

U. PORTO



INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS ABEL SALAZAR
UNIVERSIDADE DO PORTO

Relatório Final de Estágio
Mestrado Integrado em Medicina Veterinária

**Estudo para a determinação da prevalência de *Staphylococcus*
coagulase-positivo em animais de companhia e no ambiente de uma
clínica veterinária**

Nuno Miguel dos Santos Silva Beça

Orientador

Paulo Manuel Rodrigues Martins da Costa

Co-Orientador(es)

Romeo Luis Rocha Simões e Joana Cristina Macedo Torres dos Santos

Porto 2012



Relatório Final de Estágio
Mestrado Integrado em Medicina Veterinária

**Estudo para a determinação da prevalência de *Staphylococcus*
coagulase-positivo em animais de companhia e no ambiente de uma
clínica veterinária**

Nuno Miguel dos Santos Silva Beça

Orientador

Paulo Manuel Rodrigues Martins da Costa

Co-Orientador(es)

Romeo Luis Rocha Simões e Joana Cristina Macedo Torres dos Santos

Porto 2012

Resumo:

O *Staphylococcus pseudintermedius* é uma espécie do género *Staphylococcus* que nos últimos anos tem sido alvo de estudo científico mais intenso na área de Microbiologia Veterinária em virtude de ser considerado uma bactéria emergente no que respeita à sua importância clínica e por apresentar um número crescente de resistências antibióticas.

Foi objetivo do meu trabalho de estágio desenvolver uma metodologia de identificação fenotípica do *S. pseudintermedius*, diferenciando-o dos restantes *Staphylococcus* coagulase-positivos. Pretendeu-se também avaliar a prevalência de *Staphylococcus pseudintermedius* e de *Staphylococcus aureus* em animais atendidos numa clínica veterinária mediante a recolha de amostras orais, nasais, cutâneas e em alguns casos urina. Também foram recolhidas amostras em equipamento e profissionais veterinários.

Os resultados deste trabalho permitiram identificar um método fiável para isolamento e reconhecimento fenotípico de *S. pseudintermedius* através do uso de *Baird Parker-RPF* (Biokar) e posteriormente *CHROMagar Staph aureus* (Chromagar), sendo a confirmação por *Polymerase Chain Reaction* (PCR) sempre necessária.

Mediante a amostragem de 23 animais obteve-se uma prevalência de 30,4 % (n=7) e de 52,2 % (n=12) portadores de *S. aureus* e *S. pseudintermedius* respetivamente. Dois (8,7 %) dos 23 animais amostrados estariam colonizados com *Methicilin Resistant Staphylococcus aureus* (MRSA) e 4 (17,4 %) com *Methicilin Resistant Staphylococcus pseudintermedius* (MRSP). Estes valores de prevalência são em muito superiores aos registados até agora.

Já no microbismo da clínica, dos 9 locais amostrados, registou-se prevalência 22,2% (n=2) de *S. pseudintermedius* e 11,1% (n=1) de *S. aureus*. A prevalência para MRSP foi de 22,2% (n=2), não tendo sido detetado MRSA.

Uma avaliação conjunta dos perfis de resistência dos MRSP isolados nas amostras de animais e da clínica demonstrou que a oxacilina, a amoxicilina, o trimetropim-sulfametoxazole e lomefloxacina são os antibióticos com resistência mais frequente o que alerta para um cuidado cada vez maior no seu uso.

Agradecimentos

- Ao Professor Paulo Costa pela aposta num trabalho cujos resultados eram uma incógnita, por depositar confiança em mim, bem como conferir-me uma total autonomia na realização do meu trabalho. De agradecer também toda uma disponibilidade admirável.

- Ao Romeu Simões por toda a ajuda durante o decorrer de todo meu estágio, bem como companhia sempre animada no laboratório e a quem desejo as maiores felicidades neste novo desafio lhe foi proposto.

- Professor Augusto por toda a disponibilidade e colaboração neste estudo por mim realizado.

- A Elisabete Lopes também conhecida por “Dona Betty” por ter paciência de lidar comigo dia após dia durante 2 anos.

- Dr^a. Joana Santos pela preocupação na referência de casos de potencial interesse para o meu trabalho.

- Dr^a.Liliana Martins, não só pelo meu primeiro caso ter vindo através dela, mas também pela ajuda que sempre se mostrou disponível a dar caso necessitasse.

- Todos os profissionais da Clínica UP-Vet.

- Aos meus pais por me fornecerem sempre todas as condições para que nada faltasse neste trajeto académico um pouco tortuoso. Seu apoio foi infindável em prol do meu sucesso e agradeço-lhes toda a paciência que comigo tiveram estes longos anos.

- Ao meu irmão Tabito (Gustavo) por sempre se preocupar comigo durante estes longos anos universitários e que muito me “massacrou” para me aplicar e é alguém cuja aplicação e dedicação em muito admiro.

- A Marlen Pinto, minha namorada, por estar sempre a meu lado neste trabalho, compreender a maior carga de trabalho a que estava sujeito. Mas acima de tudo por me inspirar dia após dia a dar o meu melhor e enfrentar todos os obstáculos de cabeça bem erguida.

- Ao Filipe Pinto e Gil Figueira, dois grandes amigos e camaradas que conheci no meu percurso universitário e a quem agradeço todo o apoio e preocupação sempre prestadas ao longo de todos estes anos, bem como os animados cafés, noites em frente ao pc ou XBOX que com eles tive e continuo a ter o prazer ter na sua companhia.

- Aos membros do grupo “Super Tranquilos”: Dinis Rêgo, João Morais, Pedro Garcia e César Gomes por todas as tardes tranquilas no mar e em cima de uma prancha de *longboard* que bem ajudaram a manter sempre um espírito calmo para trabalhar.

- Ao André Aires e Carolina Esmeraldo pois são dois amigos com quem iniciei a caminhada neste curso e tive sempre um prazer imenso nos momentos que com eles convivi.

- Ao Vasco e João Braga, Diana Lima, Luis Andrade e Joana Martins por fazerem parte de um grupo com o qual tive o prazer de conviver neste curso e que em muito admiro toda a sua dedicação e conhecimento.

Índice

	Página
Introdução	1
Material e métodos	7
1- Recolha das amostras.....	7
1.1- Recolha em animais.....	7
1.2- Recolha em equipamento da clínica.....	7
2- Isolamento e avaliação fenotípica em isolados recolhidos.....	7
2.1- Isolamento e avaliação de fenótipo de resistência antimicrobiana em isolados obtidos em animais.....	7
2.2- Isolamento e avaliação de fenótipo de resistência antimicrobiana em material da clínica.....	9
3- Confirmação por <i>Polymerase Chain Reaction</i> (PCR).....	10
3.1- Extração de Ácido Desoxirribonucleico (ADN).....	10
3.2- <i>Polymerase Chain Reaction</i> (PCR).....	11
4- Análise estatística.....	12
Resultados e Discussão	13
Conclusão	22
Bibliografia	24

Introdução

Atualmente o *Staphylococcus aureus* e *Staphylococcus pseudintermedius* são duas espécies coagulase-positiva com grande relevância em Medicina Veterinária (Weese et al, 2010). A última tem sido alvo de estudos mais aprofundados que culminaram numa revisão taxonómica que obrigou, mediante testes genéticos à reclassificação em *S. pseudintermedius* de casos anteriormente atribuídos a *Staphylococcus intermedius*, descritos por Hajek e Colaboradores em 1976, (Devriese et al., 2005; Bond et al, 2012). *S. pseudintermedius* é uma espécie pertencente ao Grupo *Staphylococcus intermedius* (SIG), juntamente com *Staphylococcus delphini* e *Staphylococcus intermedius* (Sasaki et al, 2007b), que coloniza frequentemente a pele (região da nuca) e as mucosas oral, nasal e anal, sendo as regiões nasal e anal as mais colonizadas (Cox et al, Lilebanum et al 1999). Esta bactéria está associada a patologias dermatológicas como piodermas, podendo ser oportunista em feridas pós-operatórias e infeções dos ouvidos (Weese e van Duijkeren, 2010; Griffeth et al, 2008; Abraham et al, 2007).

O *S. pseudintermedius* faz parte da flora comensal dos animais de companhia não causando doença, a menos que o sistema imune do animal esteja comprometido, exista alteração da estrutura histológica da pele, como em casos de dermatites atópicas, ou quando são praticados procedimentos cirúrgicos (Bannoehr e Guardabassi, 2012). O conhecimento sobre a patogénese do *S. pseudintermedius* é ainda incompleto, mas estudos levados a cabo por Fitzgerald e Colaboradores, em 2009, concluíram que alguns dos fatores de virulência eram semelhantes aos produzidos por *S. aureus*. Estes fatores desempenham um papel fundamental na colonização do hospedeiro. Enzimas, como a coagulase, as protéases e as termonucleases, e toxinas (e.g. hemolisinas, toxinas esfoliativas e entero-toxinas) são alguns exemplos de fatores produzidos por *S. pseudintermedius* (Iyori et al, 2010). A toxina exfoliativa encontra-se presente nos isolados de *S. pseudintermedius* em animais portadores de piodermas (Iyori et al, 2010). Outras proteínas importantes para a adesão aos corneócitos em cães são produzidas, gerando uma capacidade para se ligarem ao fibrinogénio, fibronectina e citoqueratina (Geohegan et al, 2009). A proximidade filogenética com *S. aureus* deriva da presença do gene acessório regulador (*agr*) em ambas as espécies, sendo este gene responsável pelos fatores de virulência (Dufour et al, 2002). A produção de uma proteína ligante às imunoglobulinas é outro dos elos de ligação com *S. aureus* (Moodley et al, 2009). Futagawa-Saito e Colaboradores (2006) alertaram ainda para o facto de *S. pseudintermedius* conseguirem produzir biofilmes.

Os métodos de identificação microbiológica de *S. pseudintermedius* estão ainda em desenvolvimento, levando a que, em muitos casos, a presença da propriedade coagulase-

positiva, leve a uma sub-deteção de *S. pseudointermedius* (Pottumarthy et al, 2004 e Van Hoovels et al, 2006). No entanto, Guardabassi e Bannoehr (2012) relativizam este facto dizendo que o risco de não se identificar a presença de *S. pseudointermedius* na espécie canina é baixo e caso esse erro se suceda de forma esporádica acaba por ser negligenciável na prática clínica. O método de deteção fenotípica de *Methicilin Resistant Staphylococcus pseudointermedius* (MRSP) baseia-se no uso de uma concentração mínima inibitória de oxacilina superior ou igual a 0,5 mg/l no meio de cultura, ou então na formação de um halo inferior ou igual a 17 mm de diâmetro em torno de um disco com oxacilina (1µg), estando estes fenótipos altamente correlacionados com a presença do gene *mecA* em *S. pseudointermedius* (Bemis et al, 2009). A importância de *S. pseudointermedius* deve-se, sobretudo, ao facto de ter adquirido o gene *mecA*, o que lhe confere uma resistência à meticilina idêntica à expressa por *Methicilin Resistant Staphylococcus aureus* (MRSA) (Loeffler et al, 2007; Perreten et al, 2010). A identificação molecular por *Polymerase Chain Reaction* (PCR) revela-se fundamental, não só para identificação de *S. pseudointermedius*, bem como deteção do gene *mecA*. O uso do *Staphylococcal cassette chromosome* (*SCCmec*) é outro dos métodos usados para sua deteção de MRSP, tal como é feito em MRSA (Black et al, 2009).

A prevalência de colonização ou contaminação com MRSP em cães saudáveis frequentadores de hospitais veterinários foi de 4,5 % num estudo efetuado por Hanselman e colaboradores 2009. Em gatos saudáveis a prevalência documentado por Abraham e colaboradores, em 2007, foi de 4 %, ao passo que em pacientes portadores de inflamação da pele não foi isolado qualquer MRSP. No Canadá o valor em gatos saudáveis foi de 1,2 % (Hanselmann et al 2009). Sasaki e colaboradores (2007a) verificaram uma prevalência de 30 % de MRSP numa clínica no Japão. Já Kawakami e colaboradores em 2010 documentaram uma prevalência de 66 % em cães com pioderma, através da deteção do gene *mecA*. Na espécie canina a prevalência de MRSP é mais elevada nos pacientes que apresentam patologia dermatológica, em comparação com animais saudáveis (Griffeth et al, 2008); nos gatos observa-se a situação inversa (Abraham et al, 2007). Um estudo abrangente em 16,103 animais envolvendo cães, gatos e espécie equina, levado a cabo por Ruscher e colaboradores em 2009, registou uma prevalência de MRSP de 0,8 % em cães, 0,1 % em gatos e 0,1 % na espécie equina, sendo as zonas mais comuns de infeção as orelhas e a pele. Segundo o mesmo autor a prevalência de MRSP é quatro vezes superior à de MRSA. No entanto, há que referir que a colonização por MRSP pode persistir durante meses sem haver manifestação clínica (Frank et al, 2009). Em clínica veterinária a prevalência de *Staphylococcus pseudointermedius* resistentes à meticilina pode atingir os 3% em cães saudáveis e os 8% nos cães com patologia dermatológica conforme reportados nos Estados Unidos da América por Griffeth e colaboradores em 2008. Um resumo destes dados é feito no **Quadro 1**.

Quadro 1- Resumo dos estudos de prevalência de MRSP

População	País	Prevalência de MRSP	Referência
Cães frequentadores de hospitais	Canadá	4,5 %	Hanselman et al. (2009)
Gatos saudáveis	Estados Unidos da América	4,0 %	Abraham et al. (2007)
Gatos com inflamação da pele	Estados Unidos da América	0 %	Abraham et al. (2007)
Gatos saudáveis	Canadá	1,2 %	Hanselman et al. (2009)
Cães com pioderma	Japão	66,0 %	Kawakami et al. (2010)
Cães frequentadores de uma clínica veterinária	Japão	30,0 %	Sasaki et al. (2007a)
Cães	Alemanha	0,8 %	Ruscher et al. (2009)
Gatos	Alemanha	0,1 %	Ruscher et al. (2009)
Equinos e burros	Alemanha	0,1 %	Ruscher et al. (2009)
Cães saudáveis frequentadores de clínica	Estados Unidos da América	3,0 %	Griffeth et al. (2008)
Cães saudáveis frequentadores de clínica com patologia dermatológica	Estados Unidos da América	8,0%	Griffeth et al. (2008)

No que diz respeito a locais de isolamento de *S. pseudointermediu*, Guardabassi e Bannoehr (2012) indicam que a região do períneo (52,0 %) e a mucosa oral (57,0 %) são os locais de eleição para esse isolamento, o que contrasta com a *European Medicine Agency/ Committee of Veterinary Medicinal Products* (2011) que descrevem as regiões do períneo e nasal como sendo as regiões ideais para esse isolamento.

As estirpes de *S. pseudointermedius* são extremamente heterogêneas, sendo a estirpe ST71 dominante na Europa e a ST68 dominante na América do Norte. Ambas são estirpes onde foi verificada resistência à meticilina. Este facto contrasta com o primeiro isolado de MRSA que se originou de uma linhagem previamente sensível à meticilina (Guardabassi e Bannoehr, 2012). As estirpes de MRSP mais frequentemente documentadas são ST29, ST68, ST69, ST70, ST71 (Bannoehr et al, 2007), apresentando todas um espectro alargado de resistência antibiótica, o que torna o seu controlo a nível veterinário um grande desafio, pois os tratamentos que se revelam efetivos são escassos. A estirpe ST71, apresenta resistências a β -lactâmicas, aminoglicosídeos, macrólidos, lincosamidas, tetraciclina, cloranfenicol,

trimetropim-sulfamidas, fluorquinolonas, sendo susceptível ao ácido fucsídico, rifampicina, amicacina, teicoplanina e linezolid; não sendo nenhuma destas substâncias de uso veterinário (Perreten et al, 2010). O ácido fucsídico constitui o antibiótico mais efetivo para tratar MRSP (Bond and Loeffler, 2012).

Além da importância de *S. pseudointermedius* na patogénese de doenças dermatológicas, Van Duijkeren e colaboradores documentaram em 2008 a sua relevância desta espécie como possível agente de infeções nosocomiais. Nesse estudo, isolaram MRSP em cães, gatos ambiente e pessoal de uma clínica veterinária na Holanda, concluindo que o internamento em hospitais e a quebra nas regras de biossegurança são determinantes para a disseminação de MRSP. Zubeir e colaboradores (2007) levaram a cabo um estudo durante seis meses tendo isolado dez MRSP, oito em cães e dois em gatos, que em virtude de apresentarem padrão idêntico em PFGE, indicavam a possibilidade de infeção cruzada na clínica ou uma distribuição de um clone ao nível da população animal.

A transmissão vertical está documentada em casos de cachorros com *S. pseudointermedius* logo após o nascimento (Saijonmaa-Koulumies et al, 2002). Já a transmissão horizontal em cães adultos ainda não está documentada na literatura.

Os fatores de risco associados com a manifestação desta espécie são ainda pouco elucidados, mas Weese e colaboradores (2009) enumeram o uso de antibióticos e as infeções de ferida cirúrgica como os pontos essenciais.

No que diz respeito a colonização do Homem com MSSP, esta é pouco comum e com um carácter zoonótico reduzido, quando comparada com MRSA. Donos de cães com pioderma apresentavam cultura positiva, ao contrário de pessoas que não tinham contacto diário com esses mesmos cães. A estirpe isolada no dono era igual à isolada no cão, mas após a cura clínica do cão a segunda cultura do dono era já negativa, indicando uma colonização temporária do Homem (Guardabassi et al, 2004).

A colonização do Homem com MRSP é caracterizada como sendo pouco comum e transitória, no entanto não deve ser negligenciada. Um dado epidemiologicamente importante é a capacidade de MRSP colonizarem animais saudáveis (Hanselman et al, 2008), o que leva a que pessoas que interajam com estes animais, nomeadamente donos ou médicos veterinários, possam ser também colonizados pela estirpe presente no cão ou gato. Deste modo, os animais de companhia desempenham um papel de vetores na disseminação do agente tanto na população humana, como na animal (Perreten et al. 2010). Um estudo especificamente dirigido aos médicos veterinários da área da dermatologia detetou que 5,3 % (9 em 171) destes profissionais eram portadores de MRSP (Morris et al 2010). Paul e colaboradores, em 2011,

efetuaram um estudo no qual recolheram amostras de 128 médicos veterinários, havendo cinco (3,9 %) MRSP-positivos e dois (1,6 %) MRSA-positivos. Um mês depois, foi feita nova amostragem nos veterinários MRSP-positivos, observando-se que a bactéria persistia na cavidade nasal. A prevalência de MSSA foi de 25 % (32 veterinários), não havendo registo de MSSP. Embora fosse expectável que se encontrasse mais MSSP nos médicos veterinários, uma vez que são os colonizadores mais comuns nos animais, o facto de se encontrar MRSP revela a capacidade que este fenótipo de *S. pseudointermedius* tem para colonizar o Homem. Outros estudos, relativos a prevalência de MRSA em médicos veterinários reportaram valores inferiores a 3,5 % nomeadamente 3,0 % na Dinamarca (Moodley et al, 2009); 3,3 % na América do Norte (Hanselmann et al, 2009); 0,1 % em Itália (Gzanelli et al, 2002).

No Homem, diversos casos de infeções por MRSP têm sido documentados em situações intercorrentes com outras patologias nomeadamente um paciente com adenocarcinoma gástrico que apresentava uma bacteriemia (Campanile et al, 2007); Stegmann e Colaboradores (2010) isolaram MRSP (estirpe ST71) num caso de sinusite. Por sua vez, infeções por MSSP foram documentadas em casos de abscessos cerebrais (Atalay et al, 2005); pneumonia (Gerstadt et al, 1999); bacteriemia em cateter por *S. pseudointermedius* (Chuang et al, 2010)

Relativamente à terapêutica em casos animais, o tratamento com recurso a antibióticos não dispõe de um protocolo padrão, devendo este ser ajustado consoante o caso. Concretamente, deve sempre ser avaliado o perfil de suscetibilidade antibiótica do isolado e a possibilidade futura deste poder desenvolver resistência ao antibiótico a administrar (*European Medicine Agency/ Committee of Veterinary Medicinal Products*, 2011). A patogénese do MRSP isolado deve ser avaliada quanto à sua severidade e nível de patogenicidade, quer local, quer sistémica do animal. Nos casos em que a lesão esteja localizada, como em feridas e ouvidos, deve ser adotado tratamento antibiótico tópico. A informação sobre eficácia do tratamento antibiótico de animais infetados com MRSP é todavia ainda muito escassa (*European Medicine Agency/ Committee of Veterinary Medicinal Products*, 2011). Um facto muito curioso prende-se com a resistência às tetraciclinas observada em *S. pseudointermedius* observando a presença dos genes de resistência *tet* (M) e *erm* (B) que diferem com os genes de resistência presentes no *S. aureus tet* (K) e *erm* (C). A presença dos dois primeiros genes em *Enterococcus* leva a suspeita que nem toda a informação genética do *S. pseudointermedius*, foi adquirida a partir do *S. aureus*. (Guardabassi e Bannoehr, 2012).

No que respeita ao controlo sem se recorrer a antibióticos, pensa-se que este pode ser feito através de lavagens com clorexidina (*European Medicine Agency/ Committee of Veterinary Medicinal Products*, 2011). No controlo em animais infetados, sem antibiótico, Guardabassi e

colaboradores em 2010 fizeram uso de um antisséptico para as orelhas à base de Tris-EDTA e clorexidina, que apresentava boa atividade bactericida para MRSP *in vitro*.

A prevenção da transmissão entre animais passa por uma correta higienização das mãos, tanto de profissionais da área veterinária, como dos donos de animais portadores de MRSP que tenha contacto com outros animais. A possibilidade de se isolar os animais internados com diagnóstico de MRSP é outra medida que pode ser tomada para prevenir infeções nosocomiais. Uso de luvas, máscaras e proteção para os pés é algo que deve ser feito pelo médico veterinário (*European Medicine Agency/ Committee of Veterinary Medicinal Products*, 2011). Wagenaar e Colaboradores (2008) referenciam a transmissão de *S. pseudointermedius* através do ambiente doméstico para os animais. Deste modo, também o reforço da higienização na habitação reduzindo a contaminação local, e a possibilidade de retirar os animais de casa, de modo a reduzir a contaminação por pêlo, são medidas a ponderar (*European Medicine Agency/ Committee of Veterinary Medicinal Products*, 2011). Já a transmissão direta animal-Homem tem como ponto-chave a correta higienização das mãos de modo a diminuir a transmissão de MRSP.

Dada a relevância que *S. pseudointermedius* tem tido ao nível da medicina veterinária e as potenciais implicações na saúde humana, é urgente investigar métodos mais sensíveis e rigorosos para o isolamento desta espécie bacteriana.

Foi objetivo do meu trabalho de estágio desenvolver uma metodologia de identificação fenotípica do *S. pseudointermedius*, diferenciando-o dos restantes *Staphylococcus* coagulase-positivos. Pretendeu-se também avaliar a prevalência de *Methicilin Susceptible Staphylococcus pseudointermedius* (MSSP) e MRSP em animais atendidos numa clínica veterinária, bem como no próprio microbismo da clínica.

O interesse especial por *S. pseudointermedius* resultou de um estágio extracurricular no qual participei no ano letivo anterior (2010/11), realizado no laboratório de Microbiologia-Tecnologia Alimentar-Inspeção Sanitária do Instituto de Ciências Biomédicas Abel Salazar sob orientação do Professor Paulo Costa, com o objetivo de avaliar a prevalência de MRSA em veículos de transporte público da cidade do Porto. Este estágio extracurricular forneceu-me imensa informação sobre a importância para a saúde pública de *Staphylococcus aureus* com resistência à meticilina. Aliando o conhecimento adquirido, verifiquei que o *S. pseudointermedius* se encontra descrito como uma espécie emergente ao nível da Medicina Veterinária. O facto de haver pouca informação sobre sua prevalência em Portugal, aumentou assim o estímulo e desafio para efetuar este trabalho no âmbito da minha tese de mestrado.

Material e Métodos

1. Recolha das amostras

1.1- Recolha em animais

Para o estudo de prevalência de *S. pseudintermedius* em animais de companhia atendidos numa clínica veterinária foram recolhidas amostras em cães (n=21) e gatos (n=2), tendo sido recolhido material orgânico da região nasal, da boca e da pele com auxílio de uma zaragatoa estéril, a qual ficou depositada dentro de um tubo Eppendorf com 1 ml de *Brain Heart Infusion* (Oxoid, Reino Unido) suplementado com *Tween 80* (Merck, Alemanha), bem como outro tubo *falcon* com 5ml de - BHI, suplementado igualmente com *Tween 80* e oxacilina (1µg/ml), perfazendo assim dois tubos por local. Em dois cães foi ainda feita análise de urina colhida por cistocentese no âmbito dos procedimentos clínicos.

No momento de recolha das amostras foi elaborado um questionário ao proprietário acompanhante com objetivo de obter informação sobre idade do animal, sexo, raça, área de residência.

1.2- Recolha em equipamento da clínica

Para a avaliação da contaminação de superfícies e ambiente da Clínica Veterinária colheram-se nove amostras conforme indicado no **Quadro 2**, sem haver repetição posterior dessas amostras. Desconhecia-se o estado de desinfecção dos equipamentos na altura da colheita. A colheita foi efetuada com auxílio de gazes estéreis que, após a recolha, ficaram depositadas dentro dos frascos com 50 ml de *Brain Heart Infusion* suplementado com *Tween 80*. Simultaneamente preparou-se tubos Falcon esterilizados com 9 ml de *Brain Heart Infusion* e igualmente suplementados com *Tween 80*.

2. Isolamento e avaliação fenotípica em isolados recolhidos

2.1- Isolamento e avaliação de fenótipo de resistência antimicrobiana em isolados obtidos em animais

No laboratório todos os tubos foram agitados no vortéx durante 10 a 15 segundos. As amostras recolhidas nos *Eppendorfs* de 1 ml inoculadas em geloses de isolamento passadas 6 e 18 horas de incubação a 37 °C. As amostras nos tubos *falcon* com 5ml de suspensão apenas foram inoculadas após 18h de permanência na estufa, conforme previamente descrito por Futagawa-Saito e colaboradores em 2006. Nas amostras dos *Eppendorfs*, após 6 horas de

incubação, recolheram-se 30 µl de inóculo e semearam-se por espalhamento em *Baird Parker-RPF* (Biokar, França; Simões et al, 2011), com o auxílio de uma pipeta de Pasteur. Posteriormente, colocou-se a placa de Petri na estufa a 37 °C durante 24 horas, bem como o *Eppendorf* em questão. Completadas as 18 horas de enriquecimento, fez-se o cultivo, do conteúdo do tubo *Eppendorf* com 1 ml de suspensão de amostra, bem como do *falcon* suplementado com oxacilina, novamente em *Baird Parker-RPF*, por técnica de esgotamento, sendo essas placas também incubadas na estufa a 37 °C durante 24 horas. Decorrido esse tempo, as placas foram avaliadas quanto à presença de colónias do género *Staphylococcus* com propriedade coagulase-positiva. Nas placas em que se verificou crescimento de colónias típicas (formação de um halo opaco em redor da colónia cuja cor variava entre preto e cinzento com contorno regular e bem delimitado em circunferência), foram repicados um máximo de quatro colónias por local de amostra e por tudo de enriquecimento para uma placa de *CHROMagar Staph aureus* (Chromagar, França), sendo esse cultivo feito por técnica de esgotamento em estria. Após incubação a 37 °C durante 24 horas, observou-se a placa de *CHROMagar Staph aureus* e as colónias que apresentaram cor rosa carne, rosa escura, violeta ou azul (**Figura 1**) foram repicadas para um tubo contendo 5 ml APT (Oxoid), posteriormente incubado a 37 °C até apresentar turvação equivalente a 0,5 McFarland, com o objetivo de fazer o teste de sensibilidade aos antimicrobianos. Para o tal usaram-se os discos (Oxoid): Ácido Fucsídico (FD) 10 µg, Amoxicilina (AMC), Ampicilina (AMP) 10 µg, Canamicina (K) 30 µg, Cefoxitina (FOX) 30 µg, Ciprofloxacina (CIP) 5 µg, Clindamicina (DA) 2 µg, Cloranfenicol (C) 30 µg, Eritromicina (E) 15 µg, Estreptomicina (S) 10 µg, Gentamicina (CN) 10 µg, Imipeneme (IPM) 10 µg, Lomefloxacina (LOM) 10 µg, Neomicina (N) 10 µg, Nitrofurantoína (F) 300 µg, Oxacilina (OX) 1 µg, Penicilina (P) 10 µg, Quinupristina- Dalfopristina (QD) 15 µg, Rifampicina (RD) 5 µg, Teicoplanina (TEC) 30 µg, Tetraciclina (Te) 30µg, Trimetropim-sulfametoxazol (SXT) 25 µg e Vancomicina (VA) 30 µg.

Os intervalos de resistência seguiram os valores definidos no *Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Seventeenth Informational Supplement* (Clinical and Laboratory Standards Institute, 2007)

A estirpe de *S. aureus* ATCC 25293, foi usada como controlo durante todo o isolamento.



Figura 1- Coloração Rosa-carne (CLIN 18h Escura) e Azul-violeta (CLIN4 4h) em *CHROMagar Staph aureus* (CHROMAGAR).

2.2- Isolamento e avaliação de fenótipo de resistência antimicrobiana em material da clínica

Quadro 2- Locais dos quais foram recolhidas amostras na clínica

Local de colheita	Número de amostras
Pavimento das jaulas do Internamento	1
Grades das jaulas de internamento	1
Grades das jaulas exteriores ao Internamento	1
Pavimento das jaulas exteriores ao Internamento	1
Máquina de Tricotomia	1
Teclado dos computadores da Clínica	1
Pernas das mesas dos consultórios e tapete da balança	1
“Maca” – Mesa móvel usada como maca de cães de raça grande	1
Mesa de Raio-X e Cassete	1

Efetuada a recolha colocaram-se, já no laboratório, os frascos em banho de 37 °C com 25 ciclos de agitação por minuto durante 4 horas. Passadas essas 4 horas, foram colocados 80 µl de inóculo dos frascos em *Baird Parker-RPF* (Biokar), utilizando a técnica de espalhamento com auxílio a uma pipeta de Pasteur de vidro. As placas foram incubadas a 37 °C durante 24 horas. Seguiu-se a colocação de 1 ml do conteúdo dos frascos e nos tubos *falcon* com 9 ml de *Brain Heart Infusion*. Tanto os *falcon*, como os frascos foram suplementados com oxacilina (1 µg/ml)

Os frascos foram colocados novamente no banho a 37 °C e 25 ciclos de agitação por minuto durante 14 horas e os *falcon* foram incubados na estufa a 37 °C durante 14 horas, após

uma passagem pelo vortéx durante 10 segundos. Após as 14 horas, perfazendo um total de 18h, o conteúdo, tanto dos frascos como dos *Falcon*, foi cultivado em meia placa de *Baird Parker- RPF* (Biokar) por técnica de esgotamento com auxílio de uma ansa de 2 µl. As placas foram incubadas a 37°C durante 24 horas. Vinte e quatro horas depois, as placas de *Baird Parker- RPF* (Biokar) foram avaliadas quanto à presença de colónias do género *Staphylococcus* com propriedade coagulase-positiva. Nas placas em que se verificou crescimento de colónias típicas de *Staphylococcus* coagulase-positivo (formação de um halo opaco em redor da colónia cuja cor variava entre preto e cinzento com contorno regular e bem delimitado em circunferência), foram repicadas as colónias para uma placa de *CHROMagar Staph aureus*, sendo esse cultivo feito por técnica de esgotamento em estria. O número de colónias coagulase-positiva a repicar, por local de amostra variou entre 2 a 5 colónias. Após incubação a 37 °C durante 24 horas, observou-se a placa de *CHROMagar Staph aureus* e as colónias que apresentaram cor rosa carne e azul violeta (como demonstrado na **Figura 1**) foram repicadas para um tubo de 5 ml contendo APT, que se colocou posteriormente a incubar a 37 °C até o tubo apresentar turvação, com o objetivo de fazer o antibiograma, conforme anteriormente descrito.

A estirpe de *S. aureus* ATCC 25293, foi usada como controlo durante todo o isolamento.

3- Confirmação por *Polymerase Chain Reaction* (PCR)

Para esta fase, a seleção dos isolados a extrair ácido desoxirribonucleico (ADN) foi efetuada pelo conjunto de características: apresentação de atividade coagulase-positiva em Baird Parker-RPF (Biokar) e as cores de colónias cor rosa carne e azul violeta em *CHROMagar Staph Aureus* (CHROMAGAR, Reino Unido).

3.1- Extração de Ácido Desoxirribonucleico (ADN)

Para a extração de ADN inoculou-se uma colónia isolada em M-H para um tubo com 10 ml de APT. Após incubação durante 24 horas a 37 °C, recolheu-se 1 ml para um tubo Eppendorf, que seguidamente, foi posto na centrífugadora durante 10 minutos a 7 000 rotações por minuto (rpm). Desprezado o sobrenadante, tendo cuidado de não retirar o “pellet”, o procedimento foi repetido mais duas vezes.

O “pellet” final foi ressuspenso com 1 ml de água destilada e centrifugado novamente durante 10 minutos a 7 000 rpm. Posteriormente o “pellet” foi suspenso em 500 µl de tampão SET (composto por NaCl 5M, EDTA 0,5M, Tris 2M e H₂O), adicionando-se mais 25 µl de dodecilo sulfato de sódio (SDS) (National Diagnostics, Reino Unido) a 20 %. Após misturar-se suavemente, adicionou-se 55 µl de lisostafina (Sigma Aldrich, Alemanha) na concentração de

1mg/ml e incubou-se 1 hora e 30 minutos na estufa a 37 °C. Decorrido este tempo na estufa, acrescentou-se ao *Eppendorf* 2,5 µl de Proteinase K (Thermo Fisher Scientific /Finnzymes Oy, Finlândia) a 20mg/ml com 1 µl de lisozima (AppliChem, Alemanha) a 50 mg/ml e deixou-se o tubo durante 2 horas na estufa a 37°C. De salientar que todos os passos previamente descritos foram feitos de forma asséptica em tubos *eppendorf* de 1,5 ml.

Os passos descritos seguidamente foram já feitos sem a necessidade trabalhar “à chama”. Após as 2 horas de incubação na estufa, retirou-se o *Eppendorf* e adicionaram-se 220 µl de NaCl a 5 Molar e 700 µl de clorofórmio:isoamilálcool (AppliChem, Alemanha) a 24:1 e agitou-se vigorosamente. Centrifugou-se durante 10 minutos a 10 000 rpm tendo o sobrenadante sido recuperado e transferido para um *Eppendorf* novo. Adicionaram-se 700 µl de isopropanolol (AppliChem, Alemanha), que se encontrava a -20°C, e misturou-se suavemente a conteúdo. O tubo foi então colocado a precipitar a -20°C durante 1 hora e, posteriormente centrifugado a 10 000 rpm durante 10 minutos. Após este passo, o isopropanolol foi retirado e adicionou-se 800 µl de etanol (Merck, Alemanha) a 70%, previamente arrefecido a -20°C. Neste passo teve-se o cuidado de adicionar o etanol do lado oposto ao posicionamento do “pellet”. Centrifugou-se durante 5 minutos a 10 000 rpm. O etanol foi então removido e deixou-se a secar o tubo à temperatura ambiente. Decorrida a secagem do tubo adicionaram-se 100 µl de água destilada e conservou-se em refrigeração a 4°C. A confirmação de existência de ADN foi feita por observação em Ultra-Violeta no Gel Doc XR (Biorad, EUA)) após eletroforese durante 30 minutos, a 100 Volts e 400 miliAmperes, num gel de agarose (Seakem LE Agarose, Lonza, EUA) a 1,5%. No total do trabalho foram feitas 41 extrações.

3.2 Polymerase Chain Reaction (PCR)

Após se ter obtido a confirmação de extração de ADN na amostra procedeu-se à identificação da espécie por PCR. A parte inicial do PCR consistiu em fazer uma mistura base de 50 µl. Visto que se pretendeu testar a presença, por amostra, das espécies de *Staphylococcus pseudintermedius*, *S. aureus* e *S. intermedius*, houve a necessidade de fazer 3 misturas por primer específico para cada espécie (Sasaki et al, 2010), mais um controlo onde não foi colocado *primer*, mas sim água (controlo negativo). Para cada amostra com *primers* foram adicionados em tubos de *Eppendorf* 33 µl de água destilada, 5 µl *Reaction buffer* (x10) “complete II KCl” (Bioron), 1 µl de *dNTP Mix* a 10 mM/ ml (Fermentas), 2,5 µl do *primer forward* e 2,5µl do *primer reverse* (**Quadro 3**), 1µl de *DFS-Taq DNA Polymerase* 500 U (Bioron) e finalmente 5 µl de ADN. No controlo sem *primers*, o único valor a variar foi o do volume de água, que aumentou para 38 µl, como justificado acima. Foi ainda adicionado um segundo controlo de ADN de *Staphylococcus aureus* de referência ATCC 25 293, a testar com cada um

dos *primers* usados no processo, para certificar a otimização do processo. Este *S. aureus* de referência 25 293 serviu de controlo positivo para *S. aureus*, servindo também como auxiliar para a leitura das bandas de *S. pseudointermedius* em Ultra-Violeta. Após feitas as misturas, 45 µl do conteúdo de cada *ependorf* com os primers das diferentes espécies foi colocado num microtubo juntamente com os 5 µl de ADN da amostra a testar; o mesmo se repetindo com o ADN da estirpe de *S. aureus* de referência. Os microtubos foram colocados no *MyCycler Thermal Cycler* (Biorad, EUA) com o protocolo: desnaturação inicial a 95°C 1 minuto, 1 ciclo; desnaturação final 95°C 1 minuto, anelamento a 53°C 1 minuto, alongação 72°C 1 minuto, 30 ciclos; alongação final 72°C durante 7 minutos em 1 ciclo. Uma mistura composta por 5 µl de uma mistura de *Gene Ruler 1kb DNA Ladder Plus* (Fermentas), *Loading Buffer DNA IV* e TBE 10x (National Diagnostics, Inglaterra) foi adicionado no primeiro poço do Gel Agarose a 1,5%. Seguidamente colocou-se 5 µl de cada amostra a testar nos seguintes poços, fazendo a distribuição nos poços por espécie a testar. A eletroforese foi feita a 100 volts, 400 miliampères, durante 60 minutos. Decorrido esse tempo a confirmação da estirpe em questão foi feita por leitura em Ultra-Violeta no Gel Doc XR.

Quadro 3 - Primers usados para identificação de *Staphylococcus* coagulase-positivo (Sasaki et al, 2010)

Espécie	Primer	Sequência (5´- 3´)	Tamanho dos produtos de PCR (bp)
<i>Staphylococcus aureus</i>	au-F3	TCGCTTGCTATGATTGTGG	359
	au-nucR	GCCAATGTTCTACCATAGC	
<i>Staphylococcus pseudointermedius</i>	pse-F2	TRGGCAGTAGGATTCGTTAA	926
	pse-R5	CTTTTGTGCTYCMTTTTGG	
<i>Staphylococcus intermedius</i>	in-F	CATGTCATATTATTGCGAATGA	430
	in-R3	AGGACCATCACCATTGACATATTGAAACC	

4- Análise estatística

A prevalência de *Staphylococcus* coagulase-positivo em animais de companhia e clínica foi avaliada. Todas as comparações foram feitas com base no teste Qui-Quadrado e teste exato de Fisher, usando valores de P. inferiores a 0,05 eram considerados como estatisticamente significativos para todo o tipo de comparações.

Resultados e Discussão

Para a recolha das amostras foi necessário selecionar previamente os locais específicos dos animais nos quais iria recolher as amostras. Esta seleção foi feita após consulta de trabalhos publicados por Abraham e colaboradores em 2007, Griffeth e colaboradores em 2008 e Weese e colaboradores em 2010, escolhendo-se para este trabalho a região nasal, a boca e a pele, na região interescapular. Em dois casos foi ainda analisada amostra de urina colhida por cistocentese.

No que diz respeito a recolha das amostras, o uso de *Tween 80* pode auxiliar importante na captação das células microbianas pela zaragatoa, em virtude do seu efeito detergente de facilitar o seu desprendimento dos biofilmes.

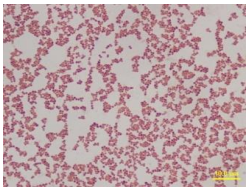
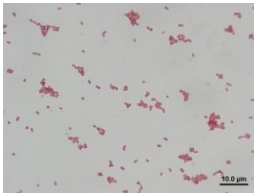
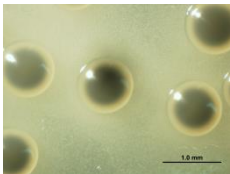
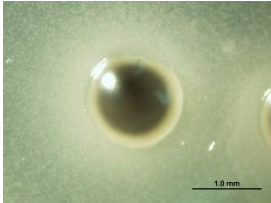
Mediante a conjugação das observações efetuadas durante o isolamento e a confirmação por PCR foi possível constatar que a atividade coagulase *S. pseudointermedius*, somente era observada após 28 a 32 horas de incubação a 37 °C e, em alguns casos, mais tardiamente a este intervalo. Esta observação difere do que se sucede com as colónias de *S. aureus* de referência (ATCC 25293) que apresentavam atividade coagulase às 24 horas. Além da propriedade coagulase mais tardia, as colónias de *S. pseudointermedius* apresentavam uma cor mais esbranquiçada em *Baird Parker- RPF*, comparativamente com a estirpe de *S. aureus* de referência, que apresentava uma cor cinzento-escura nas suas colónias. Observou-se também que as colónias de *S. pseudointermedius*, aquando da sua repicagem para *Chromagar* apresentavam uma consistência mais “aquosa” em comparação com a consistência mais “mucosa” das colónias de *S. aureus* de referência. Outro aspeto diferenciador foi a cor apresentada no *Chromagar*, onde as colónias de *S. pseudointermedius* apresentavam tonalidade variável entre o violeta, o roxo e o azul, distinguindo-se facilmente da cor rosada ou rosa mais escura característica do *S. aureus* de referência e documentada pelo próprio fabricante *Chromagar*. Estas diferenciações foram minuciosamente anotadas durante toda a evolução do trabalho e mais tarde confirmadas por PCR (**Quadro 3**).

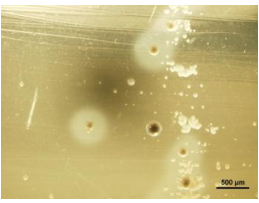
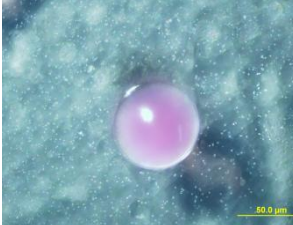
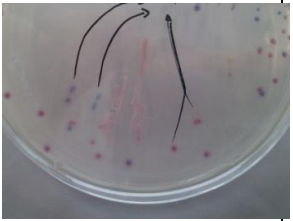
O uso do *Chromagar* (Chromagar) demonstrou grande versatilidade num caso envolvendo uma amostra oral possibilitando a diferenciação em duas colónias distintas (uma rosa e outra violeta) daquilo que em Baird Parker-RPF parecia ser uma colónia só. A espécie das colónias em questão foram posteriormente identificada por PCR sendo as de cor rosada correspondentes a *S. aureus* e as de cor violeta e rosa foram identificadas como *S. pseudointermedius* (última fotografia do **Quadro 4**).

A atividade coagulase-positiva dos *Staphylococcus pseudointermedius*, é sempre mais tardia em comparação com os *Staphylococcus aureus*. Pensamos que o meio *Baird Parker-*

RPF, devido à sua composição com elevado teor salino, auxiliado pelo suplemento de fibrinogénio de plasma de coelho, se revela altamente seletivo no que respeita ao isolamento de *Staphylococcus* com propriedades coagulase-positivas, sendo este meio capaz de dispensar o uso de *Manitol-Salt Agar*, bem como dos tubos para o teste da atividade coagulase.

Quadro 4- Quadro de diferenças observadas entre *S. aureus* (ATCC 25293) e *S. pseudintermedius* no decorrer deste trabalho fotograficamente (continua na página 16).

	Bactéria	Descrição	Fotografia
Coloração Gram	<i>S. aureus</i>	Cocos Gram-positivo dispostos em grandes (cachos) com diâmetro compreendido entre 0,5 e 0,9 µm	 (ATCC 25293)
	<i>S. pseudintermedius</i>	Cocos Gram-positivo dispostos em tetrádas e cachos pouco numerosos em comparação com <i>S. aureus</i> de referência com 0.5-1.5 µm de diâmetro	 (Amostra SI12 Nasal)
Baid Parker RPF	<i>S. aureus</i>	Colónias regulares de cor negra com bordos claros apresentando-se bem delimitadas e com um diâmetro entre 95 e 140 µm. A sua consistência é pastosa e a atividade coagulase é exuberante e positiva passadas 18 horas de incubação a 37 °C	 

	<i>S. pseudintermedius</i>	Colónias cuja cor varia entre o cinzento e castanhado. Apresentam forma circular bem delimitadas com diâmetro entre 130 e 170 µm. A sua consistência é muito líquida. A sua actividade coagulase varia entre 28h e 36h, havendo casos em que chegou a ser registado às 48h	 <p>(Amostra SI8 oral)</p>
Chromagar	<i>S. aureus</i>	Colónias regulares de cor entre rosa e rosa escuro, bem delimitadas, com consistência pastosa e com diâmetro entre 50 e 60 µm	 <p>Colónia de <i>S. aureus</i></p>
	<i>S. pseudintermedius</i>	Colónias redondas mas cuja cor varia entre violeta, roxo e azul. Estão bem delimitadas e consistência é mais líquida. O seu diâmetro varia entre 50 e 60 µm	 <p>(Amostra SI21 Oral)</p> <p><i>S. pseudointermedius</i>- colónias cor azul e violeta</p> <p><i>S. aureus</i>- colónias rosa carne e rosa escura</p>

Quanto à cor observada na placa de *Chromagar*, essa revela-se um desafio complexo nomeadamente na identificação das propriedades do meio que sustentam essa mesma cor, achando-se que o segredo possa estar na mistura cromogénica descrita pelo fabricante do meio, mas cuja constituição não é possível saber.

As amostras foram recolhidas em 23 animais: 21 (91,3 %) cães e 2 gatos (8,7 %), com idades compreendidas entre os 13 e 0 anos de idade, sendo 9 (39,1 %) machos e 14 (60,9 %) fêmeas. Treze (56,5 %) destes animais eram residentes no concelho do Porto e 9 (39,1%) fora

dele, não se conhecendo o concelho de residência num dos animais. Em 14 dos animais houve conhecimento da história clínica, havendo 6 (42,9 % nos 14 animais) que apresentavam historial de patologia dermatológica. Dentro da espécie canina 18 (81,8 %) eram da área do grande porto, 2 (9,1 %) fora da área do Grande Porto sendo que um deles se desconhece a área de residência. Os dois gatos pertencem ambos à área do grande Porto (9,1 %).

No que respeita a animais, nos quais foram isolados *Staphylococcus* coagulase-positivo, verificou-se que 15 (65,2 %) era positivos para esta propriedade, sendo os restantes 8 (34,8 %) negativos (Quadro 5). Dos 15 animais portadores *Staphylococcus* coagulase-positivo, 14 (93,3 %) eram cães e um (6,7 %) era gato. Nos cães, 11 deles (73,3 %) eram portadores de *S. pseudointermedius* e 7 (46,7 %) possuíam *S. aureus*. Já no gato a única espécie encontrada foi *S. pseudointermedius*. (**Quadro 6**)

Quadro 5- Prevalência de *Staphylococcus* coagulase-positivo nos 23 animais estudados

Actividade Coagulase-positiva	Número de isolados (%)
Presente	15 (65,2 %)
Ausente	8 (34,8 %)

Quadro 6 – Distribuição percentual de *Staphylococcus* coagulase-positivo considerando-se apenas os 15 animais em que se isolaram este fenótipo

Espécie	Número de <i>S. pseudointermedius</i> n (%)	Número de <i>S. aureus</i> n (%)
Cão (n=14)	11 (73,3 %)	7 (46,7 %)
Gato (n=1)	1 (6,7 %)	0 (0,0 %)

Analisando detalhadamente os 15 animais em que foram isolados *Staphylococcus* coagulase-positivo, verificou-se que 8 (53,3 %) eram portadores exclusivos de *S. pseudointermedius* e 3 (20,0 %) portadores exclusivos de *S. aureus*. Quatro dos animais (26,7 %) eram portadores simultaneos de *S. pseudointermedius* e *S. aureus*. O valor de *P* era 0,077 indicando que esta distribuição de bactérias por animal não é estatisticamente significativa. A proximidade de *P* do valor 0,05 pode indiciar que uma amostragem maior poderá tornar estas observações relevantes.

Focando a análise nos animais portadores de *S. aureus* (n=7), 3 (42,9 %) eram machos e 4 (57,1 %) eram fêmeas (**Quadro 7**). Todos os animais (100%) eram residentes na área do Grande Porto. A idade dos animais em que se foram isolados *S. aureus* era compreendida entre 0 e 5 anos em 2 casos (28,6 %) e entre 6 e 13 anos em 5 (71,4 %) animais. O período de recolha de amostras destes animais situou-se entre Setembro e Dezembro de 2011, sendo 4

(57,1 %) animais com *S. aureus* pertencentes ao período de recolha entre Setembro e Outubro e 3 (42,9 %) animais ao período compreendido entre de Novembro e Dezembro. Nenhum destes dados se revelou estatisticamente significativo ($P=1$), como fator predisponente à contaminação/infeção por *S. aureus* em animais de companhia.

No que respeita aos pontos de amostragem onde foram achados *S. aureus* nestes 7 animais, observou-se que em 5 animais (71,4 %) foram isolados *S. aureus* na mucosa oral uma frequência significativamente mais elevada ($P\leq 0,05$) que o verificado em amostras nasais em que foram isolados *S. aureus* em 3 (42,9 %) animais, e a pele (sem qualquer isolado). Estes dados revelam que a mucosa oral é frequentemente contaminada, sendo uma localização particularmente crítica em função da interação com os donos. No conjunto dos 7 animais foram encontrados 2 (28,6 %) MRSA.

Quadro 7- Caracterização dos animais (n=7) em que se isolaram *S. aureus*

Propriedade	Número (%)	P
Macho	3 (42,9 %)	1
Fêmea	4 (57,1 %)	
Área do grande Porto	7 (100 %)	1
Fora Área do Grande Porto	0 (0,0 %)	
0-5 anos de idade	2 (28,6 %)	1
6-13 anos de idade	5 (71,4 %)	
Recolha Set-Out	4 (57,1 %)	1
Recolha Nov-Dez	3 (42,9 %)	
Isolado Oral	5 (71,4 %)	0,007
Isolado Nasal	3 (42,9 %)	0,077
Isolado Pele	0 (0,0 %)	-
Resistência à Oxacilina	2 (28,6 %)	0,608

Em relação aos 12 animais portadores de *S. pseudointermedius* (**Quadro 8**), 4 (33,3 %) eram machos e 8 (66,7 %) eram fêmeas. Em um dos animais desconheceu-se a área de residência mas dos restantes onze, 10 (90,9 %) eram da área do Grande Porto e 1 (9,1%) não pertencia a essa mesma área. Cinco animais (41,7 %) tinham uma idade compreendida entre os 0 e 5 anos de idade e 7 (58,3 %) tinham uma idade entre 6 e 13 anos. O intervalo de recolha não se revelou estatisticamente significativo para o isolamento de *S. pseudointermedius* em animais de companhia ($P=1$), o mesmo acontecendo com o período de recolha: em 6 animais (50,0 %) foram isolados *S. pseudointermedius* no período de Setembro a Outubro e no período de Novembro a Dezembro foi isolada esta bactéria em mais 6 animais (50,0 %). Também não se chegou a uma conclusão que apresente características estatisticamente significativa ($P=0,229$) em relação ao local de isolamento de *S. pseudointermedius*, havendo 6 animais

(50,0 %) em que a bactéria foi isolada na região oral, 5 (41,7 %) em que se achou *S. pseudointermedius* na região nasal e 7 animais (58,3 %) em que foram encontrados na pele. Estes dados sugerem que a pele é o local de maior probabilidade de se isolar *S. pseudointermedius*, o que não corresponde ao documentado pela *European Medicine Agency/ Committee of Veterinary Medicinal Products* (2011), em que se identificam as regiões nasal e anal como sendo as mais frequentemente colonizadas. Mas estes resultados corroboram parcialmente o que Guardabassi e Bannoehr (2012) documentaram como locais de maior prevalência de *S. pseudointermedius*, ou seja, mucosa oral e períneo. No entanto, só uma maior amostragem nos daria informação que fosse estatisticamente relevante. Dos 12 animais portadores de *S. pseudointermedius*, 4 (33,3 %) apresentam resistência à oxacilina.

Quadro 8 – Caracterização dos animais (n=12) em que se isolaram *S. pseudointermedius*

Propriedade	Número (%)	P
Macho	4 (33,3 %)	0,525
Fêmea	8 (66,7 %)	
Área do grande Porto (n=11)	10 (90,9 %)	1
Fora Área do Grande Porto (n=11)	1 (9,1 %)	
0-5 anos de idade	5 (41,7 %)	0,505
6-13 anos de idade	7 (58,3 %)	
Recolha Set-Out	6 (50,0 %)	1
Recolha Nov-Dez	6 (50,9 %)	
Isolado Oral	6 (50,0 %)	0,229
Isolado Nasal	5 (41,7 %)	0,505
Isolado Pele	7 (58,3 %)	0,200
Resistência à Oxacilina	4 (33,3 %)	1

Em termos absolutos de amostragem (n=23) existe uma percentagem de animais com *S. aureus* de 30,4 % (n=7) e de 52,2 % (n=12) de animais com *S. pseudointermedius*. Dentro dos animais com MRSA a prevalência foi de 8,7 % (n=2), valor superior ao documentado no relatório da *European Food Safety Authority* (EFSA) onde estão registadas prevalências de MRSA em cães entre 0,04 e 0,3 %. Os animais com MRSP deste trabalho apresentam valores de prevalência de 17,4 % (n=4). Este último dado revela-se muito preocupante e superior aos valores registados nos trabalhos efetuados ao nível Europeu e América do Norte. Uma justificação para este facto, pode ser o elevado uso de antibióticos a nível da prática clínica em Veterinária em Portugal, o que constitui um fator de risco. O valor de MRSP é o dobro do de MRSA o que não corrobora as observações de Ruscher (2009).

Dos 23 animais, 6 possuíam historial clínico associado a patologia dermatológica (26,1 %). Nos 10 animais com *Staphylococcus* coagulase-positivo em que se conhecia a história clínica completa, 3 (30 %), em que foram isolados *S. pseudintermedius*, detinham passado de patologia dermatológica sendo 1 (33,3 %) MRSP ($P=1$). Mas nenhum destes dados se revelou estatisticamente significativo, ($P=1$).

Avaliando outras resistências antibióticas associadas a MRSP encontrados em 4 animais, verificou-se que quatro resistências estão presentes, de um modo estatisticamente significativo, nomeadamente: amoxicilina, gentamicina, trimetropim-sulfametoxazole e lomefloxacina (**Quadro9**).

Já em 3 animais com MRSP, verificou-se esse *S. pseudintermedius* possuía também resistência a gentamicina e amoxicilina ($P=0,018$). (**Quadro 9**)

Quadro 9 – Resistências antimicrobianas mais frequentemente associadas à resistência à oxacilina em MRSP (n=4)

Resistência	Número (%)	P
Amoxicilina	3 (75 %)	0,018
Gentamicina	3 (75 %)	0,018
Lomefloxacina	4 (100 %)	0,002
Trimetropim-Sulfametoxazole	4 (100 %)	0,002

Estes dados podem ser indicativos que o tratamento seguro de MRSP pode ser feito através do uso de rifampicina, clindamicina ou ciclosporina por exemplo. Mas um perfil de resistência antibiótica deve ser feito em todos os casos de modo a garantir a eficácia do tratamento.

Relativamente às amostras recolhidas na clínica, em apenas dois locais (22,2 %) foi possível isolar *Staphylococcus* coagulase-positivo.

Nesses dois locais verificou-se que em ambos havia uma presença de *S. pseudintermedius* (100 % nos *Staphylococcus* coagulase-positivo encontrados). Esses dois isolados apresentaram resistência à oxacilina (100 %)

Em relação à presença de *S. aureus* nas amostras recolhidas, apenas num dos locais (11,1 % no total de amostras da clínica) onde foram encontrados *Staphylococcus* coagulase-positivo, foi possível isolar *S. aureus*. No entanto, uma maior amostragem de locais da clínica poderia permitir uma melhor conclusão quanto à presença de *S. aureus* entre os isolados de *Staphylococcus* coagulase-positivo. A colónia de *S. aureus* isolada não apresentava resistência à metilina (0%).

Avaliando a presença de *S. aureus* e *S. pseudointermedius* por local, observou-se que ambas as bactérias existiam num dos locais amostrados (11,1 %) e no outro local registou-se apenas a presença de *S. pseudointermedius* (11,1 %). Tendo em conta que os dois *S. pseudointermedius* isolados apresentavam resistência à meticilina, no local onde se isolaram as duas espécies de *Staphylococcus* coagulase-positivo, temos um MRSP e um MSSA.

Nas amostras de animais observou-se a presença de *S. pseudointermedius* com variadíssimos perfis de resistência por local de amostra, o que confirma o referido por Guardabassi e Bannoehr (2012) quanto à variedade de estirpes existentes nesta espécie (**Quadro 10**). De notar também a presença de MRSP com diferentes perfis de resistência num mesmo animal, bem como no local de amostra desse mesmo animal.

No **Quadro 11** estão registados os perfis de resistência de *S. pseudointermedius* isolados no ambiente da Clínica Veterinária.

Quadro 10- Perfis de resistência de *S. aureus* e *S. pseudointermedius* por ponto amostrado nos animais

Local de amostra	Espécie	Perfil de resistência (*)	Nº do animal
Oral	<i>S. pseudointermedius</i>	AMP P	14,22
		AMP P OX CIP LOM	15
		AMP SXT OX CIP LOM	15
		AMP S C K N E P DA	6, 11
		AMP SXT P OX CIP LOM	15
		AMP SXT S AMC OX CIP K N E LOM P DA	13
	AMP SXT S AMC OX CIP C K N CN E LOM P DA	13	
<i>S. aureus</i>	AMP P	17,22	
	AMP S C K N E P Da	12	
Nasal	<i>S. pseudointermedius</i>	AMP	4
		AMP P	21
		AMP S C K N E P DA	6,11
		AMP SXT S AMC OX CIP K N E LOM P DA	13
		AMP SXT P AMC OX CIP C K DA CN LOM S N	17
	<i>S. aureus</i>	AMP P	4
	AMP P TE OX C	17	
Pele	<i>S. pseudointermedius</i>	AMP P	20
		AMP SXT OX CIP LOM	15
		AMP S C K N E P DA	11,12
		AMP SXT RD P OX CIP LOM	15
		AMP SXT RD P OX FD CIP LOM	15
		AMP SXT P AMC OX CIP C K DA CN E LOM S N	17
	AMP SXT S TE AMC OXA CIP K N CN E LOM P DA	1,13	
<i>S. aureus</i>			
Urina	<i>S. pseudointermedius</i>	AMP P TE	22
	<i>S. aureus</i>	AMP P FOX AMC OX CIP LOM	23

(*) Consultar abreviaturas na secção de Material e Métodos (página 8)

Quadro 11 - Perfis de resistência de *S. aureus* e *S. pseudointermedius* isolados na Clínica Veterinária

Local	Espécie	Perfil de resistência
Pavimento das jaulas exteriores ao Internamento	<i>S. pseudointermedius</i>	AMP SXT P AMC OX CIP K DA E LOM
Teclado computadores	<i>S. pseudointermedius</i>	AMP SXT P AMC OX CIP K DA CN E LOM
	<i>S. aureus- AMP P</i>	AMP P

Uma avaliação conjunta dos *Staphylococcus* isolados em animais e condições de enriquecimento descritas nas páginas 13 e 14 da secção de Material e Métodos permitiu concluir que nos em 7 animais (100%) foram isolados *S. aureus* com um enriquecimento de 6 horas. Já o enriquecimento em que se isolou mais *S. pseudointermedius* foi o que envolveu 6 horas de incubação, sendo isolada esta bactéria em 11 animais (91,7 %) (**Quadro 12**).

Os dois animais portadores de MRSA deste trabalho, tiveram ambos (100%) este fenótipo isolado no enriquecimento de 6 horas, bem como os 5 (100%) com MSSA, em que se isolou este fenótipo com o mesmo tempo de enriquecimento. Deste modo o enriquecimento durante 6 horas parece ser suficiente para se isolar tanto MSSA como MRSA em animais (**Quadro 12**).

Quanto aos animais portadores de MRSP (n=4), todos (100%) tiveram este fenótipo isolado às 6 horas de enriquecimento assim como em 18 horas com oxacilina. Nos animais portadores de MSSP (n=8) foi isolado este fenótipo, maioritariamente no enriquecimento de 6 horas, registando-se 7 (87,5 %) animais (**Quadro 12**).

A adição oxacilina ao BHI e posterior enriquecimento durante 18 horas de incubação a 37 °C não foi benéfica para isolamento de MRSA. No caso dos isolados MRSP, os que cresceram no enriquecimento durante 18 horas com oxacilina, demonstraram ser resistentes à meticilina. O facto de se ter achado igual número MRSP num enriquecimento durante 6 horas sugere que um protocolo que envolva este último enriquecimento e um enriquecimento de 18 horas com oxacilina possa originar um aumento da deteção e isolamento de possíveis MRSP em animais.

Quadro 12- Condições de enriquecimento em que se identificaram *S. pseudintermedius* e *S. aureus* em função do número de animais amostrados (n=23)

Espécie/ Fenótipo	Animais Positivos	Número (%) de animais positivos		
		6 horas	18 horas	18 horas + Oxacilina
<i>S. aureus</i>	7	7 (100 %)	3 (42,8 %)	7 (58,3 %)
<i>S. pseudintermedius</i>	12	11 (91,7 %)	7 (58,3 %)	
MRSA	2	2 (100 %)	3 (60,0 %)	4 (100 %)
MSSA	5	5 (100 %)		
MRSP	4	4 (100 %)		
MSSP	8	7 (87,5 %)		

Conclusão

Foi objetivo deste trabalho testar uma nova metodologia para isolamento de *S. pseudintermedius*, que dispensasse grande parte da bateria de testes bioquímicos documentados como essenciais para confirmação e diferenciação desta bactéria em relação a outros *Staphylococcus* coagulase-positivos. Nas amostras recolhidas a aplicação sucessiva de uma etapa de enriquecimento em BHI suplementado com Tween 80, de isolamento em BP-RPF e a confirmação em Chrom-agar revelou-se surpreendentemente eficaz no isolamento de *Staphylococcus pseudintermedius*. Com esta metodologia dispensamos assim meios de cultura como Manitol-Salt agar, Agar-Sangue 5% bem como a complexa, demorada e dispendiosa bateria de testes acessórios nomeadamente o PBP-2a, a DNase, a fermentação de carboidratos, a fermentação de açúcares ou mesmo o uso de *API Staph*. O isolamento laboratorial de *Staphylococcus pseudintermedius*, com os meios por nós usados, torna-se deste modo rápido, e muito específico, conforme demonstrado pelos estudos em PCR. O desenvolvimento de métodos específicos para o isolamento de *S. pseudintermedius* continua a ser um objetivo em microbiologia clínica. O elevado número de isolados obtidos nas superfícies da Clínica e nos animais amostrados, não demonstrando cabalmente, indica que o método empregue tem também uma sensibilidade muito satisfatória.

De salientar ainda o facto de o meio de cultura BP-RPF (Biokar) ser essencialmente utilizado em Microbiologia Alimentar para enumeração de *Staphylococcus* coagulase-positivo. Em face aos resultados obtidos, podemos afirmar que uma abordagem multidisciplinar pode representar um enriquecimento dos protocolos e métodos de isolamento usados em Microbiologia Clínica.

Salienta-se porém que, apesar do método de isolamento descrito neste trabalho ter revelado sensibilidade e especificidade muito satisfatórias na identificação de *S. pseudointermedius*, sem se recorrer a muitos testes diferenciadores de outras espécies de *Staphylococcus* coagulase-positivo é recomendável efetuar confirmação genética por PCR e um estudo posterior dos isolados por *Pulsed Field Gel Electrophoresis* (PFGE).

Em termos clínicos existe elevada prevalência de MRSA e sobretudo de MRSP presente na clínica veterinária estudada, tendo-se registado valores muito superiores aos registados na literatura.

Neste trabalho não foi possível estabelecer qualquer fator de risco estatisticamente significativo para presença de *S. pseudointermedius*, mas uma amostragem maior e um estudo longitudinal, com acompanhamento mais próximo dos animais amostrados e co-habitantes, poderão proporcionar uma maior segurança e uma avaliação de potenciais contaminações cruzadas com esta bactéria. O tratamento de MRSP pode ser feito de modo seguro usando antibióticos como rifampicina, clindamicina e ciclosporina, mas a determinação do perfil de resistência da estirpe deve ser sempre feito.

Os isolados nos materiais da clínica de *S. pseudointermedius* apresentam um elevado número de resistências antibióticas. Uma desinfecção mais exaustiva é requerida sendo muito importante avaliar a eficácia e o tempo de contacto requerido para cada desinfetante. A higienização de mãos de todo pessoal frequentador da clínica revela-se um ponto fulcral.

Um possível controlo microbiológico pelo perfil de resistência antibiótica de animais frequentadores da clínica pensa-se ser necessário em todos os casos de patologia, independentemente da sua origem, de modo a ter tratamentos mais efetivos. A parceria da Clínica Veterinária participante com o laboratório de Microbiologia-Tecnologia Alimentar-Inspeção Sanitária permitiu um acompanhamento mais próximo dos animais ali internados/tratados, sendo importante para ambas as partes a procura e a troca de informações entre clínicos e microbiologistas de forma a elevarmos o patamar de conhecimento, saúde animal e defesa da saúde pública.

Bibliografia

- (1) Abraham JL, Morris DO, Griffeth GC, Shofer FS, Rankin SC (2007) "Surveillance of healthy cats and cats with inflammatory skin disease for colonization of the skin by methicillin-resistant coagulase-positive staphylococci and *Staphylococcus schleiferi* ssp. *Schleiferi*" ***Veterinary Dermatology*** 18, 252-259.
- (2) Atalay B, Ergin F, Cekinmez M, Caner H, Altinors N. (2005). "Brain abscess caused by *Staphylococcus intermedius*" ***Acta Neurochir (Wien)***, 147, 347-8; discussion 348.
- (3) Bannoehr J, Ben Zakour NL, Waller AS, Guardabassi L, Thoday K L, Van Den Broek AH & Fitzgerald J R (2007) "Population genetic structure of the *Staphylococcus intermedius* group: insights into agr diversification and the emergence of methicillin-resistant strains" ***Journal of Bacteriology***, 189, 8685-92.
- (4) Bannoehr J, Guardabassi L (2012) "Staphylococcus pseudintermedius in the dog: taxonomy, diagnostics, ecology, epidemiology and pathogenicity" ***Veterinary Dermatology***, April 2012.
- (5) Black CC, Solyman SM, Eberlin LC, Bemis DA, Woron AM e Kania SA (2009) "Identification of a predominant multilocus sequence type, pulsed-field gel electrophoresis cluster, and novel staphylococcal chromosomal cassette in clinical isolates of *mecA*-containing, methicillin-resistant *Staphylococcus pseudintermedius*" ***Veterinary Microbiology***, 139, 333-8.
- (6) Bond R, Loeffler A (2012) "What's happened to *Staphylococcus intermedius*? Taxonomic revision and emergence of multi-drug resistance" ***BSAVA, Journal of Small Animal Practice*** 53, 147–154.
- (7) Campanile F, Bongiorno D, Borbone S, Venditti M, Giannella M, Franchi, C e Stefani, S (2007) "Characterization of a variant of the SCCmec element in a bloodstream isolate of *Staphylococcus intermedius*" ***Microbial Drug Resistance***, 13, 7-10.

- (8) Chuang, CY, Yang, YL, Hsueh, PR e Lee, PI (2010) "Catheter-related bacteremia caused by *Staphylococcus pseudintermedius* refractory to antibiotic-lock therapy in a hemophilic child with dog exposure" ***Journal of Clinical Microbiology***, 48, 1497-8.
- (9) ***Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Seventeenth Informational Supplement***, Clinical and Laboratory Standards Institute, 2007
- (10) Cox HU, Hoskins JD, Newman SS, Foil CS, Turnwald GH e Roy AF (1988) "Temporal study of staphylococcal species on healthy dogs" ***American Journal of Veterinary Research*** 49, 747-751.
- (11) Devriese LA, Vancanneyt M, Baele M, Vaneechoute M, De Graef E, Snauwaert C, Cleenwerck I, Dawyndt P, Swings J, Decostere, A. e Haesebrouck F (2005) "Staphylococcus pseudintermedius sp. nov., a coagulase-positive species from animals" ***International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*** 55, 1569-1573.
- (12) Dufour P, Jarraud S, Vandenesch F, Greenland T, Novick RP, Bes M, Etienne J e Lina G. (2002) "High genetic variability of the agr locus in *Staphylococcus* species" ***Journal of Bacteriology***, 184, 1180-6.
- (13) European Food Safety Authority (2012), "The European Union Summary Report on antimicrobial resistance in zoonotic and indicator bacteria from humans, animals and food in 2010" ***EFSA Journal*** 2012;10(3):2598
- (14) *European Medicine Agency/ Committee of Veterinary Medicinal Products* (2011) "Reflection paper on meticillin-resistant *Staphylococcus pseudintermedius*"
- (15) Frank LA, Kania SA, Kirzeder EM, Eberlein LC e Bemis DA (2009) "Risk of colonization or gene transfer to owners of dogs with meticillin-resistant *Staphylococcus pseudintermedius*" ***Veterinary Dermatology*** 20, 496-501.
- (16) Futagawa-Saito K, Ba-Thein W, Sakurai N & Fukuyasu T (2006) "Prevalence of virulence factors in *Staphylococcus intermedius* isolates from dogs and pigeons" ***BMC Vet Res***, 2, 4.

- (17) Geohegan JA, Smith EJ, Speziale P & Foster TJ (2009) "Staphylococcus pseudintermedius expresses surface proteins that closely resemble those from Staphylococcus aureus" ***Veterinary Microbiology***, 138, 345-52.
- (18) Gerstadt K, Daly JS, Mitchell M, Wessolossky M & Cheeseman SH (1999) "Methicillin-resistant Staphylococcus intermedius pneumonia following coronary artery bypass grafting" ***Clinical Infectious Diseases***, 29, 218-9.
- (19) Griffeth GC, Morris DO, Abraham JL, Shofer FS & Rankin SC (2008) "Screening for skin carriage of methicillin-resistant coagulase-positive staphylococci and Staphylococcus schleiferi in dogs with healthy and inflamed skin" ***Veterinary Dermatology*** 19, 142-149.
- (20) Guardabassi L, Loeber ME & Jacobson A (2004) "Transmission of multiple antimicrobial-resistant Staphylococcus intermedius between dogs affected by deep pyoderma and their owners" ***Veterinary Microbiology*** 98, 23-27.
- (21) Gzanelli G, Sansoni A, Zanchi A, Cresti S, Pollini S, Rossolini GM and Cellesi C, (2002) "Staphylococcus aureus nasal carriage in the community: a survey from central Italy" ***Epidemiology Infection*** 129, 417–420.
- (22) Hanselman BA, Kruth S & Weese JS (2008) "Methicillin-resistant staphylococcal colonization in dogs entering a veterinary teaching hospital" ***Veterinary Microbiology*** 126, 277-81.
- (23) Hanselman BA, Kruth SA, Rousseau J & Weese JS (2009) "Coagulase positive staphylococcal colonization of humans and their household pets" ***Canadian Veterinary Journal*** 50, 954-958.
- (24) Iyori K, Hisatsune J, Kawakami T, Shibata S, Murayama N, Ide K, Nagata M, Fukata T, Iwasaki T, Oshima K, Hattori M, Sugai M, Nishifuji K (2010) "Identification of a novel Staphylococcus pseudintermedius exfoliative toxin gene and its prevalence in isolates from canines with pyoderma and healthy dogs" ***FEMS Microbiology Letters***, Volume 312, Issue 2, pages 169–175, November 2010.

- (25) Kadlec, K., Schwarz S, Perreten V, Andersson UG, Finn M, Greko C, Moodley A, Kania SA, Frank LA, Bemis DA, Franco A, Iurescia M, Battisti A, Duim B, Wagenaar JA, Van Duijkeren E, Weese JS, Fitzgerald JR, Rossano A & Guardabassi L (2010) "Molecular analysis of methicillin-resistant *Staphylococcus pseudintermedius* of feline origin from different European countries and North America" ***Journal of Antimicrobial Chemotherapy*** 65, 1826-1828.
- (26) Kawakami T, Shibata S, Murayama N, Nagata M, Nishifuji K, Iwasaki T, Fukata T (2010) "Antimicrobial susceptibility and methicillin resistance in *Staphylococcus pseudintermedius* and *Staphylococcus schleiferi* subsp. *coagulans* isolated from dogs with pyoderma in Japan" ***Journal of Veterinary Medicine Science*** 2010 Dec;72(12):1615-9. Epub 2010 Aug 10.
- (27) Lilenbaum W, Esteves AL & Souza GN (1999) "Prevalence and antimicrobial susceptibility of staphylococci isolated from saliva of clinically normal cats" ***Letters Applied Microbiology***, 28, 448-52.
- (28) Loeffler A, Linek M, Moodley A, Guardabassi L, Sung JM, Winkler M, Weiss, R. & Lloyd DH (2007) "First report of multiresistant, *mecA*-positive *Staphylococcus intermedius* in Europe: 12 cases from a veterinary dermatology referral clinic in Germany" ***Veterinary Dermatology*** 18, 412-421.
- (29) Moodley A, Stegger M, Ben Zakour NL, Fitzgerald JR & Guardabassi L (2009) "Tandem repeat sequence analysis of staphylococcal protein A (*spa*) gene in methicillin-resistant *Staphylococcus pseudintermedius*" ***Veterinary Microbiology***, 135, 320-6.
- (30) Paul NC, Moodle A, Ghibaud G, Guardabassi L (2010) "Carriage of methicillin-resistant *Staphylococcus pseudintermedius* in small animal veterinarians: indirect evidence of zoonotic transmission" ***Zoonoses and Public Health***, Volume 58, 533-539, Dezembro 2011.

- (31) Perreten V, Kadlec K, Schwarz S, Gronlund-Andersson U, Finn M, Greko C, Moodley A, Kania SA, Frank LA, Bemis DA, Franko A, Iurescia M, Battisti A, Duim B, Wagenaar JA, Van Duijkeren E, Weese JS, Fitzgerald JR, Rossano A & Guardabassi L. (2010) "Clonal spread of methicillin-resistant *Staphylococcus pseudintermedius* in Europe and North America: an international multicentre study" ***Journal of Antimicrobial Chemotherapy*** 65, 1145-1154.
- (32) Pottumarthy S, Schapiro JM, Prentice JL, Houze YB, Swanzy SR, Fang FC & Cookson, BT (2004). "Clinical isolates of *Staphylococcus intermedius* masquerading as methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*" ***Journal of Clinical Microbiology***, 42, 5881-4.
- (33) Ruscher C, Lubke-Becker A, Wleklinski CG, Soba A, Wieler LH & Walther B (2009) "Prevalence of methicillin-resistant *Staphylococcus pseudintermedius* isolated from clinical samples of companion animals and equidae" ***Veterinary Microbiology*** 136, 197-201.
- (34) Saijonmaa-Koulumies LE, Lloyd DH (2002) "Colonization of neonatal puppies by *Staphylococcus intermedius*" ***Veterinary Dermatology***, 13: 123–130.
- (35) Sasaki T, Kikuchi K, Tanaka Y, Takahashi N, Kamata S & Hiramatsu K. (2007a.) "Methicillin-resistant *Staphylococcus pseudintermedius* in a veterinary teaching hospital" ***Journal of Clinical Microbiology***, 45, 1118-25.
- (36) Sasaki T, Tsubakishita S, Tanaka Y, Sakusabe A, Ohtsuka M, Hirota S, Kawakami T, Fukata T, Hiramatsu K (2010) "Multiplex-PCR Method for Species Identification of Coagulase-Positive *Staphylococci*" ***Journal of Clinical Microbiology*** 48, 765-769.
- (37) Simões R, Aires-De-Sousa M, Conceição T, Antunes F, Costa P, Lencastre H (2011) "High Prevalence of EMRSA-15 in Portuguese Public Buses: A Worrying Finding" ***PLoS One***.
- (38) Stegmann R, Burnens A, Maranta CA & Perreten V (2010) "Human infection associated with methicillin-resistant *Staphylococcus pseudintermedius* ST71" ***Journal of Antimicrobial Chemotherapy*** 65, 2047-2048.

- (39) Van Duijkeren E, Houwers DJ, Schoormans A, Broekhuizen-Stins MJ, Ikawaty R, Fluit AC & Wagenaar JA (2008) "Transmission of methicillin-resistant *Staphylococcus intermedius* between humans and animals" ***Veterinary Microbiology***, 128, 213-5.
- (40) Van Duijkeren E, Kamphuis M, Van Der Mije IC, Laarhoven, LM, Duim B, Wagenaar JA, Houwers DJ (2011) "Transmission of methicillin-resistant *Staphylococcus pseudintermedius* between infected dogs and cats and contact pets, humans and the environment in households and veterinary clinics" ***Veterinary Microbiology*** 150, 338-343.
- (41) Van Hoovels L, Vankeerberghen A, Boel A, Van Vaerenbergh K e De Beenhouwer H (2006) "First case of *Staphylococcus pseudintermedius* infection in a human" ***Journal of Clinical Microbiology*** 44, 4609-4612.
- (42) Wagenaar JA, Kamphuis M, Van Der Mije C, Van Duijkeren E, Fluit AC (2008) "Methicillin-resistant *Staphylococcus intermedius* (MRSI) infections in dogs and cats; zoonotic potential and environmental contamination" ***C161. ASM conference***, June 15-18 2008 Copenhagen.
- (43) Weese J, Frank LA, Reynolds LM e Bemis DA (2009a) "Retrospective study of methicillin-resistant and methicillin-susceptible *Staphylococcus pseudintermedius* infections in dogs. 43A" ***ASM. Methicillin-resistant Staphylococci in Animals: Veterinary and Public Health Implications, September 22 - 25, 2009 London, England.***
- (44) Weese JS & Van Duijkeren E (2010) "Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus pseudintermedius* in veterinary medicine" ***Veterinary Microbiology***, 140, 418-29.
- (45) Zubier IE, Kanbar T, Alber J, Lammler C, Akineden O, Weiss R e Zshock M. (2007) "Phenotypic and genotypic characteristics of methicillin/oxacillin-resistant *Staphylococcus intermedius* isolated from clinical specimens during routine veterinary microbiological examinations" ***Veterinary Microbiology***, 121, 170-6.