de outras fluoroquinolonas pode ser considerada se a enrofloxacina não for a fluoroquinolona de escolha. Se for determinada resistência à eritromicina, na presença de suscetibilidade à clindamicina, deve ser realizado o *D-test* (ou métodos moleculares para deteção de genes *erm*) para determinar a probabilidade de ocorrência de resistência induzível. Antibióticos adicionais que possam ser relevantes para o tratamento de infeções com estafilococos resistentes à meticilina incluem ainda: amicacina, cloranfenicol, minociclina e rifampicina (Hillier *et al.*, 2014).

4.1.1 – Recomendações na seleção da antibioterapia para o Médico Veterinário

A seleção de antibióticos sistémicos deve basear-se na disponibilidade, segurança, custo, prevalência local de estafilococos resistentes e fatores específicos do animal, como, por exemplo, doença concomitante, administração de outros fármacos, reações a medicações prévias, entre outros (Hillier *et al.*, 2014).

É exequível a utilização de dados anteriormente publicados no que concerne a eficácia antibiótica para tratamento de piodermite canina, bem como dados acerca da suscetibilidade do grupo SIG, por forma a estimar a probabilidade de sucesso no tratamento de infeções estafilocócicas de pele com diferentes antibióticos. Deste modo, é possível classificá-los em antibióticos de primeira, segunda e terceira escolha (Beco *et al.*, 2013).

Opções para um antibiótico apropriado para tratamento empírico de foliculite bacteriana superficial, quando não estão presentes fatores de risco para desenvolvimento de resistência antibiótica, encontram-se reunidas no grupo de primeira escolha. Os antibióticos de primeira escolha englobam a clindamicina ou lincomicina, cefalosporinas de primeira geração, como a cefalexina ou cefadroxil, amoxicilina-ácido clavulânico e sulfonamidas potenciadas pelo trimetoprim ou ormetoprim (Hillier *et al.*, 2014). Em casos de foliculite de primeira ocorrência, apesar da abordagem poder ser empírica, pode-se considerar a cultura e o antibiograma antes de iniciar o tratamento.

Os antibióticos de segunda escolha devem ser utilizados, apenas, quando os de primeira escolha e tratamento tópico não são apropriados, bem como quando os resultados da cultura e suscetibilidade indicam suscetibilidade aos mesmos (Hillier *et al.*, 2014). Estes antibióticos não são apropriados para tratamento empírico (Authier *et al.*, 2006). Este grupo abrange a doxiciclina ou minociclina, o cloranfenicol, as fluoroquinolonas (como enrofloxacin, marbofloxacin, orbifloxacin, pradofloxacin e ciprofloxacin), que devem apenas ser utilizadas quando outras opções praticáveis não se encontrem disponíveis, a rifampicina e os aminoglicosídeos (incluindo gentamicina e amicacina) (Hillier *et al.*, 2014). Podem, ainda, ser considerados como primeira ou segunda escolha as cefalosporinas de terceira geração, como a cefovecina e cefpodoxime, uma vez que não houve consenso na categorização destes antibióticos. Estas cefalosporinas são de largo espectro e, também, eficazes contra as bactérias Gram-negativas, quando em comparação com as cefalosporinas de primeira geração (Hillier *et al.*, 2014).

A utilização de antibióticos de terceira escolha é fortemente desencorajada mesmo face a suscetibilidade, incluindo-se nesse grupo a linezolida, teicoplanina e vancomicina (Hillier *et al.*, 2014). Do ponto de vista ético, o uso destes antibióticos hospitalares deverá ser exclusivo para o tratamento de infecções graves por *S. aureus* resistentes à meticilina em humanos.

Teoricamente, seria ideal se a comunidade veterinária tivesse acesso a uma seleção de antibióticos para terapia empírica de baixo espectro, especificamente classificados para tratamento de foliculite bacteriana superficial canina e a que a maioria dos isolados de *S. pseudintermedius* ainda fosse suscetível. Infelizmente, esta é uma rara possibilidade, dado que, em alguns países, os antibióticos regularmente utilizados não possuem rótulo, poucos dos mais usados são de baixo espectro, muitos dos que estão registados e aprovados para tratamento de foliculite bacteriana superficial canina estão associados à ocorrência de infecções multirresistentes, e existe uma variabilidade geográfica na suscetibilidade do *S.*

pseudintermedius a muitos dos antibióticos disponíveis (Authier *et al.*, 2006; Frank *et al.*, 2012). Assim sendo, as linhas de orientação enfatizam o uso responsável dos antibióticos e recomendam fortemente o recurso à cultura bacteriana e antibiograma como um dos fatores determinantes da eficácia no tratamento das infecções multirresistentes.

Atualizações regulares acerca dos padrões de suscetibilidade aos antibióticos utilizados em Medicina Veterinária tornam-se, assim, imprescindíveis por forma a evitar o desenvolvimento e propagação de resistência antibiótica, particularmente no emergente *S. pseudintermedius* resistente à meticilina (Authier *et al.*, 2006, Beco *et al.*, 2013, Hillier *et al.*, 2014).

4.2 – Escolhas antibióticas para o tratamento de piodermite bacteriana

4.2.1 – *Classe dos betalactâmicos*

4.2.1.1 – Grupo das penicilinas

4.2.1.1.1 – Oxacilina como marcador para resistência à meticilina

Em 1928, Alexander Fleming observou que um bolor, do género *Penicillium*, contaminando uma placa de Petri colonizada por estafilococos, se encontrava rodeado por uma zona distinta sem crescimento bacteriano. Foi então demonstrado que *Penicillium* produzia uma poderosa substância antibacteriana, relativamente não tóxica para animais, mas ativa contra uma variedade de bactérias Gram-positivas, tendo sido denominada de penicilina. Assim foi isolada a Penicilina G, uma penicilina natural, introduzida em 1940 para uso clínico, tendo sido considerada o princípio ativo mais poderoso da altura e primeiro antibiótico introduzido na medicina (Riviere & Papich, 2009; Prescott, 2013a). Pouco tempo após a sua introdução, foi adquirida resistência por parte de *S. aureus* através de uma enzima, a betalactamase, que hidrolisa o anel betalactâmico constituinte das penicilinas. Na tentativa de contornar este problema foi desenvolvido, em 1959, um betalactâmico sintético de curto espectro pertencente ao grupo das penicilinas, a meticilina. Estirpes de *S. aureus* resistentes à meticilina foram identificadas imediatamente após a introdução da mesma na prática clínica, e os primeiros surtos surgiram na Europa em inícios dos anos 60 (Chambers, 1997; Duquette & Nuttall, 2004; Bond & Loeffler, 2012). Apesar de já não ser comercializada, o termo “resistente à meticilina” permanece para descrever estirpes de estafilococos resistentes às betalactamases.

A metilina faz então parte do grupo das penicilinas antiestafilocócicas, onde também se inclui a oxacilina, fazendo esta última parte do subgrupo das penicilinas isoxazolil (Riviere & Papich, 2009). Apesar deste grupo ser representado pela metilina, é recomendado pelo CLSI que a oxacilina, devido à sua maior estabilidade, seja utilizada como substituto para detetar resistência *in vitro*, sendo um indicador valioso para a extensa resistência aos antibióticos betalactâmicos em laboratórios de diagnóstico (Duquette & Nuttall, 2004; Jones *et al.*, 2007; Loeffler *et al.*, 2007; Bemis, 2009; Riviere & Papich, 2009; Frank & Loeffler, 2012).

As penicilinas antiestafilocócicas possuem atividade contra vários estafilococos produtores de betalactamases, contra outras bactérias Gram-positivas e atividade limitada contra Gram-negativas e espiroquetas (Riviere & Papich, 2009).

Além das penicilinas, seus derivados, e cefalosporinas, os betalactâmicos mais utilizados, encontram-se ainda nesta classe os grupos dos inibidores das betalactamases, os carbapenems e monobactams (Mealey, 2001; Riviere & Papich, 2009).

As penicilinas são então consideradas bactericidas tempo-dependentes, exercendo o seu efeito ao prevenirem a transpeptidação da síntese da parede celular bacteriana e desregularem a integridade celular bacteriana (Riviere & Papich, 2009; Prescott, 2013a).

Existem três mecanismos de resistência a antibióticos betalactâmicos distintos: diminuição da penetração através da membrana celular externa por forma a aceder às enzimas da parede celular, produção de betalactamases e resistência das PBP's à ligação por betalactâmicos (Riviere & Papich, 2009).

A produção de betalactamases, codificada pelo gene *blaZ*, é o principal mecanismo de resistência, sendo que algumas são específicas para penicilinas, as penicilinasases, outras para cefalosporinas, as cefalosporinasases, sendo que existem ainda betalactamases com afinidade para ambas (Mealey, 2001; Riviere & Papich, 2009). Os genes que codificam as betalactamases ocorrem através de mutação cromossômica ou por transferência por plasmídeos ou transposões, podendo ser transmitidas para outras bactérias (Mealey, 2001; Riviere & Papich, 2009; Prescott, 2013a). Existem ainda betalactamases especificamente produzidas por estafilococos coagulase positivos e algumas estirpes coagulase negativas. Estas enzimas normalmente não inativam cefalosporinas e penicilinas antiestafilocócicas, mas podem ser inibidas por inibidores de betalactamases como o ácido clavulânico (Riviere & Papich, 2009).

A resistência à metilina em *S. pseudintermedius* é, normalmente, caracterizada pela presença do gene *mecA*, que confere resistência tanto à metilina, como para todos os outros antibióticos betalactâmicos, incluindo penicilinas, cefalosporinas e carbapenems (Loeffler *et*

al., 2007; Riviere & Papich, 2009; Frank & Loeffler, 2012). O gene *mecA* encontra-se localizado na *SCCmec*, um elemento genético móvel de grandes dimensões (Descloux *et al.*, 2008; Bond & Loeffler, 2012).

Os locais de ligação dos betalactâmicos são denominados de PBP's, sendo estas enzimas constituintes da parede celular. Podem existir entre duas a oito PBP's, numeradas de acordo com o seu peso molecular. As PBP's mais afetadas pelos betalactâmicos são as PBP1, 2 e 3. O gene *mecA* codifica uma PBP alterada, a PBP2a, proteína esta que resiste à ligação dos antibióticos betalactâmicos e torna a bactéria que contém este gene resistente. A PBP2a é a base de resistência à meticilina e oxacilina (Riviere & Papich, 2009; Weese & van Duijkeren, 2010; Perreten *et al.*, 2013). Se um estafilococo apresentar resistência fenotípica à meticilina, é considerado um marcador para resistência aos betalactâmicos mediada pelo gene *mecA* (Riviere & Papich, 2009).

4.2.1.2 – Grupo das penicilinas associadas a inibidores das betalactamases

4.2.1.2.1 – Amoxicilina-ácido clavulânico

A amoxicilina é uma penicilina semissintética, pertencente ao subgrupo das aminopenicilinas. Este antibiótico penetra a camada superficial de algumas bactérias Gram-negativas e o seu espectro de atividade é assim mais largo que o das penicilinas naturais. No entanto, resistência adquirida é comum de ocorrer, sendo este grupo suscetível às betalactamases (Riviere & Papich, 2009).

Nos anos 50 foi identificada a capacidade da cefalosporina C em inibir uma betalactamase produzida por *Bacillus cereus*. O resultado de vários estudos foi a identificação em 1972 do primeiro, clinicamente útil, inibidor das betalactamases, o ácido clavulânico, produto da fermentação de *Streptomyces clavuligerus* (Mealey, 2001; Toussaint & Gallagher, 2015).

Assim sendo, por forma a ultrapassar a resistência às betalactamases, inibidores das mesmas foram combinados com aminopenicilinas, aumentando assim o seu espectro (Mealey, 2001; Riviere & Papich, 2009; Prescott, 2013a; Toussaint & Gallagher, 2015). Em 1981, a combinação de amoxicilina e ácido clavulânico começou a ser comercializada na Europa, sendo que, até hoje, o ácido clavulânico é o único inibidor das betalactamases disponível em formulação oral (Toussaint & Gallagher, 2015).

Os inibidores das betalactamases ligam-se à enzima bacteriana de forma irreversível, formando um complexo enzimático inativo e possibilitando que o antibiótico coadministrado, neste caso a amoxicilina, exerça o seu efeito antibacteriano (Mealey, 2001; Riviere & Papich, 2009; Toussaint & Gallagher, 2015).

A fórmula veterinária possui um rácio fixo de 4:1 de amoxicilina e ácido clavulânico respetivamente, mas, devido à reduzida absorção deste último, o rácio *in vivo* pode ser bastante variável e até 20:1 (Mealey, 2001; Riviere & Papich, 2009).

A posologia atualmente recomendada para a amoxicilina-ácido clavulânico é de 12,5-25 mg/kg *per os* BID (Hillier *et al.*, 2004).

Stegemann & Sherington (2007) referem uma taxa de eficácia de tratamento de piodermite superficial e profunda de 92,5% com amoxicilina-ácido clavulânico, administrada na dose recomendada e durante 28 dias.

Possíveis efeitos secundários incluem alterações gastrointestinais, como vómitos e diarreia, menos marcados com a administração de amoxicilina isolada, uma vez que esta é melhor absorvida. O risco de reação alérgica, ou reação anafilática, são também efeitos adversos transversais a todos os betalactâmicos (Mealey, 2001; Prescott, 2013a).

4.2.1.3 – Grupo das cefalosporinas

4.2.1.3.1 – Cefalotina

Em 1945 foi isolada, por Giuseppe Brotzu, a primeira cefalosporina a partir do fungo *Cephalosporium acremonium*, recolhido de um esgoto na ilha italiana de Sardenha, a cefalosporina C. Em 1962, a primeira cefalosporina tornou-se disponível para uso clínico (Riviere & Papich, 2009).

As cefalosporinas são derivados semissintéticos da cefalosporina C e classificam-se em primeira, segunda, terceira e quarta geração, sendo esta classificação baseada no seu espetro de atividade (Riviere & Papich, 2009; Prescott, 2013b).

A primeira geração possui atividade contra a maioria das bactérias Gram-positivas, exceto enterococos, e inclui estafilococos produtores de betalactamases. A segunda geração possui maior atividade contra Gram-negativas resistentes às de primeira geração, provavelmente atribuída a maior resistência às betalactamases, mas não possuem melhor atividade contra Gram-positivas. As cefalosporinas de terceira geração, por sua vez, possuem

uma maior atividade contra bactérias Gram-negativas do que as gerações anteriores, mas, de forma geral são menos ativas contra Gram-positivas. No entanto, existe alguma variabilidade quanto à atividade contra estafilococos e estreptococos neste grupo. A quarta geração possui um espectro que abrange cocos Gram-positivos, bacilos entéricos Gram-negativos, *Pseudomonas aeruginosa* e algumas *Enterobactereaceae* normalmente resistentes às cefalosporinas de terceira geração (Bishop, 2005; Riviere & Papich, 2009; Prescott, 2013b).

Para avaliação de suscetibilidade às cefalosporinas de 1ª geração, é utilizada como representante da classe, a cefalotina (Prescott, 2013b).

À semelhança das penicilinas, as cefalosporinas são, normalmente, bactericidas e possuem três mecanismos de resistência já anteriormente descritos: diminuição da permeabilidade e aumento do efluxo, produção de betalactamases e resistência das PBP's à ligação por betalactâmicos (Riviere & Papich, 2009; Prescott, 2013b).

Para as cefalosporinas de primeira geração, como a cefalexina ou cefadroxil, é recomendada a administração de 15-30 mg/kg BID *per os* (Hillier *et al.*, 2014).

Efeitos adversos clinicamente relevantes aquando da administração de cefalosporinas, incluem reações de hipersensibilidade, embora raras, e alterações gastrointestinais, tais como perda de apetite, vômitos e diarreia (Riviere & Papich, 2009).

4.2.2 – Classe das lincosamidas

4.2.2.1 – Clindamicina

A clindamicina é uma lincosamida semissintética desenvolvida em 1966 derivada da lincomicina, um produto da fermentação natural da bactéria *Streptomyces lincolnensis* (Smieja, 1998; Batzias *et al.*, 2004; Spížek & Řezanka, 2004).

As lincosamidas, conjuntamente com os macrólidos e streptogramina B, estão relacionados funcionalmente, sendo frequentemente referidos como grupo de antibióticos MLS_B (do inglês *Macrolide-Lincosamide-Streptogramin B*) (Rich *et al.*, 2005). Em concordância com o seu mecanismo de ação, muitas vezes é desenvolvida resistência bacteriana cruzada às lincosamidas, macrólidos e streptogramina B (Spížek & Řezanka, 2004).

As lincosamidas possuem um espectro de ação moderado, sendo que a clindamicina demonstrou ter uma atividade antibacteriana superior em comparação com a lincomicina (Batzias *et al.*, 2004; Giguère, 2013a). O seu espectro de ação compreende, assim, bactérias

Gram-positivas, principalmente associadas a infecções de pele, sendo particularmente útil em infecções estafilocócicas, bem como bactérias anaeróbias e algumas infecções por protozoários em pequenos animais (Noli & Boothe, 1999; Rich *et al.*, 2005; Giguère, 2013a). A sua utilização em animais de companhia detém um papel relevante no tratamento de piodermite bacteriana superficial e profunda (Scott *et al.*, 1998; Bloom & Rosser, 2001).

Apesar de considerada um antibiótico bacteriostático, alguns estudos sugerem que possui uma atividade bactericida concentração-independente e tempo-dependente (Noli & Boothe, 1999; Batzias *et al.*, 2004; Spížek & Řezanka, 2004).

A clindamicina, a nível molecular, é um clássico inibidor da síntese proteica bacteriana, ligando-se reversivelmente ao ribossoma 23S de ARN (Ácido Ribonucleico) da subunidade ribossômica 50S (Spížek & Řezanka, 2004; Rich *et al.*, 2005; Giguère, 2013a).

Existem dois mecanismos principais de resistência adquirida no grupo MLS_B: efluxo ativo do antibiótico para o espaço periplasmático codificado pelo gene *msrA*, o que confere resistência aos macrólidos e streptogramina mas não às lincosamidas, como a clindamicina; e modificação do local alvo do ribossoma, codificado pelo gene *erm* (Leclercq, 2002; Spížek & Řezanka, 2004; Rich *et al.*, 2005; Fernandes *et al.*, 2007; Giguère, 2013a), particularmente o *ermB* em *S. pseudintermedius* (Perreten *et al.*, 2010). Os genes *erm* são adquiridos através de elementos móveis e podem encontrar-se no cromossoma bacteriano ou plasmídeos (Giguère, 2013a). A resistência resultante dos genes *erm* pode ser, ainda, de dois tipos, constitutiva ou induzível. A resistência constitutiva é permanentemente expressa e o fenótipo demonstra resistência a todo o grupo MLS_B, e a resistência induzível ocorre quando bactérias resistentes aos macrólidos, mas inicialmente suscetíveis à clindamicina, rapidamente desenvolvem resistência às lincosamidas quando expostas a um macrólido (Leclercq, 2002; Spížek & Řezanka, 2004; Giguère, 2013a). Outro mecanismo envolve inativação enzimática mediada por nucleotidiltransferases, sendo esta codificada pelo gene *lnu* (A-F) (Giguère, 2013a).

O cloridrato de clindamicina está comercialmente disponível em formulações para administração oral, em cápsulas, comprimidos e solução oral (Bishop, 2005), sendo convenientemente absorvido e conseguindo penetrar bem na pele infetada (Noli & Boothe, 1999). Atualmente é recomendada uma administração de 5,5-10 mg/kg *per os* duas vezes por dia (Hillier *et al.*, 2014).

Harvey *et al.* (1993) reportaram que o cloridrato de clindamicina, por via oral, numa dose de 11 mg/kg uma vez por dia, era eficaz para o tratamento de piodermite superficial em cães, com um sucesso de 81% e 94% após três semanas e seis semanas de tratamento,

respetivamente. No entanto, neste estudo não são referidos testes de suscetibilidade das amostras à clindamicina. Em contraste com este estudo, Bloom & Rosser (2001) referiram que 71,4% dos cães tratados com clindamicina obtiveram uma resposta excelente ao 42º dia de tratamento. Este resultado pode dever-se ao facto de terem sido incluídos, neste estudo, amostras de *S. intermedius* resistentes à clindamicina, representando assim a escolha empírica deste antibiótico aquando do tratamento de piodermite bacteriana.

A principal desvantagem da utilização de clindamicina é o rápido desenvolvimento de resistência bacteriana e distúrbios gastrointestinais ocasionais (Noli & Boothe, 1999), resultando a sua administração numa alteração da microflora intestinal (Spížek & Řezanka, 2004).

4.2.3 – Classe dos macrólidos

4.2.3.1 – Eritromicina

Descoberta no início dos anos 50, a eritromicina é um macrólido derivado do actinomicete *Saccharopolyspora erythraea* (Riviere & Papich, 2009).

A eritromicina é maioritariamente eficaz contra bactérias Gram-positivas, incluindo estafilococos resistentes aos betalactâmicos, contra algumas bactérias Gram-negativas e a sua eficácia contra bactérias anaeróbias é apenas moderada (Noli & Boothe, 1999; Albarellos *et al.*, 2008; Riviere & Papich, 2009).

A maioria dos autores considera a eritromicina como sendo bacteriostática em concentrações terapêuticas, no entanto, esta pode ser bactericida em concentrações elevadas e contra um inóculo reduzido de bactérias altamente suscetíveis (Noli & Boothe, 1999; Riviere & Papich, 2009; Giguère, 2013b).

A eritromicina atinge níveis de concentração eficazes em todos os tecidos, exceto no cérebro e líquido cefalorraquidiano (Noli & Boothe, 1999). Uma vez que a sua ação é potenciada por um pH elevado, atingindo um efeito antibacteriano ótimo a um pH de 8, ambientes ácidos, como os encontrados em abscessos, tecido necrosado, estômago ou urina suprimem a sua atividade (Albarellos *et al.*, 2008; Riviere & Papich, 2009).

Como já mencionado no capítulo referente às lincosamidas, estas, conjuntamente com os macrólidos e streptogramina B, encontram-se relacionadas funcionalmente (Rich *et al.*, 2005).

A eritromicina liga-se reversivelmente à subunidade ribossômica 50S, inibindo a síntese proteica. Este local de ligação sobrepõe-se com o das lincosamidas, streptogramina, cetólidos e oxazolidinonas e encontra-se próximo ao do cloranfenicol, podendo ocorrer efeito antagonista se administrado conjuntamente com este último (Noli & Boothe, 1999; Riviere & Papich, 2009; Giguère, 2013b).

O mecanismo de resistência para os antibióticos macrólidos encontra-se convenientemente esclarecido no capítulo anterior referente às lincosamidas, uma vez que o processo é idêntico.

A eritromicina é inibidora de enzimas microssômicas hepáticas, agindo tanto como substrato, como inibidor das enzimas do citocromo P450, sendo este o que se encontra normalmente envolvido na metabolização de princípios ativos. A eritromicina aumenta, assim, os níveis plasmáticos de teofilina, ciclosporina, digoxina e varfarina (Riviere & Papich, 2009).

Por ser inativada pelo ambiente ácido do estômago, são necessárias modificações da molécula de eritromicina, como esterificação ou adição de sais, para prevenir a sua inativação e melhorar a absorção oral (Riviere & Papich; Albarellos *et al.*, 2011).

A eritromicina deve ser administrada três vezes por dia *per os* a uma dose de 10-20 mg/kg (Noli & Boothe, 1999).

Poucos efeitos secundários têm sido reportados, contudo alterações gastrointestinais, particularmente regurgitação ou vômito, são comuns em cães após administração oral. Estes distúrbios podem ser resultado de um desequilíbrio da flora intestinal ou devido a um efeito procinético, uma vez que a eritromicina se liga a receptores de motilina (Noli & Boothe, 1999; Albarellos *et al.*, 2008; Riviere & Papich, 2009; Giguère, 2013b).

4.2.4 – Classe das sulfonamidas

4.2.4.1 – Trimetoprim-sulfametoxazol

As sulfonamidas são uma das classes mais antigas de antibióticos, encontrando-se em uso clínico há 50 anos (Riviere & Papich, 2009). Como agente antibiótico único, a sua relevância diminuiu consideravelmente devido à muito difundida resistência bacteriana e pela sua potência relativamente inferior, quando em comparação com antibióticos mais modernos (Prescott, 2013c). Assim sendo, a maioria das sulfonamidas para uso veterinário dependem da adição de diaminopirimidinas, como por exemplo trimetoprim, a primeira a ser introduzida para

uso clínico. É possível, assim, alargar o espectro de atividade e aumentar a atividade antibacteriana contra bactérias que seriam resistentes a esses princípios ativos, se utilizados individualmente (Riviere & Papich, 2009; Prescott, 2013c).

As trimetoprim-sulfonamidas são formuladas numa proporção de 1:5, respetivamente, no entanto, encontra-se descrito que uma proporção de 1:20 seria a mais indicada para produzir um efeito antibacteriano otimizado em animais (van Duijkeren *et al.*, 1994). O rácio de 1:20 é aconselhado em humanos, uma vez que as diaminopirimidinas se concentram nos tecidos, enquanto que as sulfonamidas permanecem na sua maioria no fluido extracelular, produzindo assim um efeito sinergista e bactericida contra uma variedade de bactérias (Prescott, 2013c). Este rácio, no entanto, é bastante inferior, uma vez que a componente do trimetoprim é excretada de forma mais rápida que a sulfonamida (Riviere & Papich, 2009).

O seu espectro de atividade é amplo, incluindo bactérias aeróbias Gram-positivas, Gram-negativas e protozoários (Riviere & Papich, 2009). Não são ativas contra bactérias anaeróbias *in vivo*, uma vez que a presença de timidina e ácido paraminobenzóico (PABA, do inglês *Paraminobenzoic Acid*), em tecidos necrotizados, antagonizam o seu efeito bactericida (Prescott, 2013c).

As sulfamidas interferem com a biossíntese bacteriana, competindo com o PABA pela enzima dihidropteroato sintetase e, assim, prevenindo a incorporação do mesmo na molécula de ácido fólico, essencial para a síntese de ADN (Ácido Desoxirribonucleico) (Prescott, 2013c). Esta resistência ocorre através de mecanismos mediados por cromossomas e plasmídeos (Riviere & Papich, 2009). A mutação cromossómica desenvolve-se de forma lenta e gradual e resulta de uma diminuição da penetração do antibiótico, produção de uma enzima dihidropteroato sintetase insensível ou hiperprodução de PABA. A resistência mediada por plasmídeos, normalmente codificada pelos genes *sul1*, *sul2* e *sul3* e, por vezes, ligada a outros genes de resistência, incluindo o gene *dfr* do trimetoprim, é mais comum. Existe ainda resistência cruzada completa entre sulfamidas (Prescott, 2013c). As diaminopirimidinas interferem com a síntese do ácido tetrahidrofólico do dihidrofolato através de combinação com a enzima dihidrofolato redutase. Estas inibem a mesma sequência metabólica que as sulfonamidas, impedindo a síntese bacteriana de purinas e, assim sendo, do ADN. A resistência normalmente é resultado de síntese de uma enzima dihidrofolato redutase resistente (Prescott, 2013c).

O CLSI alerta que, aquando da realização de testes de suscetibilidade padronizados, o meio de agar Mueller-Hinton contém quantidades excessivas de timidina ou timina, o que pode

reverter o efeito inibidor das sulfonamidas e trimetoprim, resultando em falsos resistentes (Riviere & Papich, 2009).

Formulações de Medicina Humana são, normalmente, utilizadas, encontrando-se disponível em suspensão líquida de 48 mg/dL e em comprimidos de 480 e 960 mg (Riviere & Papich, 2009).

No que concerne a posologia, encontra-se recomendada uma dose de 15 a 30 mg/kg *per os* BID (Hillier *et al.*, 2014).

O uso de sulfonamidas potenciadas, como antibióticos de primeira escolha, encontra-se limitado pela preocupação acerca da relativamente elevada incidência de efeitos adversos às mesmas (Trepanier, 2004). Contudo, reações adversas significativas são, normalmente, pouco comuns em animais tratados com a dose recomendada e até duas semanas (Prescott, 2013c). Efeitos secundários são dose-dependente e incluem anemia não regenerativa, hematúria e inibição da síntese de hormonas tiroideias (Trepanier, 2004). Numa pequena percentagem de animais, o tratamento com sulfonamidas pode produzir reações idiossincráticas, ocorrendo entre dez dias e três semanas após o início do tratamento, com rápida reincidência se ocorrer nova exposição ao antibiótico. Em cães inclui febre, poliartropatia, discrasias sanguíneas, epistáxis, hepatotoxicidade, proteinúria, linfadenopatia, edema facial, erupções cutâneas, uveíte e queratoconjuntivite seca. Menos observado pancreatite e meningite. Estas reações são descritas como reações de hipersensibilidade, uma vez que envolve uma resposta imune mediada por células T (Trepanier *et al.*, 2003; Trepanier, 2004). Efeitos adversos graves, mas reversíveis, têm sido descritos em Doberman Pinschers, sendo que se deve evitar o uso de sulfonamidas nesta raça em particular (Riviere & Papich, 2009).

4.2.5 – Classe das tetraciclinas

4.2.5.1 – Tetraciclina

As tetraciclinas, descobertas no final dos anos 40 e início dos anos 50, são uma classe de antibióticos isolados a partir de várias espécies de *Streptomyces*, tendo sido os primeiros agentes antibacterianos de largo espectro a serem descobertos (Riviere & Papich, 2009; Maaland *et al.*, 2014).

Estas exibem atividade contra uma grande variedade de bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, bem como organismos atípicos, como clamídias, micoplasmas, algumas

micobactérias, rickettsias, parasitas protozoários e filárias (Roberts, 1996; Chopra & Roberts, 2001; del Castillo, 2013).

A molécula representante desta classe, em testes de suscetibilidade, é a tetraciclina, uma vez que é mais estável em meio de cultura do que os seus congêneres (del Castillo, 2013).

Apresentada em 1966, a doxiciclina é a tetraciclina mais utilizada na clínica de animais de companhia, possuindo propriedades lipofílicas cerca de cinco a dez vezes mais eficazes, quando em comparação com tetraciclina mais antigas (Roberts, 1996; Schulz *et al.*, 2011; Maaland *et al.*, 2013).

A atividade bacteriana *in vitro* da tetraciclina e doxiciclina contra *S. pseudintermedius* é tempo dependente e bacteriostática (del Castillo, 2013, Maaland *et al.*, 2014). Devido à resistência a nível mundial, a doxiciclina é considerada um antibiótico de segunda escolha no tratamento de infecções estafilocócicas, e a sua prescrição é, normalmente, guiada por um teste de suscetibilidade (Maaland *et al.*, 2014).

As tetraciclina são inibidores clássicos da síntese proteica, ligando-se às proteínas 16S ARN e S7 da subunidade ribossômica 30S, impedindo, desta forma, a síntese proteica (Riviere & Papich, 2009; del Castillo, 2013).

As bactérias do género *Staphylococcus* são naturalmente suscetíveis às tetraciclina, no entanto, resistências adquiridas à tetraciclina e doxiciclina, através da aquisição do gene *tet*, são comuns (Kadlec *et al.*, 2010; Perreten *et al.*, 2010).

Existem diferentes mecanismos de resistência às tetraciclina, nomeadamente, sistemas de bomba de efluxo e alteração do local alvo no ribossoma impedindo, assim, a sua ligação (Riviere & Papich, 2009; del Castillo, 2013). Os genes mediadores de resistência encontram-se localizados em plasmídeos ou transposões, sendo que resistência a uma tetraciclina irá produzir resistência cruzada à doxiciclina (Riviere & Papich, 2009). A resistência às tetraciclina, em estafilococos, é mediada por quatro genes de resistência, *tet(K)* e *tet(L)* codificam bombas de efluxo e *tet(M)* e *tet(O)* servem de mediadores para a proteção ribossômica do local alvo do antibiótico, sendo ainda que estes dois últimos conferem resistência a ambas tetraciclina e doxiciclina (Roberts, 1996; Maaland *et al.*, 2014).

Até recentemente, dimensões de halos de Medicina Humana têm sido utilizados como indicadores de classe para bactérias isoladas em cães. No entanto o CLSI aprovou limites de concentração crítica específicos caninos para a doxiciclina para *S. pseudintermedius*, que serão incluídos na próxima edição das linhas de orientação do CLSI (Maaland *et al.*, 2013). Estas dimensões de halos, atualmente aplicadas pelo CLSI, podem não ser apropriadas para a

interpretação da suscetibilidade para isolados em cães devido às suas características farmacocinéticas, local de ligação proteica, que pode divergir em humanos e cães, bem como a suscetibilidade dos isolados bacterianos, que pode ser diferente em cada espécie (Maaland *et al.*, 2013).

A administração de doxiciclina é normalmente realizada através de comprimidos de 50, 75 e 100 mg ou suspensão oral (5 mg/mL suspensão e 10 mg/mL xarope), em doses de 5 mg/kg duas vezes por dia, ou 10 mg/kg uma vez por dia (Papich, 2013; Hillier *et al.*, 2014). Existem dois produtos comerciais de doxiciclina distintos disponíveis para utilização em cães, comprimidos de hiclato de doxiciclina (disponíveis em vários países europeus) e monohidrato de doxiciclina em comprimidos ou pasta (disponível em outros países, incluindo Austrália, Nova Zelândia e África do Sul) (Maaland *et al.*, 2014).

Efeitos adversos são raros, no entanto, Schulz *et al.* (2011) conduziram um estudo retrospectivo, por forma a avaliar os efeitos secundários causados pela administração de doxiciclina. Foi possível inferir que sintomatologia gastrointestinal, como vômito, diarreia e anorexia, bem como um aumento das enzimas hepáticas alanina transferase (ALT, do inglês *Alanine Transferase*) e fosfatase alcalina (ALP, do inglês *Alkaline Phosphatase*), são os efeitos secundários mais comuns. Apesar de ambas ALT e ALP se apresentarem elevadas, apenas o aumento da ALP está relacionado com um aumento na dose administrada. Concluiu-se, também, que cães mais velhos estão mais propensos ao desenvolvimento de efeitos secundários, sendo necessária especial atenção, nestes casos, em relação à dose e monitorização. Tem sido também reportada lesão esofágica, principalmente em gatos, com a administração de comprimidos de cloridrato de doxiciclina devido a quebra de comprimido ou cápsula incompletamente dissolvida. Tal pode ser aliviado através da administração de água ou comida, de forma a assegurar a passagem do mesmo (Papich, 2013).

Bettenay *et al.* (1998) conduziram um estudo em 65 cães com piodermite bacteriana (30 com piodermite superficial e 35 com piodermite profunda), com administração de doxiciclina na dose recomendada. Remissão completa após três semanas foi alcançada em 53% dos cães com piodermite superficial e 14% dos com piodermite profunda. Uma resposta parcial foi observada em 40% dos casos com piodermite superficial e 51% de piodermite profunda.

4.2.5.2 – Minociclina

A minociclina, introduzida em 1972, é um produto da manipulação química da molécula base de tetraciclina, aumentando a atividade antibacteriana ao melhorar a absorção gastrointestinal, prolongando a meia vida e amplificando a penetração nos tecidos (Riviere & Papich, 2009).

A minociclina é um antibiótico bacteriostático de largo espectro, da classe das tetraciclinas que, tal como os outros antibióticos da sua classe, atua através da inibição da síntese proteica por ligação à subunidade ribossômica 30S (Weese *et al.*, 2013).

Apesar do representante da classe ser a própria tetraciclina, e a suscetibilidade à mesma prever a suscetibilidade a outras tetraciclinas, alguns isolados resistentes podem ser suscetíveis a outros antibióticos como a doxiciclina e a minociclina, dependendo do seu mecanismo de resistência (Papich, 2013).

A resistência às tetraciclinas em estafilococos é mediada através dos genes *tet(M)* e *tet(O)*, que conferem resistência através de proteção ribossômica do princípio ativo alvo, e pelo *tet(K)* e *tet(L)* que codificam a bomba de efluxo (Papich, 2013; Weese *et al.*, 2013; Maaland *et al.*, 2014). Estes dois últimos genes conferem resistência à tetraciclina e doxiciclina, mas não à minociclina (Roberts, 1996; Papich, 2013; Weese *et al.*, 2013). Enquanto que o *tet(M)* é o gene mais comum que origina resistência à tetraciclina em *S. pseudintermedius* (Schwarz, *et al.*, 1998), uma óbvia associação tem sido reportada entre *tet(K)* e o globalmente generalizado clone MRSP ST71, que apresenta um perfil de multirresistência característico (Perreten *et al.*, 2010; Weese *et al.*, 2013). A minociclina representa, assim, um antibiótico de segunda escolha muito útil contra este clone MRSP em particular e outras estirpes multirresistentes contendo apenas o gene *tet(K)* (Maaland *et al.*, 2014).

A minociclina tem sido relativamente pouco estudada em Medicina Veterinária, possivelmente devido aos testes de suscetibilidade não terem sido recomendados pelas linhas de orientação do CLSI (Weese *et al.*, 2013). Uma vez que poucos laboratórios veterinários oferecem testes de suscetibilidade à minociclina, pouca informação é conhecida acerca da suscetibilidade à mesma por parte dos agentes patogénicos veterinários (Weese *et al.*, 2013).

A sua utilização não é atualmente aprovada em cães, contudo, de acordo com a informação transmitida em alguns países, a utilização de minociclina é permitida se a estirpe que causa infeção for resistente a outros antibióticos licenciados para uso veterinário (Maaland *et al.*, 2014).

A minociclina é particularmente interessante como antibiótico oral para MRSP multirresistentes, ao invés de outras opções que requerem administração parentérica e que podem apresentar problemas de toxicidade, ou que sejam de uso exclusivo hospitalar humano (Weese *et al.*, 2013).

Os estudos de minociclina em cães são limitados e insuficientes para assegurar uma dose otimizada (Maaland *et al.*, 2014). As recomendações atuais para posologia são de 10 mg/kg *per os* BID (Hillier *et al.*, 2014).

Um estudo realizado em 1967 por Noble *et al.*, no que concerne a toxicidade da minociclina em cães, não revelou nenhuns efeitos adversos significativos após administração oral (30 mg/kg diariamente durante 30 dias) (Papich, 2013).

Maaland *et al.* (2014), não observaram efeitos adversos aquando da administração de minociclina, no entanto, um dos autores, em observações clínicas, reportou alterações gastrointestinais em doses de 20 mg/kg diárias.

4.2.6 – Classe das fluoroquinolonas

4.2.6.1 – Enrofloxacin

As fluoroquinolonas são antibióticos sintéticos, sendo que a primeira aprovada para uso em animais foi a enrofloxacin, em 1988 nos Estados Unidos da América (EUA) (Lizondo *et al.* 1997; Riviere & Papich, 2009; Giguère & Dowling, 2013). O uso de enrofloxacin encontra-se aprovado para o tratamento de infeções da cavidade oral, ouvido médio e interno, trato urinário, prostáticas, respiratórias, ósseas e de pele em cães e gatos (Heinen, 2002; Riviere & Papich, 2009).

Estes antibióticos possuem uma excelente atividade contra a maioria das bactérias aeróbias Gram-negativas, no entanto, contra Gram-positivas, existe uma suscetibilidade variada. São rápidas bactericidas, exibindo um efeito concentração dependente e pós antibiótico *in vivo* para algumas bactérias (Riviere & Papich, 2009; Giguère & Dowling, 2013).

Em uso veterinário são normalmente bem absorvidas por via oral, possuem um grande volume de distribuição, penetrando praticamente todos os tecidos e células no corpo, e permitem, ainda, uma administração a cada 24 ou 48 horas (Giguère & Dowling, 2013).

As fluoroquinolonas inibem a atividade bacteriana atuando na subunidade A da topoisomerase II, também denominada de ADN girase, codificada pelos genes *gyrA* e *griA*, o

que leva a rápida morte bacteriana (Mitchell, 2006; Riviere & Papich, 2009; Giguère & Dowling, 2013). Outro local alvo é a enzima topoisomerase IV, composta pelas subunidades *parC* e *parE*, que, não sendo tão importantes em bactérias Gram-negativas, são alvo em Gram-positivas, incluindo estafilococos (Riviere & Papich, 2009; Giguère & Dowling, 2013).

A resistência em fluoroquinolonas é mediada, primariamente, por modificações no local alvo da ADN girase, com mutações secundárias na topoisomerase IV, contribuindo esta última para níveis elevados de resistência. Diminuição da permeabilidade celular da parede bacteriana e bombas de efluxo, particularmente quando existem mutações em locais alvo, são também mecanismos que contribuem para o aparecimento de resistências (Martinez *et al.*, 2006; Mitchell, 2006; Riviere & Papich, 2009; Giguère & Dowling, 2013).

Apesar da enrofloxacin ser o princípio ativo, biotransformação em ciprofloxacina ocorre por via hepática em algumas espécies, incluindo o cão (Küng *et al.*, 1993; Cester & Toutain, 1997; Mitchell, 2006; Riviere & Papich).

É recomendada a administração de 5-20 mg/kg *per os* SID (Hillier *et al.*, 2014).

Aquando da administração de doses elevadas de enrofloxacin, durante testes de segurança, os efeitos adversos mais comuns foram distúrbios gastrointestinais, como náuseas, vômitos e diarreia (Ihrke *et al.*, 1999; Riviere & Papich, 2009). Estudos realizados pelo fabricante em gatos demonstraram, ainda, que numa dose de 5 mg/kg SID a enrofloxacin não provoca efeitos adversos, nem alterações oculares. No entanto, doses mais elevadas, de 20 mg/kg ou mais, são reportadas de causar degeneração da retina e cegueira bem como efeitos tóxicos sistêmicos (Ford *et al.*, 2007). Em animais jovens, particularmente entre as 4 e 28 semanas de idade, encontra-se reportado que fluoroquinolonas podem causar artropatia (Gough *et al.*, 1992; Ihrke *et al.*, 1999). Cães afetados demonstram claudicação e edema articular, e caso a administração seja descontinuada, os sintomas podem ser reversíveis. Os riscos aumentam com doses mais elevadas (Ihrke *et al.*, 1999; Riviere & Papich, 2009). Ainda assim, a sua administração em cachorros com infeções severas tem sido continuada, sem que estejam relatadas artropatias consequentes (Giguère & Dowling, 2013).

A eficácia da enrofloxacin tem sido demonstrada especificamente para piodermite canina (Ihrke & DeManuelle, 1999; Ihrke *et al.*, 1999; Riviere & Papich, 2009). A enrofloxacin é particularmente eficaz no tratamento de piodermite profunda do Pastor Alemão quando administrada *per os* SID, numa dose de 5-10 mg/kg (Ihrke & DeManuelle, 1999; Koch & Peters, 1996). Foi também comprovado que a concentração de enrofloxacin na pele de cães com piodermite é significativamente maior do que em cães sem doença dermatológica com uma

administração SID, sendo que foram atingidas concentrações terapêuticas nas três horas após a administração (DeManuelle *et al.*, 1998; Ihrke *et al.*, 1999).

4.2.6.2 – Pradofloxacina

A pradofloxacina é uma nova fluoroquinolona de terceira geração para uso veterinário, lançada no mercado em 2011 na União Europeia (UE) para o tratamento de infecções caninas e felinas e em 2013 nos EUA para o tratamento de infecções dermatológicas em gatos (Sykes & Blondeau, 2014).

Não só é caracterizada pelo seu largo espectro de ação contra bactérias Gram-negativas, mas também por possuir uma elevada atividade contra Gram-positivas e bactérias anaeróbias, quando em comparação com outras fluoroquinolonas de uso veterinário (Silley *et al.*, 2007; Hauschild *et al.*, 2013).

A atividade antibacteriana da pradofloxacina é atribuída à inibição da replicação em dois locais enzimáticos: a subunidade A da topoisomerase II (também denominada de ADN girase) e topoisomerase IV (Silley *et al.*, 2007; Sykes & Blondeau, 2014). Desta forma são interrompidas as sínteses de ADN bacteriana e proteica, sucedendo morte bacteriana, sendo este processo concentração dependente (Silley *et al.*, 2012). Em comparação com outras fluoroquinolonas de uso veterinário de gerações anteriores, a pradofloxacina possui grande afinidade para ambas enzimas (Wetzstein, 2005).

Na UE, a pradofloxacina está disponível em comprimidos palatáveis de 60 mg e 120 mg para cães e 15 mg para gatos e cães de pequeno porte, sendo que existe ainda uma suspensão oral a 2,5% (25 mg/kg) para gatos tanto na UE como nos EUA. A dose recomendada pelo fabricante na UE é de 3 mg/kg, para comprimidos, e 5 mg/kg para suspensão oral SID (Hillier *et al.*, 2014; Sykes & Blondeau, 2014). Nos EUA a dose recomendada para a suspensão oral é de 7,5 mg/kg SID (Sykes & Blondeau, 2014).

Com a utilização de pradofloxacina numa dose de 3 mg/kg a cada 24 horas espera-se a eliminação de grandes populações de estafilococos “*wild-type*” e a prevenção da emergência de clones resistentes às fluoroquinolonas (Wetzstein, 2005; Körber-Irrgang *et al.*, 2012).

Uma vez que as fluoroquinolonas se acumulam nas células inflamatórias (Carlier *et al.*, 1990), uma inflamação severa associada a uma piodermite bacteriana profunda pode permitir uma concentração local de pradofloxacina elevada no tecido inflamatório, já que a

concentração de pradofloxacin na pele excede a concentração no soro (Fraatz *et al.*, 2003), resultando assim numa eliminação bacteriana mais eficiente (DeManuelle *et al.*, 1998).

Um estudo multicêntrico, cego, randomizado e paralelo, conduzido por Muller & Stephan (2007), comparando a eficácia da pradofloxacin em relação à amoxicilina-ácido clavulânico, demonstrou que a pradofloxacin é um antibiótico seguro para tratamento de piodermite bacteriana profunda na dose de 3 mg/kg uma vez por dia. Dos cães tratados com pradofloxacin, 86% (48 em 56) atingiram remissão clínica após 34 dias de tratamento, tendo sido significativamente mais eficaz na prevenção de recidivas nas duas semanas após o termino da terapia, do que o tratamento com amoxicilina-ácido clavulânico (Muller & Stephan, 2007).

Efeitos adversos relacionados com administração de fluoroquinolonas incluem degeneração da retina difusa aguda e cegueira irreversível em gatos, o que no entanto não foi reportado por Messias *et al.* (2008) aquando da utilização de pradofloxacin em doses seis a dez vezes acima do normal. Mielossupressão reversível em gatos, e particularmente em cães, também tem sido observada (Sykes & Blondeau, 2014). Outros efeitos adversos possíveis relacionados com a administração de fluoroquinolonas, embora ainda sem estudos reportados, incluem erosão de cartilagem e artropatias, sendo que ocorrem principalmente em cães (Sykes & Blondeau, 2014) particularmente com idade inferior aos seis meses (Lees, 2013).

Apesar de bem tolerada em doses clínicas por cães e gatos em estudos pré-clínicos e ensaios clínicos, alguns efeitos adversos gastrointestinais moderados e transitórios foram observados (Lees, 2013).

4.2.7 – Classe dos fenicóis

4.2.7.1 – Cloranfenicol

A descoberta do cloranfenicol em 1947 representou um passo importante na luta antibacteriana, tendo sido categorizado como um dos primeiros antibióticos de largo espectro (Watson, 1991; Short *et al.*, 2014). Apesar de popular há algumas décadas atrás, o cloranfenicol tem sido gradualmente substituído em Medicina Veterinária por alternativas mais seguras (Papich, 2013; Short *et al.*, 2014).

Apesar dos significativos efeitos adversos, a atividade do cloranfenicol contra bactérias resistentes a outros antibióticos orais, particularmente com a crescente prevalência de

estafilococos resistentes à meticilina, aumentou a sua utilização nos últimos anos (Bryan *et al.*, 2012; Papich, 2013; Short *et al.*, 2014).

O cloranfenicol é eficaz contra bactérias Gram-positivas e Gram-negativas bem como alguns anaeróbios. É considerado um antibiótico bacteriostático, na dose recomendada a cada oito horas (Short *et al.*, 2014) e, de acordo com Papich (2013), existe alguma evidência de que possa ser mais bactericida contra *Staphylococcus* do que o que previamente se acreditava.

Este antibiótico é um potente inibidor da síntese proteica microbiana, ligando-se irreversivelmente à subunidade ribossômica 50S (Dowling, 2013b).

O mecanismo de resistência bacteriana mais frequente compreende a inativação enzimática através de acetilação pela acetiltransferase do cloranfenicol, codificada pelos genes *cat* localizados em plasmídeos e ADN cromossômico (Schwarz, 1995; Dowling, 2013b).

O cloranfenicol interage com algumas enzimas, diminuindo a eliminação de outros princípios ativos metabolizados pelas mesmas (Papich, 2013; Short *et al.*, 2014). Opiáceos, barbitúricos, propofol, fenitoína, salicilato, e, possivelmente, outros princípios ativos, vêm o seu metabolismo alterado na presença do cloranfenicol (Papich, 2013).

O cloranfenicol existe em formulações de comprimidos de 100, 250 e 500 mg, sendo absorvido oralmente, com e sem administração prévia de comida (Papich, 2013).

Uma vez que possui uma margem de segurança estreita, é necessária uma administração frequente para manter concentrações adequadas (Papich, 2013). É recomendada uma dose de 40 a 50 mg/kg *per os* TID (Hillier *et al.*, 2014).

Distúrbios gastrointestinais, como vômitos, diarreia, anorexia, sialorreia e engasgos, constituem os efeitos adversos mais observados (Bryan *et al.*, 2012; Papich, 2013; Short *et al.*, 2014). Supressão na síntese proteica da medula óssea foi também observada em cães a que foram administradas doses elevadas de cloranfenicol, podendo ainda estar associada a um tratamento prolongado. A incidência de anemia aplástica irreversível idiossincrática é possível de ocorrer em humanos, apesar de não estar descrita em animais, sendo aconselhado alertar os donos para este facto, assegurando que não existe exposição acidental aquando da manipulação da medicação em casa (Papich, 2013; Hillier *et al.*, 2014; Short *et al.*, 2014).

Um problema previamente não identificado é a associação entre a administração de cloranfenicol e problemas neurológicos em cães (Papich, 2013). Short *et al.* (2014) referem no seu estudo que, alguns cães, particularmente de grande porte, acima de 25 kg, desenvolveram défices neurológicos reversíveis, manifestados por parésia, ataxia e disfunção dos membros posteriores. Sendo um estudo retrospectivo e com uma amostra pequena, poderá ser necessária

investigação futura de forma a averiguar a consistência da sua ocorrência. O mecanismo pelo qual ocorre ainda não se encontra descrito (Papich, 2013).

4.2.8 – Classe das ansamicinas

4.2.8.1 – Rifampicina

Originalmente descoberta nos anos 50 em França, e introduzida na medicina clínica nos anos 60, a rifampicina é um antibiótico que tem suscitado recente interesse devido à sua atividade contra estafilococos resistentes à meticilina (Papich, 2013). É um derivado semissintético da rifampicina B, composto este produzido por *Amycolatopsis mediterranei* (Sentürk *et al.*, 2005; Dowling, 2013c).

Este é um antibiótico de largo espectro e possui atividade contra numerosas bactérias Gram-positivas, algumas Gram-negativas aeróbias, bem como anaeróbias facultativas (Sentürk *et al.*, 2005; Dowling 2013c). A rifampicina é ativa contra a maioria das estirpes de *S. aureus* e *S. pseudintermedius*, mesmo resistentes à meticilina (Perreten *et al.*, 2010; Rubin *et al.*, 2011; Rubin and Chirino-Trejo, 2011), apesar de resistência entre isolados caninos ter sido identificada (Kadlec *et al.*, 2011; Papich, 2013).

A rifampicina é altamente lipofílica, com elevado volume de distribuição e boa absorção, possuindo a vantagem de conseguir penetrar nos tecidos de forma extremamente eficaz, particularmente na pele, e penetrar células fagocitárias por forma a eliminar bactérias intracelulares (Sentürk *et al.*, 2005; Dowling, 2013c; Papich, 2013).

Este é um antibiótico bactericida, que atua ligando-se à subunidade β do ARN polimerase ADN dependente, sendo que, na maioria das bactérias, a resistência é mediada através de mutações no gene *rpoB* que codifica esta subunidade (Kadlec *et al.*, 2011, Papich, 2013).

A sua utilização isolada em cães com infeções por *S. pseudintermedius* resistentes à meticilina resulta na rápida emergência de resistência à rifampicina, sendo que estes isolados podem persistir durante meses (Kadlec *et al.*, 2011). Assim sendo, combinação com outros antibióticos, com atividade *in vitro* contra a estirpe em causa, devem ser utilizados. (Kadlec *et al.*, 2011; Dowling, 2013c). Kadlec *et al.* (2011) referem, ainda, no seu estudo, que a resistência à rifampicina ocorre rapidamente, mesmo aquando da combinação com outro antibiótico.

Uma dose de 10 mg/kg por dia, normalmente dividida em duas administrações a cada 12 horas, tem sido recomendada (Papich, 2013; Hillier *et al.*, 2014).

A rifampicina é um forte indutor de enzimas metabolizadoras de fármacos, ou seja, aumenta o metabolismo e a eliminação de outros princípios ativos coadministrados, fazendo com que sejam necessárias doses mais elevadas ou uma frequência de administração maior (Dowling, 2013c; Papich, 2013). A quantidade de princípios ativos que interagem com a rifampicina é bastante extensa (Reitman *et al.*, 2011; Papich, 2013).

Em cães, toxicidade hepática é o efeito adverso mais comum, sendo que, num estudo realizado por Frank em 1990, 20 a 26% dos animais a que foram administrados rifampicina a uma dose de 5 a 10 mg/kg, desenvolveram aumento das enzimas hepáticas e alguns hepatite (Frank, 1990; Sentürk *et al.*, 2005; Papich, 2013). É assim recomendado não exceder a dose máxima diária e monitorizar as enzimas hepáticas antes do início do tratamento e depois semanalmente, por forma a identificar precocemente risco de hepatotoxicose (Bajwa *et al.*, 2013; Papich, 2013). Também são comuns alterações gastrointestinais como vômitos, inapetência e diarreia, bem como alteração da cor da urina, lágrima e esclera para uma tonalidade laranja-avermelhada (Sentürk *et al.*, 2005; Bajwa *et al.*, 2013; Dowling, 2013c; Papich, 2013). A rifampicina não é palatável (Papich, 2013).

Sentürk *et al.* (2005) desenvolveram um estudo em 20 cães, sendo que 18 apresentavam piodermite bacteriana superficial e dois piodermite profunda, tendo sido administrada rifampicina durante dez dias e numa dose de 5 mg/kg SID. O tratamento foi considerado bem-sucedido em 90% dos cães com piodermite, não tendo sido reportadas recidivas durante um mês após o tratamento. Foi observada uma eficácia reduzida em 10% dos cães, o que poderá estar relacionado com um tempo de tratamento demasiado curto nestes casos. Antes e após o tratamento foram mensuradas e avaliadas as concentrações de gama glutamiltransferase (GGT, do inglês *Gamma-Glutamyl Transferase*), ALT, ureia e creatinina, sendo que se concluiu que não existiam diferenças estatísticas significativas nestes valores, nem foram observados outros efeitos adversos, exceto coloração alaranjada da urina.

4.2.9 – Classe dos aminoglicosídeos

4.2.9.1 – Gentamicina e amicacina

Isolada em 1963, a gentamicina é uma combinação de quatro componentes produzidos por *Micromonospora purpurea* (Begg & Barclay, 1995; Riviere & Papich, 2009; Dowling, 2013a). Já a amicacina, introduzida em 1972, é uma modificação química da canamicina, com maior atividade que a mesma, mas com atividade semelhante à da gentamicina (Begg & Barclay, 1995; Dowling, 2013a).

Os aminoglicosídeos são valiosos no tratamento de infecções por bactérias aeróbias Gram-negativas resistentes a outros antibióticos, particularmente bacilos, no entanto, a eficácia clínica para bactérias Gram-positivas é menos certa. São rápidos bactericidas, exibindo uma atividade concentração-dependente, menos dispendiosos que outros antibióticos injetáveis e podem, ainda, ser administrados uma vez por dia (KuKanich & Coetzee, 2008; Dowling, 2013a; Papich, 2013). A gentamicina e amicacina, particularmente, possuem atividade *in vitro* consistente contra estafilococos, incluindo estirpes resistentes à meticilina de *S. pseudintermedius* (Papich, 2013). Contra isolados resistentes, a amicacina é mais ativa que a gentamicina, e resistência é menos provável de ocorrer (Petersen *et al.*, 2002; Papich, 2013).

Os aminoglicosídeos inibem a síntese proteica bacteriana ligando-se irreversivelmente à subunidade ribossomal 30S. O mecanismo mais difundido de resistência é a inativação por enzimas celulares modificadoras de aminoglicosídeos, codificadas em cromossomos ou plasmídeos pelo gene *aacA-aphD*, no caso da gentamicina, e pelo gene *aph-IIIa* na amicacina (Dowling, 2013a; Kadlec & Schwarz, 2012; Gold *et al.*, 2014). Além da sua atividade nos ribossomos bacterianos, um mecanismo adicional de resistência, e, provavelmente, mais importante, é a capacidade de romper o biofilme celular superficial, particularmente, em bactérias Gram-negativas, provocando perda de integridade da parede celular e um rápido efeito bactericida. Esta capacidade não é tão proeminente em bactérias Gram-positivas, a não ser quando administrado conjuntamente um antibiótico que produza perda da integridade da parede celular ou um betalactâmico (Dowling, 2013a; Papich, 2013). A amicacina é notável na sua capacidade em resistir à maioria das enzimas que inativam outros aminoglicosídeos (Dowling, 2013a).

Uma vez que absorção oral não é possível, a gentamicina e amicacina podem ser administradas por via intravenosa, intramuscular ou subcutânea (Riviere & Papich, 2009; Dowling, 2013a; Papich, 2013).

A gentamicina encontra-se disponível em soluções de 5, 50 e 100 mg/mL e a amicacina em soluções injetáveis de 50 mg/mL (Riviere & Papich, 2009).

No que concerne a posologia, é recomendada uma dose de 9-14 mg/kg SID para a administração de gentamicina e 15-30 mg/kg SID para amicacina (Hillier *et al.*, 2014). O conceito de administração SID tem sido adotado para cães e gatos, sendo que, num estudo conduzido por Albarellos *et al.* (2004), a administração de 6 mg/kg SID produziu uma concentração sérica adequada, com risco mínimo de nefrotoxicidade, no tratamento da maioria das infecções causadas por bactérias Gram-positivas e negativas, independentemente da suscetibilidade à gentamicina.

Os principais efeitos adversos associados à administração sistêmica de antibióticos aminoglicosídeos são o desenvolvimento de nefrotoxicidade e ototoxicidade (Begg & Barclay, 1995; KuKanich & Coetzee, 2008).

O efeito adverso mais grave é a lesão renal (Riviere & Papich, 2009). Os aminoglicosídeos acumulam-se por pinocitose nas células dos túbulos renais proximais provocando lesão, sendo que, eventualmente, todo o nefrônio pode ser afetado (Begg & Barclay, 1995; KuKanich & Coetzee, 2008; Papich, 2013). Animais desidratados, com desequilíbrio eletrolítico, que se encontrem septicêmicos, ou que tenham doença renal presente, possuem maior risco de toxicidade renal. A lesão renal é atribuída a níveis persistentes de antibiótico, especialmente em concentrações elevadas ao longo do intervalo entre doses (Papich, 2013). A amicacina é muitas vezes recomendada em pacientes críticos, ao invés da gentamicina, uma vez que é considerada menos nefrotóxica. Em animais com função renal normal, a administração de amicacina na dose recomendada durante duas a três semanas raramente provoca toxicidade (Dowling, 2013a).

Estudos acerca da ototoxicidade em várias espécies demonstram uma acumulação progressiva de aminoglicosídeos na perilinfa e endolinfa do ouvido interno, o que pode afetar tanto a função auditiva, como vestibular, devido à destruição das células pilosas sensoriais da cóclea e labirinto vestibular (Riviere & Papich, 2009). A ototoxicidade pode ser irreversível em alguns casos. Cães, normalmente, apresentam ototoxicidade, com presença de *head tilt* e diminuição da capacidade auditiva, enquanto que gatos tendem a apresentar toxicidade vestibular, apesar de ambas apenas ocorrerem após se ter instalado nefrotoxicidade (Riviere & Papich, 2009). A gentamicina aparenta causar menos toxicidade coclear do que a amicacina, sendo que o inverso ocorre em relação à toxicidade vestibular (Begg & Barclay, 1995; Dowling, 2013a).

Outro inconveniente relacionado com a administração de aminoglicosídeos prende-se no facto de serem injetáveis, o que pode tornar difícil a administração por parte dos donos (Papich, 2013).

É relevante, ainda, mencionar que a atividade dos aminoglicosídeos se encontra reduzida na presença de detritos celulares e pus, o que pode diminuir a sua utilidade no tratamento de feridas e otites (König *et al.*, 1998; Riviere & Papich, 2009; Papich, 2013).

5 – Conceito de multirresistência

A emergência de resistências bacterianas a múltiplos agentes antibióticos tem-se tornado um problema premente na atualidade, existindo cada vez menos, ou por vezes nenhuma, alternativas antibióticas eficazes para o seu controlo (Magiorakos *et al.*, 2011).

À medida que este problema progride, tem-se tornado necessário chegar a um consenso no que concerne descrever e classificar bactérias que são resistentes a múltiplos antibióticos. Não existindo uma definição universalmente aceite de “multirresistência”, o termo tem sido utilizado de forma inconsistente na literatura (Schwarz *et al.*, 2010; Magiorakos *et al.*, 2011).

Num sentido estrito, bactérias consideradas resistentes são assim designadas devido à sua resistência *in vitro* a mais do que uma classe de antibióticos, sendo que o termo se refere exclusivamente a propriedades de resistência bacteriana adquirida (Schwarz *et al.*, 2010; Magiorakos *et al.*, 2011).

Adotar uma terminologia internacional padronizada para definir bactérias que são resistentes a um número significativo de princípios ativos é um passo importante para melhor comparar os dados de vigilância e melhor avaliar a sua importância epidemiológica e impacto na saúde pública, bem como determinar a melhor estratégia de tratamento a tomar (Magiorakos *et al.*, 2011).

O *European Centre for Disease Prevention and Control* (ECDC) e o *Centers for Disease Control and Prevention* (CDC), propuseram que os isolados devem ser considerados multirresistentes se apresentarem resistência a pelo menos um agente antibiótico em três ou mais grupos de antibióticos. No caso do MRSP, e, uma vez que a oxacilina prevê a resistência aos antibióticos betalactâmicos, pode ser sempre considerado multirresistente, já que se encaixa nesta definição (Magiorakos *et al.*, 2011). No entanto, se apenas forem utilizados métodos fenotípicos para teste de suscetibilidade, resistência a três ou mais classes antibióticas pode ser

definida como multirresistência (Coombs *et al.*, 2006; Schwarz *et al.*, 2010). Assim sendo, seria considerada uma bactéria multirresistente se for apresentada, por exemplo, resistência às lincosamidas, tetraciclinas e fluoroquinolonas.

Para o presente trabalho será então considerada a definição de multirresistência como apresentando resistência a três ou mais classes antibióticas e não multirresistente quando da apresentação de resistência a duas ou menos classes.

6 – Objetivos

Perante o previamente contextualizado, o objetivo geral proposto para o presente trabalho, consistiu na determinação do perfil de resistência aos antibióticos recomendados pelas linhas de orientação da ISCAID, num grupo de isolados de *S. pseudintermedius* suscetíveis e resistentes à meticilina, provenientes de cães com piodermite apresentados à consulta de referência de dermatologia no Instituto Médico Veterinário e Hospital Escolar da Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade Lusófona de Humanidades e Tecnologias (FMV-ULHT). O estudo avaliou, igualmente, a incidência de multirresistência e a aplicabilidade das linhas de orientação neste grupo de isolados.

Foram, ainda, definidos alguns objetivos específicos, nomeadamente:

1º Avaliar a presença de isolados MRSP e MSSP através do teste Kirby-Bauer com o disco de oxacilina.

2º Avaliar a resistência às diferentes classes antibióticas através do teste à amoxicilina-ácido clavulânico, cefalotina, clindamicina, eritromicina e trimetoprim-sulfametoxazol, utilizando a mesma metodologia.

3º Detetar a presença de resistências a outros antibióticos sugeridos pelas linhas de orientação, tais como tetraciclina, minociclina, enrofloxacina, pradofloxacina, cloranfenicol, rifampicina, gentamicina e amicacina, utilizando a mesma metodologia.

4º Verificar a existência de associação entre o grupo MRSP e a resistência a cada antibiótico testado, bem como a associação entre o grupo MSSP e a presença de suscetibilidade a cada antibiótico.

5º Avaliar a frequência relativa de multirresistência e não multirresistência.

6º Comparar os grupos MRSP e MSSP quanto à presença de multirresistência ou não.

7º Discutir os resultados obtidos, à luz do que se encontra atualmente descrito na literatura.

II – MATERIAL E MÉTODOS

1 – Proveniência dos isolados e trabalho experimental

Para o presente estudo foram usados 55 isolados de *S. pseudintermedius* anteriormente recolhidos de cães com piodermite bacteriana superficial em consulta de referência de dermatologia no Instituto Médico Veterinário e Hospital Escolar da FMV-ULHT. As amostras haviam sido recolhidas a partir de pústulas intactas usando uma agulha e zaragatoa estéril, analisadas para efeitos clínicos, colocadas em glicerol diluído a 30% e meio nutriente (1:1) e conservadas a -20°C. Os isolados haviam sido identificados como *S. pseudintermedius* por reação em cadeia da polimerase (PCR, do inglês *Polymerase Chain Reaction*), de acordo com o descrito por Bannoehr *et al.* (2007). A detecção do gene *mecA* havia, igualmente, sido realizada por PCR. A conservação das amostras foi feita com conhecimento e permissão do proprietário.

O trabalho experimental foi realizado nas instalações laboratoriais da Universidade Lusófona de Humanidades e Tecnologias, em Lisboa.

2 – Determinação da resistência aos antibióticos

A determinação de resistência antibiótica dos isolados foi realizada através do teste de suscetibilidade de Kirby-Bauer por difusão em disco (Bauer *et al.*, 1966), de acordo com as recomendações do CLSI (2008). A metodologia eleita para este trabalho é a adotada atualmente pelo Laboratório de Análises Clínicas e Histopatologia da Faculdade de Medicina Veterinária (FMV-LACH) para análise antibiótica.

2.1 – Cultura bacteriana

Os isolados foram descongelados e semeados através de sementeira direta por estria, utilizando um aro estéril, sob a superfície de uma placa de agar nutriente (Oxoid Deutschland GmbH, Wesel, Alemanha) e, de seguida, colocadas na estufa (P Selecta[®], Barcelona, Espanha) a 37°C, em meio aeróbio, durante 24 horas.

2.2 – Preparação do inóculo

Com o auxílio de uma pipeta estéril, foram repicadas cerca de quatro a cinco colônias das amostras previamente incubadas.

Os microrganismos foram suspensos em 2 mL de solução salina estéril em tubos de ensaio e misturados recorrendo a um o vórtex (Velp Scientifica®, Barcelona, Espanha) durante cerca de 30 segundos, por forma a criar uma suspensão homogénea.

Os padrões de McFarland consistem em suspensões de sulfato de bário ou partículas de látex que permitem uma comparação visual da densidade bacteriana (Hudzicki, 2013). Não tendo sido possível o acesso aos mesmos, foi utilizada a espectrofotometria como método de padronização da densidade da suspensão bacteriana.

2.3 – Espectrofotometria

A densidade ótica de cada suspensão foi lida num espectrofotómetro (Biochrom Libra S22, Cambridge, Inglaterra) a um comprimento de onda de 600 nm, contra um branco de solução salina a 0,9%. A densidade ótica de cada suspensão bacteriana foi ajustada para 0,15.

2.3.1 – *Contagem bacteriana*

Em tubos de ensaio, foram realizadas oito diluições seriadas 1:10 em solução salina estéril. No primeiro tubo, contendo 4,5 mL de solução salina, foram adicionados 0,5 mL de uma das suspensões bacterianas, escolhida aleatoriamente, correspondendo assim à diluição de 10^{-1} . Foram retirados 0,5 mL deste primeiro tubo e colocados no tubo seguinte, com 4,5 mL de solução salina, obtendo-se a diluição de 10^{-2} , e assim sucessivamente até ao oitavo tubo, onde se atingiu a diluição de 10^{-8} .

Utilizando uma micropipeta, inocularam-se 100 µL de cada diluição no centro de uma placa de agar nutriente. Este é o volume de inóculo conveniente, em termos de espalhamento, absorção e cálculos (Wise, 2013).

Com o auxílio de uma vareta em forma de T, dispôs-se o inóculo pela superfície da placa, aplicando pressão ligeira e rodando a mesma em sentido centrífugo, por forma a permitir uma distribuição uniforme. Foi evitado espalhar o inóculo até ao rebordo do agar, uma vez que dificulta a contagem (Wise, 2013).

O processo foi repetido para os restantes tubos, e colocadas as placas na estufa, a 37°C durante 24 horas.

Após devida incubação, foi possível realizar a contagem das unidades formadoras de colónia (UFC's). Aquando da enumeração das UFC's, placas entre 20 a 300, ou 25 a 250 UFC's podem ser utilizadas para calcular o número de UFC's por mililitro da amostra inicial (Wise, 2013).

2.4 – Inoculação das placas de Mueller-Hinton

O meio de agar Mueller-Hinton (Oxoid Deutschland GmbH, Wesel, Alemanha) é o meio recomendado para utilizar em testes de suscetibilidade de bactérias não fastidiosas, já que apresenta boa reprodutibilidade, é pobre em inibidores de sulfonamida, trimetoprim e tetraciclina e permite um crescimento satisfatório da maioria dos patógenos não fastidiosos (Hudzicki, 2013).

Primeiramente foi imersa uma zaragatoa estéril na *cuvette* contendo o inóculo. Rodou-se a zaragatoa contra a parede lateral da *cuvette* (acima do nível do líquido), utilizando pressão firme, de forma a remover o fluido em excesso, sendo que a zaragatoa não deve estar demasiado embebida antes da inoculação da placa.

Inoculou-se a superfície seca da placa de Mueller-Hinton passando a zaragatoa em movimentos de vaivém próximos uns dos outros, três vezes por toda a superfície de agar, rodando a placa 60° de cada uma das vezes, para assegurar uma distribuição uniforme do inóculo.

Rodeou-se o rebordo do agar com a zaragatoa, no sentido dos ponteiros do relógio, de forma a recolher qualquer excesso de inóculo que possa ter permanecido nas margens.

Deixando a tampa da placa ligeiramente entreaberta, deixou-se repousar a placa à temperatura ambiente durante pelo menos três a cinco minutos, mas não mais de 15 minutos, para que a superfície da mesma seque antes de se proceder ao passo seguinte.

2.5 – Antibiograma

Como controlo foi utilizada a bactéria *Staphylococcus aureus* subsp. *aureus* (ATCC® 29213™), suscetível à oxacilina, sendo uma estirpe padrão para testes de suscetibilidade a antibióticos recomendada pelo CLSI.

Foram testados os seguintes discos de antibióticos (Figura 1): oxacilina (1 µg) (Oxoid, Hampshire, UK), amoxicilina + ácido clavulânico (20/10 µg) (Oxoid, Hampshire, UK), cefalotina (30 µg) (Oxoid, Hampshire, UK), clindamicina (2 µg) (Oxoid, Hampshire, UK), eritromicina (15 µg) (Oxoid, Hampshire, UK), trimetoprim-sulfametoxazol (1,25/23,75 µg) (Oxoid, Hampshire, UK), tetraciclina (30 µg) (Oxoid, Hampshire, UK), minociclina (30 µg) (Oxoid, Hampshire, UK), enrofloxacina (5 µg) (Oxoid, Hampshire, UK), pradofloxacina (5 µg) (Mast Diagnostics, Merseyside, UK), cloranfenicol (30 µg) (Oxoid, Hampshire, UK), rifampicina (5 µg) (Oxoid, Hampshire, UK), gentamicina (10 UI) (Bio-Rad, Marnes-la-Coquette, França) e amicacina (30 µg) (Oxoid, Hampshire, UK).



Figura 1: Discos de antibióticos testados.

Os discos dos antibióticos foram colocados na superfície do agar com uma pinça estéril à chama, seguida de ligeira pressão por forma a assegurar contacto uniforme com a superfície de agar e evitar descolamento durante a incubação.

Por isolado, cultivaram-se três placas de Mueller-Hinton agar e foram colocados quatro a cinco discos por placa. Os discos foram distribuídos de acordo com a recomendação de que não devem ser colocados mais perto do que 24 mm (centro a centro) na placa, bem como não devem ser colocados mais de cinco discos numa de 100 mm (Hudzicki, 2013).

Após a colocação dos discos, recolocou-se a tampa, inverteram-se as placas e dispuseram-se as mesmas na estufa entre 35-37°C, durante 24 horas. É requerida uma temperatura de 35°C com uma variação de $\pm 2^\circ\text{C}$, durante 16 a 18 horas (Hudzicki, 2013). É de notar que temperaturas acima de 35°C podem não permitir a deteção de estafilococos resistentes à metilicina (Hudzicki, 2013).

2.6 – Leitura dos resultados

As medições devem ser realizadas a olho nu e com uma régua, através da parte de trás da placa, com a mesma sobre uma superfície de cor negra e não refletora em ambiente bem iluminado (Figura 2). A medição deve ser, ainda, realizada através de visualização numa posição vertical, de forma a evitar erros de paralaxe e leituras erradas (Hudzicki, 2013). Aquando da medição deve ser incluído o diâmetro do disco, arredondando sempre para o milímetro acima (Hudzicki, 2013).



Figura 2: Medição do halo da zona de inibição bacteriana.

Se a colocação dos discos, ou o tamanho do halo, não permitir que seja medido o diâmetro do mesmo, deve ser mensurado desde o centro do disco até a extremidade da circunferência onde esteja presente uma margem distinta (raio) e multiplicado por dois, determinando, assim, o diâmetro da zona de inibição (Hudzicki, 2013).

O crescimento bacteriano até à extremidade do disco deve ser considerado zero milímetros.

Com a utilização de discos com trimetropin e sulfonamidas, antagonistas no meio podem permitir algum crescimento bacteriano ligeiro, assim sendo, este deve ser ignorado (quando crescimento de 20% ou inferior ao da restante placa) e mensurada a margem mais óbvia para determinar o diâmetro do halo (Hudzicki, 2013).

Com base numa caracterização prévia por PCR, que avaliou a presença ou ausência do gene *mecA* e o perfil de resistência ao disco de oxacilina, representante da classe dos betalactâmicos, os isolados foram divididos em MRSP e MSSP. Utilizando as linhas de orientação da CLSI determinou-se a resistência ou suscetibilidade de cada isolado a cada

antibiótico testado. De acordo com o protocolo de suscetibilidade de Kirby-Bauer por difusão em disco, cada halo deve ser categorizado como suscetível, intermédio e resistente (Hudzicki, 2013). A CLSI recomenda que, para efeitos clínicos, os resultados devam apenas ser classificados como suscetível ou resistente. Assim sendo, no presente trabalho, foram utilizadas apenas duas classificações, resistente e suscetível (Figura 3), englobando na categoria resistente os resultados considerados intermédios. Como previamente exposto, multirresistência foi definida como apresentando resistência a três ou mais classes antibióticas e não multirresistência aquando da apresentação de resistência a duas ou menos classes.



Figura 3: Isolado resistente à oxacilina, clindamicina e eritromicina (esquerda) e isolado suscetível aos mesmos antibióticos (direita).

2.7 – Análise estatística

Os dados recolhidos foram analisados recorrendo aos programas Microsoft Office Excel® 2010 e *Statistical Package for the Social Sciences* (SPSS) (IBM SPSS Chicago, IL) versão 16.0 para Microsoft Windows.

Foi utilizado o teste exato de Fisher, sendo que para a análise inferencial deste estudo foi assumido um nível de significância de 95% ($p = 0,05$). A análise por este teste foi realizada para verificar a existência de associação entre o grupo MRSP e a resistência a cada antibiótico testado, bem como a associação entre o grupo MSSP e a presença de suscetibilidade a cada antibiótico.

III – RESULTADOS

1 – Resultado da contagem bacteriana

A contagem bacteriana da diluição dos isolados, aferida para uma densidade ótica de 0.15, a 600 nm, revelou aproximadamente 1×10^7 UFC/mL.

2 – Divisão dos isolados em função da resistência à classe dos betalactâmicos

Os isolados foram divididos em *S. pseudintermedius* resistentes e suscetíveis à classe dos betalactâmicos, tendo sido utilizada a oxacilina como antibiótico marcador de resistência desta classe.

Após a avaliação dos antibiogramas, dos 55 isolados, 25 foram resistentes (MRSP, 45%) e 30 suscetíveis à oxacilina (MSSP, 55%) (Figura 4).

Estes dois grupos servirão de comparação no que respeita a resistência às outras classes antibióticas em estudo.

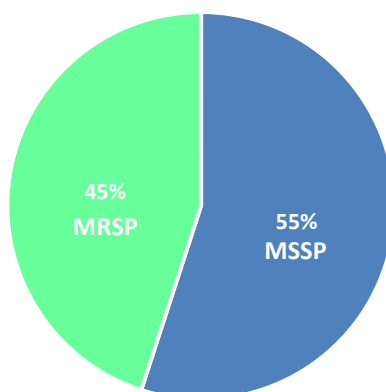


Figura 4: Frequência relativa (%) dos isolados MRSP e MSSP.

3 – Resistências aos antibióticos dos isolados de *Staphylococcus pseudintermedius*

Os grupos previamente formados (MRSP e MSSP) foram avaliados quanto à resistência às classes ou grupo de antibióticos seguidamente descritas.

Os resultados dos antibiogramas obtidos para cada isolado encontram-se descritos no Apêndice I.

A análise pelo teste exato de Fisher foi realizada para verificar a existência de associação entre o grupo MRSP e a resistência a cada antibiótico testado, bem como a associação entre o grupo MSSP e a presença de suscetibilidade a cada antibiótico.

A frequência relativa das resistências aos antibióticos testados no grupo MRSP e MSSP encontra-se descrita, posteriormente, na Figura 5.

3.1 – Resistência aos antibióticos de primeira escolha

3.1.1 – *Classe dos betalactâmicos*

3.1.1.1 – Grupo da amoxicilina-ácido clavulânico

Como antibiótico representante deste grupo foi utilizada a amoxicilina-ácido clavulânico, tratando-se de uma penicilina resistente às penicilinas através da adição do ácido clavulânico.

Foi observado, no grupo MRSP, que 92% (23/25) dos isolados apresentavam resistência à amoxicilina-ácido clavulânico. No grupo MSSP 100% (30/30) dos isolados apresentaram suscetibilidade a este antibiótico. A análise pelo teste exato de Fisher permitiu concluir que existe associação entre os resultados obtidos para a oxacilina e amoxicilina-ácido clavulânico ($p = 0,000$).

3.1.1.2 – Grupo das cefalosporinas

Como antibiótico representante deste grupo foi utilizada a cefalotina (cefalosporina de 1ª geração).

Em relação ao grupo MRSP, 88% (22/25) dos isolados apresentaram resistência, e, no grupo MSSP, 100% (30/30) dos isolados revelaram-se suscetíveis. A análise pelo teste exato de Fisher permitiu concluir que existe associação entre os resultados obtidos para a oxacilina e cefalotina ($p = 0,000$).

3.1.3 – *Classe das lincosamidas*

Como antibiótico representante desta classe foi utilizada a clindamicina.

Foram observados 96% (24/25) de isolados resistentes no grupo MRSP e no grupo MSSP 57% (17/30) apresentaram-se suscetíveis. A análise pelo teste exato de Fisher permitiu concluir que existe associação entre os resultados obtidos para a oxacilina e clindamicina ($p = 0,000$).

3.1.4 – Classe dos macrólidos

A eritromicina foi utilizada como representante desta classe.

Foi observado que no grupo MRSP 96% (24/25) dos isolados demonstraram resistência à eritromicina, e no grupo MSSP 53% (16/30) demonstraram suscetibilidade. A análise pelo teste exato de Fisher permitiu concluir que existe associação entre os resultados obtidos para a oxacilina e eritromicina ($p = 0,000$).

3.1.5 – Classe das sulfonamidas

Como antibiótico representante desta classe foi utilizado o sulfametaxol potenciado pelo trimetoprim.

No grupo MRSP 92% (23/25) dos isolados apresentaram resistência, e no grupo MSSP 73% (22/30) demonstraram suscetibilidade. A análise pelo teste exato de Fisher permitiu concluir que existe associação entre os resultados obtidos para a oxacilina e sulfametaxol-trimetoprim ($p = 0,000$).

Na tabela seguinte serão referidos o número de isolados apresentando resistência e suscetibilidade a cada antibiótico, nos respectivos grupos MRSP e MSSP, bem como o *p-value*.

Tabela 1: Número de isolados resistentes e suscetíveis a antibióticos de primeira escolha nos grupos MRSP e MSSP.

	OXACILINA		<i>p-value</i>
	MRSP (n=25)	MSSP (n= 30)	
AMC resistente	23	0	0,000
suscetível	2	30	
CF resistente	22	0	0,000
suscetível	3	30	
CM resistente	24	13	0,000
suscetível	1	17	
E resistente	24	14	0,000
suscetível	1	16	
SXT resistente	23	8	0,000
suscetível	2	22	

AMC, Amoxicilina + Ácido clavulânico; CF, Cefalotina; CM, Clindamicina; E, Eritromicina; SXT, Trimetoprim-sulfametoxazol.

3.2 – Resistência aos antibióticos de segunda escolha

3.2.1 – Classe das tetraciclinas

Como antibiótico representante desta classe foi utilizada a tetraciclina, tendo sido também nesta classe avaliada a minociclina.

Foi possível observar para a tetraciclina, no grupo MRSP, 80% (20/25) de isolados resistentes e, no grupo MSSP, 30% (9/30) de isolados suscetíveis. A análise pelo teste exato de Fisher permitiu concluir que não existe associação entre os resultados obtidos para a oxacilina e tetraciclina ($p= 0,537$).

Em relação à minociclina, no grupo MRSP, 40% (10/25) dos isolados apresentaram resistência, e no grupo MSSP 33% (10/30) demonstraram suscetibilidade. A análise pelo teste exato de Fisher permitiu concluir que não existe associação entre os resultados obtidos para a oxacilina e minociclina ($p = 0,061$).

3.2.2 – Classe das fluoroquiolonas

Como antibiótico representante desta classe foi utilizada a enrofloxacin, tendo sido também nesta classe avaliada a pradofloxacin.

No que respeita o perfil de resistência à enrofloxacin, no grupo MRSP 88% (22/25) dos isolados apresentaram resistência, e no grupo MSSP 93% (28/30) demonstraram

suscetibilidade. A análise pelo teste exato de Fisher permitiu concluir que existe associação entre os resultados obtidos para a oxacilina e enrofloxacin (p = 0,000).

Para a pradofloxacin, no grupo MRSP 92% (23/25) dos isolados apresentaram resistência, e no grupo MSSP 93% (28/30) demonstraram suscetibilidade. A análise pelo teste exato de Fisher permitiu concluir que existe associação entre os resultados obtidos para a oxacilina e pradofloxacin (p = 0,000).

3.2.3 – Classe dos fenicóis

Como antibiótico representante desta classe foi utilizado o cloranfenicol.

No grupo MRSP foram observados 12% (3/25) de isolados resistentes, e no grupo MSSP 77% (23/30) de isolados suscetíveis. A análise pelo teste exato de Fisher permitiu concluir que não existe associação entre os resultados obtidos para a oxacilina e cloranfenicol (p = 0,318).

3.2.4 – Classe das ansamicinas

Como antibiótico representante desta classe foi utilizada a rifampicina.

No grupo MRSP 12% (3/25) dos isolados demonstraram resistência, e no grupo MSSP 97% (29/30) apresentaram suscetibilidade. A análise pelo teste exato de Fisher permitiu concluir que não existe associação entre os resultados obtidos para a oxacilina e rifampicina (p = 0,320).

3.2.5 – Classe dos aminoglicosídeos

Como antibiótico representante desta classe foi utilizado a gentamicina, tendo sido também, nesta classe, avaliada a amicacina.

Para a gentamicina, no grupo MRSP 88% (22/25) dos isolados demonstraram resistência, e no grupo MSSP 90% (27/30) demonstraram suscetibilidade. A análise pelo teste exato de Fisher permitiu concluir que existe associação entre os resultados obtidos para a oxacilina e gentamicina (p = 0,000).

Em relação à amicacina, no grupo MRSP 8% (2/25) dos isolados demonstraram resistência e no grupo MSSP 97% (29/30) demonstraram suscetibilidade. A análise pelo teste

exato de Fisher permitiu concluir que não existe associação entre os resultados obtidos para a oxacilina e amicacina ($p = 0,585$).

Tabela 2: Número de isolados resistentes e suscetíveis a antibióticos de segunda escolha nos grupos MRSP e MSSP.

	OXACILINA		<i>p-value</i>
	MRSP (n=25)	MSSP (n= 30)	
TE resistente	20	21	0,537
suscetível	5	9	
MH resistente	10	20	0,061
suscetível	15	10	
ENR resistente	22	2	0,000
suscetível	3	28	
P resistente	23	2	0,000
suscetível	2	28	
CLOR resistente	3	7	0,318
suscetível	22	23	
RA resistente	3	1	0,320
suscetível	22	29	
GM resistente	22	3	0,000
suscetível	3	27	
AK resistente	2	1	0,585
suscetível	23	29	

TE, Tetraciclina; MH, Minociclina; ENR, Enrofloxacina; P, Pradofloxacina; CLOR, Cloranfenicol; RA, Rifampicina; GM, Gentamicina; AK, Amicacina.

Na figura abaixo, encontram-se resumidos os resultados obtidos para todos os antibióticos testados.

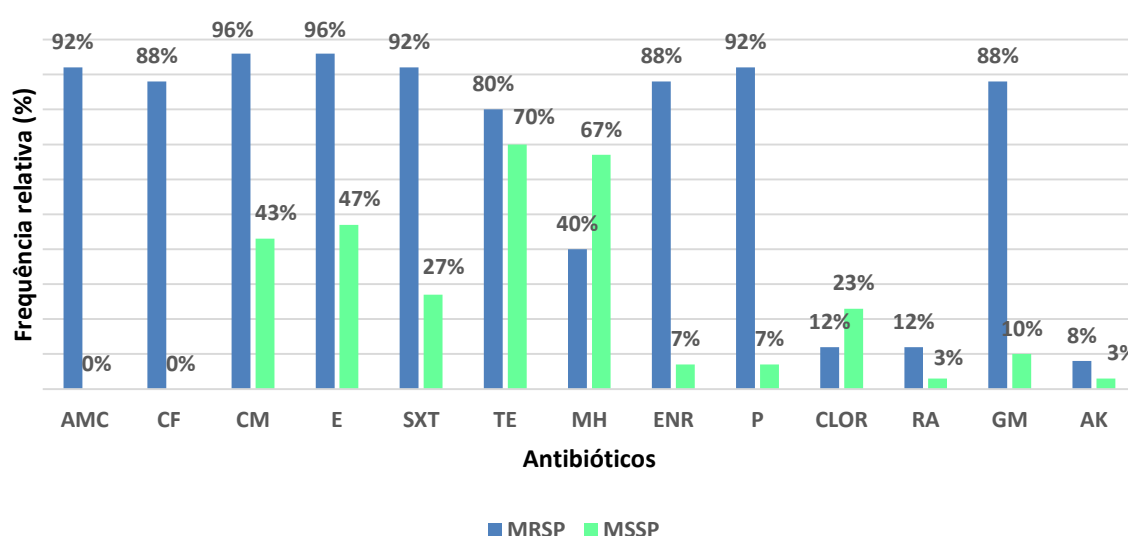


Figura 5: Frequência relativa (%) das resistências a antibióticos no grupo MRSP e MSSP. AMC, Amoxicilina + Ácido clavulânico; CF, Cefalotina; CM, Clindamicina; E, Eritromicina; SXT, Trimetoprim-sulfametoxazol; TE, Tetraciclina; MH, Minociclina; ENR, Enrofloxacina; P, Pradofloxacina; CLOR, Cloranfenicol; RA, Rifampicina; GM, Gentamicina; AK, Amicacina.

4 – Determinação de multirresistências e relação com MRSP e MSSP

Os isolados de *S. pseudintermedius* foram, ainda, classificados em multirresistentes e não multirresistentes e posteriormente comparados dentro dos grupos MRSP e MSSP.

Foi possível averiguar que, dos 55 isolados, 36 apresentaram multirresistência (65%), e os restantes 19 demonstraram-se não multirresistentes (35%). Dentro do grupo multirresistente foi, ainda, possível verificar que 67% (24/36) dos isolados eram MRSP e 33% (12/36) MSSP, enquanto que no grupo não multirresistente 95% (18/19) eram MSSP e apenas 5% (1/19) MRSP (Figura 6).

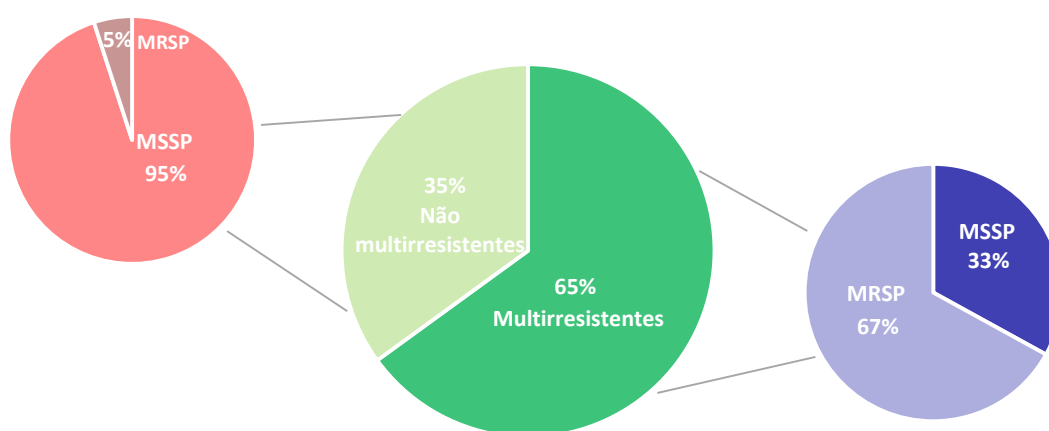


Figura 6: Frequência relativa (%) dos isolados multirresistentes e não multirresistentes.

V – DISCUSSÃO

O uso de antibióticos é o fator decisivo mais importante para a emergência de resistência bacteriana, sendo que a partir do momento em que os genes de resistência se encontram presentes, a seleção para a sua expressão por parte da bactéria contribui para facilitar este desenvolvimento (Rantala *et al.*, 2004; Ganière *et al.*, 2005; Loeffler *et al.*, 2007).

O presente estudo compreendeu 55 isolados de *S. pseudintermedius*, recolhidos em consulta de dermatologia de cães com piodermite bacteriana superficial. Com base numa caracterização prévia por PCR, que avaliou a presença ou ausência do gene *mecA* e o perfil de resistência ao disco de oxacilina, representante da classe dos betalactâmicos, estes isolados foram divididos em dois grupos: MRSP e MSSP. Os isolados foram testados para a sua suscetibilidade a antibióticos de primeira e segunda escolha, classificados como resistentes e suscetíveis aos antibióticos testados, em multirresistentes se observada resistência a três ou mais classes antibióticas e não multirresistentes se resistentes a duas ou menos classes. Previamente à recolha dos isolados em estudo, todos os animais haviam realizado tratamento antibiótico em diversas ocasiões. Os resultados apresentados neste estudo podem diferir da restante literatura científica, uma vez que a amostra é composta por isolados recolhidos em clínica de referência de dermatologia ao invés de clínica de primeira abordagem.

A importância da realização da avaliação da suscetibilidade à oxacilina em isolados de *S. pseudintermedius* prende-se com o facto de esta servir como indicador da resistência mediada pelo gene *mecA*, quando não é possível a sua deteção por PCR, o método de referência. Apesar das penicilinas isoxazolil não serem atualmente utilizadas como terapêutica, este perfil de resistência provoca grande impacto na decisão de tratamento envolvendo a classe dos betalactâmicos. Desta forma, e de acordo com as recomendações do CLSI, isolados apresentando resistência à oxacilina são descritos como resistentes aos restantes antibióticos da classe dos betalactâmicos, com exceção das cefalosporinas anti-MRSA (Jones *et al.*, 2007; Loeffler *et al.*, 2007; Bemis *et al.*, 2009; Bond & Loeffler, 2012; Frank & Loeffler, 2012; Perreten *et al.*, 2013). A presente amostra foi, assim, composta por 45% de isolados MRSP e 55% de isolados MSSP.

No que respeita à amoxicilina-ácido clavulânico e cefalotina, foi possível observar que o perfil de resistência era semelhante na larga maioria dos isolados. No grupo MRSP, dois isolados apresentaram resistência à amoxicilina-ácido clavulânico e suscetibilidade à cefalotina, um isolado apresentou resistência à cefalotina e suscetibilidade à amoxicilina-ácido clavulânico e outro suscetibilidade a ambos. No grupo MSSP todos os isolados foram

suscetíveis a ambos os antibióticos. Apesar dos resultados obtidos no grupo MRSP demonstrarem uma percentagem de resistência de 92% para a amoxicilina e 88% para a cefalotina, estes isolados, de acordo com as recomendações do CLSI e linhas de orientação da ISCAID, devem ser considerados, e reportados, como resistentes. No grupo MSSP, como expectável, não foi observada presença de resistência, em ambos os antibióticos.

Comparando as classes das lincosamidas e macrólidos, foi possível averiguar que, no grupo MRSP, todos os isolados apresentaram resistência à clindamicina e à eritromicina, excetuando um isolado. Em relação ao grupo MSSP foi observado um padrão de resistência semelhante em ambos antibióticos, com treze isolados apresentando resistência a ambos e apenas um resistente à eritromicina, mas suscetível à clindamicina. A percentagem de resistência para a clindamicina e eritromicina, no grupo MRSP, foi de 96% para ambos os antibióticos, demonstrando assim presença de um elevado nível de resistência nestes isolados. No grupo MSSP é possível concluir que existe dificuldade na previsão de um padrão de resistência, uma vez que os resultados são de 43% de isolados resistentes à clindamicina e 47% à eritromicina. Devido à sua boa absorção oral, distribuição em tecidos e elevada concentração intracelular, as lincosamidas e macrólidos são considerados boas escolhas antibióticas como primeiro tratamento para piodermite canina causada por estafilococos. No entanto, particularmente em infeções recorrentes, o seu uso é limitado por um nível elevado de resistência, sobretudo quando a presença de resistência cruzada entre ambos antibióticos é comum (Ganière *et al.*, 2005; Frank & Loeffler, 2012). A interpretação da suscetibilidade às lincosamidas deve ser cuidada, uma vez que pode ocorrer resistência cruzada com macrólidos. Uma vez que a prevalência do gene *ermB* é elevada em MRSP, deve interpretar-se a existência de resistência cruzada quando o isolado demonstra resistência *in vitro* à eritromicina e suscetibilidade à clindamicina, não tendo sido efetuado previamente o *D-test* (Perreten *et al.*, 2010; Frank & Loeffler, 2012; Kadleck & Schwarz, 2012; Detwiler *et al.*, 2013). No presente estudo, tal foi observado em apenas um isolado.

Em relação ao trimetoprim-sulfametoxazol, no grupo MRSP a maioria dos isolados apresentaram resistência, com a exceção de dois, e no grupo MSSP oito isolados apresentaram resistência. No grupo MRSP verificou-se um padrão de resistência elevado, com uma percentagem de 92%, e no grupo MSSP uma baixa percentagem de resistência, 27%. As sulfonamidas potenciadas são antibióticos de primeira escolha utilizados com alguma frequência para o tratamento de piodermite no cão (Ganière *et al.*, 2005; Hillier *et al.*, 2014). A resistência às sulfonamidas ocorre devido a um excesso de produção de PABA, mediado pelos

genes *sul*; a resistência ao trimetoprim é mediada pela enzima dihidrofolato redutase codificada pelo gene *dfr* (Werckenthin *et al.*, 2001; Ganière *et al.*, 2005; Prescott, 2013c).

Para a classe das tetraciclinas, no grupo MRSP, metade dos isolados que apresentaram resistência à tetraciclina eram suscetíveis à minociclina, sendo que cinco isolados o eram aos dois antibióticos. Foi, ainda, observado um perfil de resistência semelhante para a maioria dos isolados no grupo MSSP, sendo que apenas um apresentou resistência à tetraciclina e suscetibilidade à minociclina. Para a tetraciclina foi possível observar um padrão de resistência elevado, tanto no grupo MRSP com 80%, como no grupo MSSP, com 70% de isolados resistentes. Em relação à minociclina, a percentagem de resistência no grupo MRSP foi bastante inferior, sendo de 40%, no entanto, o grupo MSSP, apresentou um padrão de resistência semelhante ao da tetraciclina, com 67% de isolados resistentes. Assim sendo, e além da sua utilização estar recomendada nas linhas de orientação da ISCAID, a minociclina representa um antibiótico de segunda escolha bastante útil. Uma vez que os genes *tet(K)* e *tet(L)* que conferem resistência à tetraciclina e doxiciclina não o conferem à minociclina, este antibiótico representa uma opção vantajosa contra estirpes multirresistentes contendo apenas estes genes, particularmente o clone ST71 bastante comum na Europa (Roberts, 1996; Frank & Loeffler, 2012; Papich, 2013; Weese *et al.*, 2013; Hillier *et al.*, 2014; Maaland *et al.*, 2014).

Para a classe das fluoroquinolonas, no grupo MRSP todos os isolados apresentaram resistência tanto para a enrofloxacinina como para a pradofloxacinina, exceto dois que revelaram suscetibilidade a ambos e um que se revelou suscetível à enrofloxacinina mas resistente à pradofloxacinina. O perfil de resistência para ambos antibióticos foi semelhante no grupo MSSP, com apenas dois isolados apresentando resistência a ambas. Para ambas, enrofloxacinina e pradofloxacinina, foi observado, no grupo MRSP, um padrão de resistência elevado, com uma percentagem de 88 e 92%, respetivamente. Já no grupo MSSP a percentagem de resistência foi bastante reduzida, sendo de 7% para ambos antibióticos. Apesar de mutações no genes *gyrA* e *grrA* serem necessárias para resistência por parte de estafilococos, estudos revelam que uma única alteração no gene *gyrA* é suficiente para conferir resistência a fluoroquinolonas de gerações anteriores. Tem sido sugerido que estirpes mutantes de *S. pseudintermedius* tenham mantido a sua suscetibilidade a novas gerações de fluoroquinolonas devido a ser necessária uma alteração adicional no gene *grrA* (Intorre *et al.*, 2007; Vanni *et al.*, 2009; Onuma *et al.*, 2012; Couto *et al.*, 2014).

Para o cloranfenicol foi observada, no grupo MRSP, resistência em apenas três isolados e no grupo MSSP em sete. Tanto no grupo MRSP como MSSP, a percentagem de

resistências foi reduzida, sendo de 12 e 23%, respetivamente. Este antibiótico raramente é utilizado para tratamento de infeção por *S. pseudintermedius*. No entanto, a resistência é normalmente devida à expressão da acetiltransferase do cloranfenicol, codificada pelos genes *cat*, localizados em plasmídeos e ADN cromossómico (Schwarz *et al.*, 1995; Ganière *et al.*, 2005; Kadlec & Schwarz, 2012). Contudo, os genes *cat* não se encontram envolvidos em resistências ao florfenicol, um derivado do cloranfenicol, pelo que poderá ser uma opção mais segura (Schwarz *et al.*, 2000; Kehrenberg & Schwarz, 2004; Ganière *et al.*, 2005).

No que respeita a resistência à rifampicina, no grupo MRSP foram observados apenas três isolados resistentes e no grupo MSSP apenas um. Foi possível observar uma percentagem bastante baixa de resistência à rifampicina, com 12% de isolados resistentes no grupo MRSP, e apenas 3% no MSSP. A resistência à rifampicina é mediada pelo gene *rpoB*, sendo que a sua presença em estafilococos é, normalmente, rara (Perreten *et al.*, 2010; Kadlec *et al.*, 2011). Isolados resistentes podem estar relacionados com administração prévia do antibiótico, transferência de um isolado resistente à rifampicina de um cão a que tenha sido anteriormente administrada ou mutação espontânea do gene *rpoB* (Kadlec *et al.*, 2011; Kadlec & Schwarz, 2012; Couto *et al.*, 2014).

Em relação à resistência nos aminoglicosídeos, no grupo MRSP, todos os isolados, à exceção de três, apresentaram resistência à gentamicina, enquanto que para a ampicacina apenas dois apresentaram resistência. Ainda no grupo MRSP, apenas um dos isolados que apresentou resistência à ampicacina era suscetível à gentamicina. Em relação ao grupo MSSP, apenas três apresentaram resistência à gentamicina, sendo ainda que apenas um desses isolados também apresentava resistência à ampicacina. A percentagem de resistência para a ampicacina, em ambos os grupos, foi bastante reduzida, sendo de 8% no MRSP e de 3% no MSSP. Os aminoglicosídeos não são utilizados, por rotina, no tratamento de infeções estafilocócicas, particularmente devido aos efeitos nefrotóxicos e inconveniência da administração parentérica. No entanto, com o aumento da prevalência de MRSP, a sua utilização torna-se uma alternativa necessária. Inativação por enzimas celulares modificadoras de aminoglicosídeos constitui o mecanismo principal de resistência aos aminoglicosídeos. Este mecanismo é mediado pelos genes *aacA-aphD* e *aph-IIIa* nos casos da gentamicina e ampicacina, respetivamente. A ampicacina constitui, então, uma opção menos nefrotóxica, estando recomendada a sua utilização nas linhas de orientação da ISCAID (Frank & Loeffler, 2012; Kadlec & Schwarz, 2012; Gold *et al.*, 2014; Hillier *et al.*, 2014). Para a gentamicina, observou-se uma elevada

percentagem de resistência no grupo MRSP, 88%. Já no grupo MSSP, apenas 10% dos isolados se demonstraram resistentes.

No que diz respeito à multirresistência, 65% (36/55) dos isolados mostraram-se multirresistentes e 35% (19/55) não multirresistentes. Dentro do grupo multirresistente foi, ainda, possível verificar que 67% (24/36) dos isolados eram MRSP e 33% (12/36) MSSP, sendo que no grupo não multirresistente 95% (18/19) eram MSSP e 5% (1/19) MRSP. Loeffler *et al.* (2007) referem que 23% (12/51) dos isolados submetidos a clínica de referência eram resistentes a pelo menos cinco classes de antibióticos e Ganière *et al.* (2005) observaram uma incidência de multirresistência de 42% (21/50). Holm *et al.* (2002) observaram, ainda, presença de multirresistência em 20% (186/394) dos estafilococos isolados em casos de primeira ocorrência e 45% (208/394) em casos recorrentes. Estes resultados contrastam, assim, com o presente estudo em que foi observada uma percentagem mais elevada. Sasaki *et al.* (2007a), Gómez-Sanz *et al.* (2011) e Couto *et al.* (2014) relataram que todos os isolados MRSP se demonstraram multirresistentes, o que uma vez mais difere do presente estudo. Apesar da maioria dos isolados multirresistentes serem MRSP, foi possível observar uma presença considerável de isolados MSSP apresentando igualmente um perfil multirresistente. A multirresistência tem sido referida em MRSP, mesmo na ausência de resistência à oxacilina, ou seja, em isolados MSSP (Holm *et al.*, 2002; Guardabassi *et al.*, 2004; Jones *et al.*, 2007; Couto *et al.*, 2014). O isolado número 10, sendo MSSP, é um ótimo exemplo, sendo que se apresentou suscetível apenas à amoxicilina-ácido clavulânico, cefalotina e cloranfenicol e resistente aos restantes antibióticos testados. Também é interessante tomar como exemplo o isolado número 45 que, embora sendo MRSP, apenas apresenta resistência à amoxicilina-ácido clavulânico, inserindo-se, assim, na pequena percentagem de isolados MRSP não multirresistentes. A inclusão do teste de suscetibilidade ao disco de oxacilina pode, assim, melhorar a deteção de isolados multirresistentes, apesar da multirresistência não se encontrar diretamente ligada à resistência à meticilina (Ganière *et al.*, 2005; Loeffler *et al.*, 2007).

A importância do presente trabalho prende-se com a compreensão dos padrões de resistência de *S. pseudintermedius*, por forma a ser possível responder de uma forma eficiente ao número crescente de casos de piodermite superficial bacteriana por MRSP e multirresistentes. A presença de níveis elevados de resistência a antibióticos de primeira escolha, que muitas vezes são utilizados de forma empírica e sem realização de antibiograma prévio, limita bastante as opções de tratamento por parte do Médico Veterinário, particularmente em isolados MRSP, apesar de no grupo MSSP ainda se detetarem evidentes

suscetibilidades. A percentagem de isolados multirresistentes é, também, alarmante, mesmo em isolados MSSP, o que diminui o número de alternativas antibióticas disponíveis em casos cujas opções antibióticas são limitadas, o que ocorre frequentemente em clínica de referência.

Ainda não se conhece ao certo o impacto de infeções por *S. pseudintermedius* na saúde pública, através de troca de material genético, pelo que mais estudos serão necessários para a sua avaliação. O trabalho de investigação no que respeita aos mecanismos de resistência antibiótica também surge como um ponto importante para a compreensão do desenvolvimento dos mesmos, auxiliando na perceção de padrões de resistência mais comuns. A dificuldade da indústria farmacêutica em responder com novas alternativas para o tratamento de infeções complicadas é também perceptível, pelo que o aparecimento de novas alternativas antibióticas não é frequente nem suficientemente eficiente nestes casos.

O tratamento de infeções por MRSP e MSSP passa pelo mesmo princípio, uma combinação de terapia tópica e sistémica. Infeções por MRSP multirresistentes, além de frequentes, representam um desafio para terapia antibiótica em Medicina Veterinária, devido às limitadas opções de tratamento em muitos casos. A utilização, por vezes indevida, de antibióticos que são importantes para tratamento de infeções graves por MRSA em humanos, coloca questões éticas sobre a utilização de antibióticos específicos de Medicina Humana em Medicina Veterinária. A consulta e aplicação das linhas de orientação para o tratamento de piodermite bacteriana superficial criadas pela ISCAID apresentam-se fundamentais para o diagnóstico, melhor compreensão e aplicação de uma terapêutica adequada a cada caso. Em casos de infeções com poucas ou nenhuma alternativas antibióticas sistémicas, ou mesmo como primeira abordagem na existência de apenas lesões ligeiras, a terapêutica tópica constitui uma alternativa importante. A exploração desta opção terapêutica deverá, também, ser investigada, por forma a diminuir o uso de antibióticos em clínica de pequenos animais.

O uso de biocidas, como a clorhexidina, confere inúmeras vantagens, incluindo melhoria das lesões, reduzindo o tempo de administração de antibioterapia sistémica, bem como auxílio no restauro da estrutura e funções da pele.

A implementação de estratégias de higiene rigorosas, bem como educação dos proprietários e outras pessoas em contato com cães infetados por MRSP é, também, importante por forma a limitar a transmissão ao proprietário e infeções nosocomiais.

Estudos futuros com uma amostra de maiores dimensões poderão providenciar mais informação no que diz respeito ao padrão de resistências de *S. pseudintermedius* em Portugal em clínica de primeira opinião e de referência. Torna-se fundamental, ainda, para além da

realização de antibiograma, a avaliação por técnica da concentração mínima inibitória, uma vez que é o método de eleição utilizado em investigação, o que permitirá comparação de resultados mais precisa, e estudos moleculares acerca da presença dos genes que conferem resistência aos antibióticos.

V – CONCLUSÃO

As infecções por *S. pseudintermedius* constituem uma causa importante de morbidade e mortalidade no cão, podendo, ainda, estar envolvidas em infecções zoonóticas. A rápida emergência de resistência à meticilina, bem com o aparecimento de estirpes multirresistentes de *S. pseudintermedius*, tem-se tornado um desafio terapêutico, em Medicina Veterinária, limitando as opções antibióticas disponíveis para uso.

Esta problemática exige uma utilização prudente e direcionada do uso de antibióticos, sendo que a realização do antibiograma e da técnica de CMI, aplicando as recomendações elaboradas pelo CLSI, na prática clínica se torna uma ferramenta imprescindível para determinar o plano terapêutico mais adequado em cada caso.

Neste sentido, foi realizado o presente trabalho com o objetivo de averiguar o padrão de resistência de *S. pseudintermedius* em clínica de referência. Os resultados obtidos permitiram concluir que o número de antibióticos disponíveis para uso em infecções por MRSP, se encontra bastante limitado, particularmente em relação a antibióticos de primeira escolha que, muitas vezes, são utilizados de forma empírica. Assim, foi possível obter um panorama da realidade que se enfrenta no dia-a-dia da clínica de referência. A percentagem de isolados, quer MRSP ou MSSP, resistentes a antibióticos de primeira escolha é alarmante, pelo que a utilização de antibióticos de segunda escolha se torna cada vez mais comum. A escassez óbvia de alternativas antibióticas em casos de isolados MRSP e multirresistentes, torna o tratamento extremamente desafiante e, por vezes, frustrante.

Para além da importância fundamental da continuação de estudos de investigação nesta área, torna-se, ainda, de maior relevância a divulgação e sensibilização da problemática da resistência antibiótica perante a comunidade Médico-Veterinária. A aplicação de antibioterapia empírica em clínica de primeira opinião, sem realização de antibiograma, pode resultar, além de um tratamento mal sucedido, em perdas económicas, com a procura, por parte do cliente, de outras alternativas.

Num caminho cada vez mais dirigido a uma era pré-antibiótica, é de extrema importância o alerta para esta problemática que, apesar de pouco divulgada, é uma realidade alarmante e cada vez mais comum.

VI – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Allaker, R.P., Lloyd, D.H., & Simpson, A.I. (1992a). Occurrence of *Staphylococcus intermedius* on the hair and skin of normal dogs. *Res Vet Sci*, 52(2), 174–176.

Allaker, R.P., Jensen, I., Lloyd, D.H. & Lamport, A.I. (1992b). Colonization of neonatal puppies by staphylococci. *Br Vet J*, 148(6), 523–528.

Albarellos, G., Montoya, L., Ambros, L., Kreil, V., Hallu, R., & Rebuelto, M. (2004). Multiple once-daily dose pharmacokinetics and renal safety of gentamicin in dogs. *J Vet Pharmacol Ther*, 27(1), 21–25.

Albarellos, G.A., Kreil, V.E., Ambros, L.A., Waxman, S., Montoya, L., Tarragona, L., *et al.* (2008). Pharmacokinetics of erythromycin after the administration of intravenous and various oral dosage forms to dogs. *J Vet Pharmacol Ther*, 31(6), 496–500.

Albarellos, G.A., Montoya, L., & Landoni, M.F. (2011). Pharmacokinetics of erythromycin after intravenous, intramuscular and oral administration to cats. *Vet J*, 187(1), 129–132.

Andrews, J.M. (2002). Determination of minimum inhibitory concentrations. *J Antimicrob Chemother*, 49(6), 1049.

ATCC® In Partnership with LGC Standards.
Staphylococcus aureus subsp. *aureus* (ATCC® 29213™). Acedido em 14 Julho 2014 em <http://www.lgcstandards-atcc.org/Products/All/29213.aspx>

Authier, S., Paquette, D., Labrecque, O., & Messier, S. (2006). Comparison of susceptibility to antimicrobials of bacterial isolates from companion animals in a veterinary diagnostic laboratory in Canada between 2 time points 10 years apart. *Can Vet J*, 47(8), 774–778.

Bajwa, J., Charach, M., & Duclos, D. (2013). Adverse effects of rifampicin in dogs and serum alanine aminotransferase monitoring recommendations based on a retrospective study of 344 dogs. *Vet Dermatol*, 24(6), 570–575.

Bassett, R.J., Burton, G.G., & Robson, D.C. (2004). Antibiotic responsive ulcerative dermatoses in German Shepherd Dogs with mucocutaneous pyoderma. *Aust Vet J*, 82(8), 485–489.

Bannoehr, J., Zakour, N.L.B., Waller, A.S., Guardabassi, L., Thoday, K.L., van den Broek, A.H.M., *et al.* (2007). Population genetic structure of the *Staphylococcus intermedius* group: insights into agr diversification and the emergence of methicillin-resistant strains. *J Bacteriol*, 189(23), 8685–8692.

Bannoehr, J., & Guardabassi, L. (2012). *Staphylococcus pseudintermedius* in the dog: taxonomy, diagnostics, ecology, epidemiology and pathogenicity. *Vet Dermatol*, 23(4), 253–266.

Batzias, G.C., Delis, G.A., & Athanasiou, L.V. (2005). Clindamycin bioavailability and pharmacokinetics following oral administration of clindamycin hydrochloride capsules in dogs. *Vet J*, 170(3), 339–345.

Bauer, R.W., Kirby, M.D.K., Sherris, J.C., & Turck, M. (1966). Antibiotic susceptibility testing by standard single disc diffusion method. *Am J Clin Pathol*, 45(4), 493–496.

Beco, L., Guaguère, E., Méndez, C.L., Noli, C., Nuttall, T., & Vroom, M. (2013). Suggested guidelines for using systemic antimicrobials in bacterial skin infections: part 2 – antimicrobial choice, treatment regimens and compliance. *Vet Rec*, 172(6), 156–160.

Begg, E.J., & Barclay, M.L. (1995). Aminoglycosides – 50 years on. *Br J Clin Pharmacol*, 39(6), 597–603.

Bemis, D.A., Jones, R.D., Frank, L.A., & Kania, S.A. (2009). Evaluation of Susceptibility Test Breakpoints Used to Predict *mecA*-Mediated Resistance in *Staphylococcus pseudintermedius* Isolated from Dogs. *J Vet Diagn Invest*, 21(1), 53–58.

Bettenay, S.V., Mueller, R.S., & Dell'Osa, D. (1998). Doxycycline hydrochloride in the treatment of canine pyoderma. *Australian Veterinary Practitioner*, 28(1), 14-19.

Bishop, Y. (2005). *The Veterinary Formulary*. (6^a Ed., pp. 149-156). Cambridge: the Pharmaceutical Press.

Bloom, P.B., & Rosser, E.J. (2001). Efficacy of once-daily clindamycin hydrochloride in the treatment of superficial bacterial pyoderma in dogs. *J Am Anim Hosp Assoc*, 37(6), 537–542.

Bloom, P. (2013). Canine superficial bacterial folliculitis: current understanding of its etiology, diagnosis and treatment. *Vet J*, 199(2), 217–222.

Bond, R., & Loeffler, A. (2012). What's happened to *Staphylococcus intermedius*? Taxonomic revision and emergence of multi-drug resistance. *J Small Anim Pract*, 53(3), 147–154.

Bryan, J., Frank, L.A., Rohrbach, B.W., Burgette, L.J., Cain, C.L., & Bemis, D.A. (2012). Treatment outcome of dogs with meticillin-resistant and meticillin-susceptible *Staphylococcus pseudintermedius* pyoderma. *Vet Dermatol*, 23(4), 361–368.

Carlier, M., Scoreaux, B., & Zeneberg, A. (1990). Cellular uptake, localization and activity of fluoroquinolones in uninfected and infected macrophages. *J Antimicrob Chemother*, 26(suppl B), 27–39.

Cester, C.C., & Toutain, P.L. (1997). A comprehensive model for enrofloxacin to ciprofloxacin transformation and disposition in dog. *J Pharm Sci*, 86(10), 1148–1155.

Chambers, H.F. (1997). Methicillin resistance in staphylococci: molecular and biochemical basis and clinical implications. *Clin Microbiol Rev*, 10(4), 781–791.

Chopra, I., & Roberts, M. (2001). Tetracycline Antibiotics: Mode of Action, Applications, Molecular Biology, and Epidemiology of Bacterial Resistance. *Microbiol Mol Biol Rev*, 65(2), 232–260.

CLSI. (2008) Performance Standards for Antimicrobial Disk and Dilution Susceptibility Tests for Bacteria Isolated From Animals; Approved Standard – 4th Edition. CLSI document V0.1-A0.4, 2013, Clinical Laboratory Standards Institute, Wayne.

Coombs, G.W., Nimmo, G.R., Bell, J.M., Huygens, F., O'Brien, F.G., Malkowski, M.J., *et al.* (2004). Genetic Diversity among Community Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* strains causing outpatient infections in Australia. *J Clin Microbiol*, 42(10), 4735–4743.

Couto, N., Belas, A., Couto, I., Perreten, V., & Pomba, C. (2013). Genetic Relatedness, Antimicrobial and Biocide Susceptibility Comparative Analysis of Methicillin-Resistant and -Susceptible *Staphylococcus pseudintermedius* from Portugal. *Microb Drug Resist*, 20(4), 364–371.

dell Castillo, J.R.E. (2013). Tetracyclines. In: S. Giguère, J.F. Prescott, P.M. Dowling, *Antimicrobial Therapy in Veterinary Medicine* (5^a Ed., pp. 257-268). Iowa: John Wiley & Sons, Inc.

DeManuelle, T.C., Ihrke, P.J., Brandt, C.M., Kass, P.H., Vuilliet, P.R. (1998) Determination of skin concentrations of enrofloxacin in dogs with pyoderma. *Am J Vet Res*, 59(12), 1599-1604.

Descloux, S., Rossano, A., & Perreten, V. (2008). Characterization of new staphylococcal cassette chromosome *mec* (SCC*mec*) and topoisomerase genes in fluoroquinolone and methicillin-resistant *Staphylococcus pseudintermedius*. *J Clin Microbiol*, 46(5), 1818–1823.

Detwiler, A., Bloom, P., Petersen, A., & Rosser, E.J. (2013). Multi-drug and methicillin resistance of staphylococci from canine patients at a veterinary teaching hospital (2006-2011). *Vet Q*, 33(2), 60–67.

Devriese, L.A., Vancanneyt, M., Baele, M., Vaneechoutte, M., De Graef, E., Snauwaert, C., *et al.* (2005). *Staphylococcus pseudintermedius* sp. nov., a coagulase-positive species from animals. *Int J Syst Evol Microbiol*, 55(Pt 4), 1569–1573.

Devriese, L.A., Hermans, K., Baele, M., & Haesebrouck, F. (2009). *Staphylococcus pseudintermedius* versus *Staphylococcus intermedius*. *Vet Microbiol*, 133(1–2), 206–207.

Dowling, P.M. (2013a). Aminoglycosides and Aminocyclitols. In: S. Giguère, J.F. Prescott, P.M. Dowling, *Antimicrobial Therapy in Veterinary Medicine* (5^a Ed., pp. 233-256). Iowa: John Wiley & Sons, Inc.

Dowling, P.M. (2013b). Cloramphenicol, Thiamphenicol and Florfenicol. In: S. Giguère, J.F. Prescott, P.M. Dowling, *Antimicrobial Therapy in Veterinary Medicine* (5^a Ed., pp. 269-278). Iowa: John Wiley & Sons, Inc.

Dowling, P.M. (2013c). Miscellaneous Antimicrobials: Ionophores, Nitrofurans, Nitroimidazoles, Rifamycins, and Others. In: S. Giguère, J.F. Prescott, P.M. Dowling, *Antimicrobial Therapy in Veterinary Medicine* (5^a Ed., pp. 315-332). Iowa: John Wiley & Sons, Inc.

Duquette, R.A., & Nuttall, T.J. (2004). Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in dogs and cats: an emerging problem? *J Small Anim Pract*, 45(12), 591–597.

Fazakerley, J., Nuttall, T., Sales, D., Schmidt, V., Carter, S.D., Hart, C.A., *et al.* (2009). Staphylococcal colonization of mucosal and lesional skin sites in atopic and healthy dogs. *Vet Dermatol*, 20(3), 179–184.

Fernandes, C.J., O'Sullivan, M.V.N., Cai, Y., Kong, F., Zeng, X., Gilbert, G.L., *et al.* (2007). Agar dilution method for detection of inducible clindamycin resistance in *Staphylococcus* spp. *J Clin Microbiol*, 45(12), 4018–4020.

Fitzgerald, J.R. (2009). The *Staphylococcus intermedius* group of bacterial pathogens: species re-classification, pathogenesis and the emergence of meticillin resistance. *Vet Dermatol*, 20(5–6), 490–495.

Ford, M.M., Dubielzig, R.R., Giuliano, E.A., Moore, C.P., & Narfström, K.L. (2007). Ocular and systemic manifestations after oral administration of a high dose of enrofloxacin in cats. *Am J Vet Res*, 68(2), 190–202.

Fraatz, K., Heinen, K., Krebber, R., Edingloh, M. (2003) Skin concentrations and serum pharmacokinetics of pradofloxacin in dogs after multiple oral administrations at four different dosages. *J Vet Pharmacol Ther*, 26(1), 89.

Frank, L.A., Kania, S.A., Hnilica, K.A., Wilkes, R.P., & Bemis, D.A. (2003). Isolation of *Staphylococcus schleiferi* from dogs with pyoderma. *J Am Vet Med Assoc*, 222(4), 451–454.

Frank, L.A., & Loeffler, A. (2012). Meticillin-resistant *Staphylococcus pseudintermedius*: clinical challenge and treatment options. *Vet Dermatol*, 23(4), 283–291.

Ganière, J.-P., Medaille, C., & Mangion, C. (2005). Antimicrobial drug susceptibility of *Staphylococcus intermedius* clinical isolates from canine pyoderma. *J Vet Med B Infect Dis Vet Public Health*, 52(1), 25–31.

Gold, R.M., Cohen, N.D., & Lawhon, S.D. (2014). Amikacin Resistance in *Staphylococcus pseudintermedius* isolated from dogs. *J Clin Microbiol*, 52(10), 3641–3646.

Gómez-Sanz, E., Torres, C., Lozano, C., Sáenz, Y., & Zarazaga, M. (2011). Detection and characterization of methicillin-resistant *Staphylococcus pseudintermedius* in healthy dogs in La Rioja, Spain. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis*, 34(5), 447–453.

Gortel, K. (2013) Recognizing pyoderma: more difficult than it may seem. *Vet Clin North Am Small Anim Pract*, 43(1), 1-18.

Gough, A.W., Kasali, O.B., Sigler, R.E., & Baragi, V. (1992). Quinolone Arthropathy - Acute Toxicity to Immature Articular Cartilage. *Toxicol Pathol*, 20(3 Pt 1), 436–449.

Griffeth, G.C., Morris, D.O., Abraham, J.L., Shofer, F.S., & Rankin, S.C. (2008). Screening for skin carriage of methicillin-resistant coagulase-positive staphylococci and *Staphylococcus schleiferi* in dogs with healthy and inflamed skin. *Vet Dermatol*, 19(3), 142–149.

Guardabassi, L., Loeber, M.E., & Jacobson, A. (2004). Transmission of multiple antimicrobial-resistant *Staphylococcus intermedius* between dogs affected by deep pyoderma and their owners. *Vet Microbiol*, 98(1), 23–27.

Giguère, S. (2013a). Lincosamides, Pleuromutilins and Streptogramins. In: S. Giguère, J.F. Prescott, P.M. Dowling, *Antimicrobial Therapy in Veterinary Medicine* (5^a Ed., pp. 199-210). Iowa: John Wiley & Sons, Inc.

Giguère, S. (2013b). Macrolides, Azalides and Ketolides. In: S. Giguère, J.F. Prescott, P.M. Dowling, *Antimicrobial Therapy in Veterinary Medicine* (5^a Ed., pp. 211-233). Iowa: John Wiley & Sons, Inc.

Giguère, S., & Dowling, P.M. (2013). Fluoroquinolones. In: S. Giguère, J.F. Prescott, P.M. Dowling, *Antimicrobial Therapy in Veterinary Medicine* (5^a Ed., pp. 295-314). Iowa: John Wiley & Sons, Inc.

Hajek, V. (1976). *Staphylococcus intermedius*, a new species isolated from animals. *Int J Syst Bacteriol*, 26, 401–408.

Hauschild, G., Rohn, K., Engelhardt, E., Sager, M., Hardes, J., & Gosheger, G. (2013). Pharmacokinetic study on pradofloxacin in the dog - comparison of serum analysis, ultrafiltration and tissue sampling after oral administration. *BMC Vet Res*, 9(32), 1–8.

Heinen, E. (2002). Comparative serum pharmacokinetics of the fluoroquinolones enrofloxacin, difloxacin, marbofloxacin, and orbifloxacin in dogs after single oral administration. *J Vet Pharmacol Ther*, 25(1), 1–5.

Hillier, A., Lloyd, D.H., Weese, J.S., Blondeau, J.M., Boothe, D., Breitschwerdt, E., *et al.* (2014). Guidelines for the diagnosis and antimicrobial therapy of canine superficial bacterial folliculitis (Antimicrobial Guidelines Working Group of the International Society for Companion Animal Infectious Diseases). *Vet Dermatol*, 25(3), 163–175.

Holm, B.R., Petersson, U., Mörner, A., Bergström, K., Franklin, A., & Greko, C. (2002). Antimicrobial resistance in staphylococci from canine pyoderma: a prospective study of first-time and recurrent cases in Sweden. *Vet Rec*, 151(20), 600–605.

Hudzicki, J. (2013). Kirby-Bauer Disk Diffusion Susceptibility Test Protocol. In: *American Society of Microbiology*. Washington DC. Acedido em 8 Julho 2014 em <http://www.microbelibrary.org/library/laboratory-test/3189-kirby-bauer-disk-diffusion-susceptibility-test-protocol>

Ihrke P.J., & DeManuelle T.C. (1999) German Shepherd Dog pyoderma: an overview and antimicrobial management. *Compend Contin Educ Pract Vet.*, 21(Supp), 44.

Ihrke, P.J., Papich, M.G., & Demanuelle, T.C. (1999). The use of fluoroquinolones in veterinary dermatology. *Vet Dermatol*, 10(3), 193–204.

Ihrke, P.J. (2006) Bacterial Infections of the Skin. In: C.E. Greene, *Infectious Diseases of the Dog and Cat* (3^a Ed., pp. 807-812). St. Louis Missouri, Saunders Elsevier.

Intorre, L., Vanni, M., Di Bello, D., Pretti, C., Meucci, V., Tognetti, R., *et al.* (2007). Antimicrobial susceptibility and mechanism of resistance to fluoroquinolones in *Staphylococcus intermedius* and *Staphylococcus schleiferi*. *J Vet Pharmacol Ther*, 30(5), 464–469.

Jones, R.D., Kania, S.A., Rohrbach, B.W., Frank, L.A., & Bemis, D.A. (2007). Prevalence of oxacillin and multidrug-resistant staphylococci in clinical samples from dogs: 1,772 samples (2001-2005). *J Am Vet Med Assoc*, 230(2), 221–227.

Jorgensen, J.H., & Ferraro, M.J. (2009). Antimicrobial susceptibility testing: a review of general principles and contemporary practices. *Clin Infect Dis*, 49(11), 1749–1755.

Junqueira, L.C. & Carneiro, J. (2005). Basic Histology – Text and Atlas (11th Ed., pp.360-361). USA, McGraw-Hill.

Kadlec, K., Schwarz, S., Perreten, V., Andersson, U.G., Finn, M., Greko, C., *et al.* (2010). Molecular analysis of methicillin-resistant *Staphylococcus pseudintermedius* of feline origin from different European countries and North America. *J Antimicrob Chemother*, 65(8), 1826–1828.

Kadlec, K., van Duijkeren, E., Wagenaar, J.A, & Schwarz, S. (2011). Molecular basis of rifampicin resistance in methicillin-resistant *Staphylococcus pseudintermedius* isolates from dogs. *J Antimicrob Chemother*, 66(6), 1236–1242.

Kadlec, K., & Schwarz, S. (2012). Antimicrobial resistance of *Staphylococcus pseudintermedius*. *Vet Dermatol*, 23(4), 276–282.

Kehrenberg, C., & Schwarz, S. (2004). *fexA*, a novel *Staphylococcus lentus* gene encoding resistance to Florfenicol and Chloramphenicol. *Antimicrob Agents Chemother*, 48(2), 615–618.

Koch, H.-J., & Peters, S. (1996). Antimicrobial therapy in German Shepherd dog pyoderma (GSP). An open clinical study. *Vet Dermatol*, 7, 177–181.

König, C., Simmen, H.P., & Blaser, J. (1998). Bacterial concentrations in pus and infected peritoneal fluid – implications for bactericidal activity of antibiotics. *J Antimicrob Chemother*, 42(2), 227–232.

Körber-Irrgang, B., Wetzstein, H.-G, Bagel-Trah, S., Hafner, D., & Kresken, M. (2012). Comparative activity of pradofloxacin and marbofloxacin against coagulase-positive staphylococci in a pharmacokinetic – pharmacodynamic model based on canine pharmacokinetics. *J Vet Pharmacol Therap*, 35(6), 571–579.

KuKanich, B., & Coetzee, J.F. (2008). Comparative pharmacokinetics of amikacin in Greyhound and Beagle dogs. *J Vet Pharmacol Ther*, 31(2), 102–107.

Küng, K., Riond, J.-L., & Wanner, M. (1993). Pharmacokinetics of enrofloxacin and its metabolite ciprofloxacin after intravenous and oral administration of enrofloxacin in dogs. *Journal of Veterinary Pharmacology and Toxicology*, 16(4), 462–468.

Leboffe, M.J., & Pierce, B.E. (2011). A Photographic Atlas for the Microbiology Laboratory (4th Ed., pp. 223-225). Englewood, Morton Publish.

Leclercq, R. (2002). Mechanisms of resistance to macrolides and lincosamides: nature of the resistance elements and their clinical implications. *Clin Infect Dis*, 34(4), 482–492.

Lees, P. (2013). Pharmacokinetics, pharmacodynamics and therapeutics of pradofloxacin in the dog and cat. *J Vet Pharmacol Therap*, 36(3), 209–221.

Lizondo, M., Pons, M., Gallardo, M., & Estelrich, J. (1997). Physicochemical properties of enrofloxacin. *J Pharm Biomed Anal*, 15(12), 1845–1849.

Lloyd, D.H., Lamport, A.I., & Feeney, C. (1996). Sensitivity to antibiotics amongst cutaneous and mucosal isolates of canine pathogenic staphylococci in the UK, 1980-96. *Vet Dermatol*, 7, 171–175.

Loeffler, A., Linek, M., Moodley, A., Guardabassi, L., Sung, J.M.L., Winkler, M., et al. (2007). First report of multiresistant, *mecA*-positive *Staphylococcus intermedius* in Europe: 12 cases from a veterinary dermatology referral clinic in Germany. *Vet Dermatol*, 18(6), 412–421.

Maaland, M.G., Papich, M.G., Turnidge, J., & Guardabassi, L. (2013). Pharmacodynamics of doxycycline and tetracycline against *Staphylococcus pseudintermedius*: Proposal of canine-specific breakpoints for doxycycline. *J Clin Microbiol*, 51(11), 3547–3554.

Maaland, M.G., Guardabassi, L., & Papich, M.G. (2014). Minocycline pharmacokinetics and pharmacodynamics in dogs: dosage recommendations for treatment of meticillin-resistant *Staphylococcus pseudintermedius* infections. *Vet Dermatol*, 25(3), 182–190.

Magiorakos, A., Srinivasan, A., Carey, R.B., Carmeli, Y., Falagas, M.E., Giske, C.G., *et al.* (2011). Multidrug-resistant, extensively drug-resistant and pandrug-resistant bacteria: an international expert proposal for interim standard definitions for acquired resistance. *Clin Microbiol Infect*, 18(3), 268–281.

Martinez, M., McDermott, P., & Walker, R. (2006). Pharmacology of the fluoroquinolones: A perspective for the use in domestic animals. *Vet J*, 172(1), 10–28.

McEwan, N.A., Mellor, D., & Kalna, G. (2006). Adherence by *Staphylococcus intermedius* to canine corneocytes: A preliminary study comparing noninflamed and inflamed atopic canine skin. *Vet Dermatol*, 17(2), 151–154.

Mealey, K.L. (2001). Topics in drug therapy penicillins and beta-lactamase inhibitor combinations. *J Am Vet Med Assoc*, 218(12), 1893–1896.

Messias, A., Gekeler, F., Wegener, A., Dietz, K., Kohler, K., & Zrenner, E. (2008). Retinal safety of a new fluoroquinolone, pradofloxacin, in cats: assessment with electroretinography. *Doc Ophthalmol*, 116(3), 177–191.

Międzobrodzki, J., Kasprowicz, A., Biańska, A., Jaworska, O., Polakowska, K., Władyka, B., *et al.* (2010). The first case of a *Staphylococcus pseudintermedius* infection after joint prosthesis implantation in a dog. *Pol J Microbiol*, 59(2), 133–135.

Miller Jr., W.H., Griffin, C.E., & Campbell, K.L. (2013). Muller & Kirk's Small Animal Dermatology (7^a Ed., pp. 1-13, 184-186, 193-203). Elsevier Mosby, Missouri.

Mitchell, M.A. (2006). Enrofloxacin. *J Exotic Pet Med*, 15(1), 66–69.

Morris, D.O. (2011). Unusual pyoderma. Comunicação apresentada no 25º Congresso Anual do ESVD-ECVD em Bruxelas (Bélgica) Setembro 7-10.

Mueller, R.S., & Stephan, B. (2007). Pradofloxacin in the treatment of canine deep pyoderma: a multicentred, blinded, randomized parallel trial. *Vet Dermatol*, 18(3), 144–151.

Nienhoff, U., Kadlec, K., Chaberny, I.F., Verspohl, J., Gerlach, G.-F., Kreienbrock, L., *et al.* (2011). Methicillin-resistant *Staphylococcus pseudintermedius* among dogs admitted to a small animal hospital. *Vet Microbiol*, 150(1–2), 191–197.

Noble, J.F., Kanegis, L.A., & Hallesy, D.W. (1967). Short-term toxicity and observations on certain aspects of the pharmacology of a unique tetracycline – minocycline. *Toxicol Appl Pharmacol*, 11(1), 128–149.

Noli, C., & Boothe, D. (1999). Macrolides and lincosamides. *Vet Dermatol*, 10(3), 217–223.

Onuma, K., Tanabe, T., & Sato, H. (2012). Antimicrobial resistance of *Staphylococcus pseudintermedius* isolates from healthy dogs and dogs affected with pyoderma in Japan. *Vet Dermatol*, 23(1), 17–22.

Papich, M.G. (2013). Antibiotic treatment of resistant infections in small animals. *Vet Clin North Am Small Anim Pract*, 43(5), 1091–1107.

Paul, N.C., Bärghman, S.C., Moodley, A., Nielsen, S.S., & Guardabassi, L. (2012). *Staphylococcus pseudintermedius* colonization patterns and strain diversity in healthy dogs: a cross-sectional and longitudinal study. *Vet Microbiol*, 160(3–4), 420–427.

Paul, N.C., Damborg, P., & Guardabassi, L. (2014). Dam-to-offspring transmission and persistence of *Staphylococcus pseudintermedius* clones within dog families. *Vet Dermatol*, 25(1), 3–e2.

Perreten, V., Kadlec, K., Schwarz, S., Andersson, U.G., Finn, M., Greko, C., *et al.* (2010). Clonal spread of methicillin-resistant *Staphylococcus pseudintermedius* in Europe and North America: an international multicentre study. *J Antimicrob Chemother*, 65(6), 1145–1154.

Perreten, V., Chanchaithong, P., Prapasarakul, N., Rossano, A., Blum, S.E., Elad, D., *et al.* (2013). Novel pseudo-staphylococcal cassette chromosome mec element (ψ SCCmec57395) in methicillin resistant *Staphylococcus pseudintermedius* CC45. *Antimicrob Agents Chemother*, 57(11), 5509–5515.

Petersen, A.D., Walker, R.D., Bowman, M.M., Schott, H.C., & Rosser, E.J. (2002). Frequency of isolation and antimicrobial susceptibility patterns of *Staphylococcus intermedius* and *Pseudomonas aeruginosa* isolates from canine skin and ear samples over a 6-year period (1992-1997). *J Am Anim Hosp Assoc*, 38(5), 407–413.

Pinchbeck, L.R., Cole, L.K., Hillier, A., Kowalski, J.J., Rajala-Schultz, P.J., Bannerman, T.L., *et al.* (2006). Genotypic relatedness of staphylococcal strains isolated from pustules and carriage sites in dogs with superficial bacterial folliculitis. *Am J Vet Res*, 67(8), 1337–1346.

Prescott, J.F. (2013a). Beta-lactam antibiotics: Penam penicillins. In: S. Giguère, J.F. Prescott, P.M. Dowling, *Antimicrobial Therapy in Veterinary Medicine* (5^a Ed., pp. 135-152). Iowa: John Wiley & Sons, Inc.

Prescott, J.F. (2013b). Beta-lactam antibiotics: Cephalosporins. In: S. Giguère, J.F. Prescott, P.M. Dowling, *Antimicrobial Therapy in Veterinary Medicine* (5^a Ed., pp. 153-174). Iowa: John Wiley & Sons, Inc.

Prescott, J.F. (2013c). Sulfonamides, Diaminopyrimidines, and their combinations. In: S. Giguère, J.F. Prescott, P.M. Dowling, *Antimicrobial Therapy in Veterinary Medicine* (5^a Ed., pp. 279-294). Iowa: John Wiley & Sons, Inc.

Quinn, P.J, Markey, B.K., Carter, M.E., Donnelly, W.J, & Leonard, F.C. (2002) *Veterinary Microbiology and Microbial Disease* (1^a Ed., pp. 43-45). Blackwell Publishing, Iowa, USA.

Rantala, M., Lahti, E., Kuhalampil, J., Pesonen, S., Järvinen, A-K., Saijonmaa-Koulumies L., *et al.* (2004). Antimicrobial resistance in *Staphylococcus spp.*, *Escherichia coli* and *Enterococcus spp.* in dogs given antibiotics for chronic dermatological disorders, compared with non-treated control dogs. *Acta Vet Scand*, 45(1-2), 37–45.

Reitman, M.L., Chu, X., Cai, X., Yabut, J., Venkatasubramanian, R., Zajic, S., *et al.* (2011). Rifampin's acute inhibitory and chronic inductive drug interactions: experimental and model-based approaches to drug-drug interaction trial design. *Clin Pharmacol Ther*, 89(2), 234–242.

Rich, M., Deighton, L., & Roberts, L. (2005). Clindamycin-resistance in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolated from animals. *Vet Microbiol*, 111(3-4), 237–240.

Riviere, J.E., & Papich, M.G. (2009). *Veterinary Pharmacology & Therapeutics* (9^a Ed., pp. 835-1011). Wiley-Blackwell, Iowa, USA.

Roberts, M.C. (1996). Tetracycline resistance determinants : mechanisms of action, regulation of expression, genetic mobility, and distribution. *FEMS Microbiol Rev*, 19(1), 1–24.

Rosser Jr, E.J. (2006). German Shepherd dog pyoderma. *Vet Clin North Am Small Anim Pract*, 36(1), 203-211.

Rubin, J.E., Ball, K.R., & Chirino-Trejo, M. (2011). Antimicrobial susceptibility of *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus pseudintermedius* isolated from various animals. *Can Vet J*, 52(2), 153–157.

Rubin, J.E., & Chirino-Trejo, M. (2011). Prevalence, Sites of Colonization, and Antimicrobial Resistance Among *Staphylococcus pseudintermedius* Isolated from Healthy Dogs in Saskatoon, Canada. *J Vet Diagn Invest*, 23(2), 351–354.

Saijonmaa-Koulumies, L.E., Lloyd, D.H. (1996). Colonization of the canine skin with bacteria. *Vet Dermatol*, 7(3), 153–162.

Saijonmaa-Koulumies, L.E., Lloyd, D.H. (2002). Colonization of neonatal puppies by *Staphylococcus intermedius*. *Vet Dermatol*, 13(3), 123–130.

Sasaki, T., Kikuchi, K., Tanaka, Y., Takahashi, N., Kamata, S., & Hiramatsu, K. (2007a). Methicillin-resistant *Staphylococcus pseudintermedius* in a veterinary teaching hospital. *J Clin Microbiol*, 45(4), 1118–1125.

Sasaki, T., Kikuchi, K., Tanaka, Y., Takahashi, N., Kamata, S., & Hiramatsu, K. (2007b). Reclassification of phenotypically-identified *Staphylococcus intermedius* strains. *J Clin Microbiol*, 45(9), 2770–2778.

Schulz, B.S., Hupfauer, S., Ammer, H., Sauter-Louis, C., & Hartmann, K. (2011). Suspected side effects of doxycycline use in dogs - a retrospective study of 386 cases. *The Veterinary Record*, 169(9), 229.

Schwarz, S., Werckenthin, C., Pinter, L., Kent, L.E., & Noble, W.C. (1995). Chloramphenicol resistance in *Staphylococcus intermedius* from a single veterinary centre : evidence for plasmid and chromosomal location of the resistance genes. *Vet Microbiol*, 43(2-3), 151–159.

Schwarz, S., Roberts, M.C., Werckenthin, C., Pang, Y., & Lange, C. (1998). Tetracycline resistance in *Staphylococcus* spp. from domestic animals. *Vet Microbiol*, 63(2-4), 217–227.

Schwarz, S., Kadlec, K., & Strommenger, B. (2008). Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus pseudintermedius* detected in the BfT-GermVet monitoring programme 2004-2006 in Germany. *J Antimicrob Chemother*, 61(2), 282–285.

Schwarz, S., Silley, P., Simjee, S., Woodford, N., van Duijkeren, E., Johnson, A. P., et al. (2010). Editorial: Assessing the antimicrobial susceptibility of bacteria obtained from animals. *J Antimicrob Chemother*, 65(4), 601–604.

Scott, D.W., Beningo, K.E., Miller, W.H., & Rothstein, E. (1998). Efficacy of clindamycin hydrochloride capsules for the treatment of deep pyoderma due to *Staphylococcus intermedius* infection in dogs. *Can Vet J*, 39(12), 753–756.

Sentürk, S., Özel, E., Sen, A. (2005). Clinical Efficacy of Rifampicin for Treatment of Canine Pyoderma. *Acta Vet Brno*, 74, 117–122.

Short, J., Zabel, S., Cook, C., & Schmeitzel, L. (2014). Adverse events associated with chloramphenicol use in dogs: a retrospective study (2007-2013). *Vet Rec*, 175(21), 537.

Silley, P., Stephan, B., Greife, H.A., & Pridmore, A. (2007). Comparative activity of pradofloxacin against anaerobic bacteria isolated from dogs and cats. *J Antimicrob Chemother*, 60(5), 999–1003.

Silley, P., Stephan, B., Greife, H.A., & Pridmore, A. (2012). Bactericidal properties of pradofloxacin against veterinary pathogens. *Vet Microbiol*, 157(1-2), 106–111.

Simou, C., Thoday, K.L., Forsythe, P.J., & Hill, P.B. (2005). Adherence of *Staphylococcus intermedius* to corneocytes of healthy and atopic dogs: effect of pyoderma, pruritus score, treatment and gender. *Vet Dermatol*, 16(6), 385–391.

Smieja, M. (1998). Current indications for the use of clindamycin: A critical review. *Can J Infect Dis*, 9(1), 22–28.

Spízek, J., & Rezanka, T. (2004). Lincomycin, clindamycin and their applications. *Appl Microbiol Biotechnol*, 64(4), 455–464.

Stegemann, M.R., Coati, N., Passmore, C.A., & Sherington, J. (2007). Clinical efficacy and safety of cefovecin in the treatment of canine pyoderma and wound infections. *J Small Anim Pract*, 48(7), 378–386.

Sykes, J.E., Nagle, T.M., & White, S.D. (2014) Infection of Selected Organ Systems. In: J.E. Sykes, *Canine and Feline Infectious Diseases* (1^a Ed., pp. 800-813). St. Louis Missouri, Elsevier Saunder.

Sykes, J.E., & Blondeau, J.M. (2014). Pradofloxacin: a novel veterinary fluoroquinolone for treatment of bacterial infections in cats. *Vet J*, 201(2), 207–214.

Tanner, M.A., Everett, C.L., & Youvan, D.C. (2000). Molecular phylogenetic evidence for noninvasive zoonotic transmission of *Staphylococcus intermedius* from a canine pet to a human. *J Clin Microbiol*, 38(4), 1628–1631.

Toussaint, K.A., & Gallagher, J.C. (2015). β -Lactam/ β -Lactamase inhibitor combinations: From Then to Now. *Ann Pharmacother*, 49(1), 86–98.

Trepanier, L.A., Danhof, R., Toll, J., & Watrous, D. (2003). Clinical findings in 40 dogs with hypersensitivity associated with administration of potentiated sulfonamides. *J Vet Intern Med*, 17(5), 647–652.

Trepanier, L.A. (2004). Idiosyncratic toxicity associated with potentiated sulfonamides in the dog. *J Vet Pharmacol Ther*, 27(3), 129–138.

Tse, H., Tsoi, H.W., Leung, S.P., Urquhart, I.J., Lau, S.K.P., Woo, P.C.Y., *et al.* (2011). Complete genome sequence of the veterinary pathogen *Staphylococcus pseudintermedius* strain HKU10-03, isolated in a case of canine pyoderma. *J Bacteriol*, 193(7), 1783–1784.

van Duijkeren, E., Vulto, A.G., & Van Miert, A.S. (1994). Trimethoprim/ sulfonamide combinations in the horse: a review. *J Vet Pharmacol Therap*, 17(1), 64–73.

van Duijkeren, E., Catry, B., Greko, C., Moreno, M.A., Pomba, M.C., Pyörälä, S., *et al.* (2011). Review on methicillin-resistant *Staphylococcus pseudintermedius*. *J Antimicrob Chemother*, 66(12), 2705–2714.

Van Hoovels, L., Vankeerberghen, A., Boel, A., Van Vaerenbergh, K., & De Beenhouwer, H. (2006). First case of *Staphylococcus pseudintermedius* infection in a human. *J Clin Microbiol*, 44(12), 4609–4612.

Vanni, M., Tognetti, R., Pretti, C., Crema, F., Soldani, G., Meucci, V., *et al.* (2009). Antimicrobial susceptibility of *Staphylococcus intermedius* and *Staphylococcus schleiferi* isolated from dogs. *Res Vet Sci*, 87(2), 192–195.

Watson, A.D.J. (1991) Chloramphenicol 2. Clinical pharmacology in dogs and cats. *Aust Vet J*, 68(1), 2-5.

Weese, J.S., & van Duijkeren, E. (2010). Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus pseudintermedius* in veterinary medicine. *Vet Microbiol*, 140(3–4), 418–429.

Weese, J.S., Sweetman, K., Edson, H., & Rousseau, J. (2013). Evaluation of minocycline susceptibility of methicillin-resistant *Staphylococcus pseudintermedius*. *Vet Microbiol*, 162(2-4), 968–971.

Werckenthin, C., Cardoso, M., Martel, J.L., & Schwarz, S. (2001). Antimicrobial resistance in staphylococci from animals with particular reference to bovine *Staphylococcus aureus*, porcine *Staphylococcus hyicus*, and canine *Staphylococcus intermedius*. *Vet Res*, 32(3-4), 341–362.

Wetzstein, H. (2005). Comparative Mutant Prevention Concentrations of Pradofloxacin and Other Veterinary Fluoroquinolones Indicate Differing Potentials in Preventing Selection of Resistance. *Antimicrob Agents Chemother*, 49(10), 4166–4173.

Winn, Jr., W., Allen, S., Janda, W., Koneman, E., Procop, G., Schreckenberger, P., & Woods, G. (2006). Konemann's color atlas and diagnostic text of microbiology, (6^a Ed., p. 945–1021). Philadelphia, PA, Lippencott Williams & Wilkins Publishers.

Wise, K. (2013). Preparing Spread Plates Protocols. In: American Society of Microbiology. Washington DC. Acedido em 4 Agosto 2014 em <http://www.microbelibrary.org/component/resource/laboratory-test/3085-preparing-spread-plates-protocols#content>

APÊNDICE I

Resultados dos Antibiógramas

Tabela 3: Resultados dos antibiógramas para cada isolado testado. ● Resistente, ○ Suscetível.

Identificação do paciente	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30
Oxacilina	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
Amoxicilina + Ácido clavulânico	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
Cefalotina	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
Clindamicina	●	○	○	●	●	○	○	○	○	●	○	○	●	○	○	○	●	●	○	○	○	○	○	●	○	○	●	●	●	●
Eritromicina	●	○	○	●	●	○	○	○	○	●	○	○	●	○	○	○	●	●	○	●	○	○	○	●	○	○	●	●	●	●
Trimetoprim-sulfametoxazol	○	○	○	○	○	●	○	○	○	●	○	●	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	●	○	●	●	●
Tetraciclina	○	○	○	●	○	○	○	○	○	○	●	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
Minociclina	●	○	○	●	○	○	●	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
Enrofloxacin	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
Pradofloxacin	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
Cloranfenicol	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
Rifampicina	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
Gentamicina	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
Amicacina	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○

Identificação do paciente	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40	41	42	43	44	45	46	47	48	49	50	51	52	53	54	55
Oxacilina	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	○	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●
Amoxicilina + Ácido clavulânico	●	●	○	●	●	●	●	●	●	○	●	●	●	●	○	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●
Cefalotina	○	●	○	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	○	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●
Clindamicina	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	○	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●
Eritromicina	●	●	●	●	●	●	●	●	●	○	●	●	●	●	○	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●
Trimetoprim-sulfametoxazol	●	●	●	●	●	●	●	●	●	○	●	●	●	●	○	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●
Tetraciclina	●	●	●	●	○	○	●	●	●	●	●	●	●	●	○	●	●	○	●	●	●	○	●	●	●
Minociclina	●	○	●	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
Enrofloxacin	●	●	○	●	●	●	●	●	●	○	●	●	●	●	○	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●
Pradofloxacin	●	●	○	●	●	●	●	●	●	○	●	●	●	●	○	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●
Cloranfenicol	○	●	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
Rifampicina	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
Gentamicina	●	●	●	●	○	●	●	●	●	○	●	●	●	●	○	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●
Amicacina	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○