



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO

UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DA AMAZÔNIA-UFRA

DOUTORADO EM SAÚDE E PRODUÇÃO ANIMAL NA AMAZÔNIA

SINEREY KARLA SALIM ARAGÃO DE SOUSA

**OCORRÊNCIA DO GENE *mecA* EM *Staphylococcus* spp ISOLADOS DA PELE
DE CÃES COM Piodermite recidivante**

BELÉM

2018

SINEREY KARLA SALIM ARAGÃO DE SOUSA

**OCORRÊNCIA DO GENE *mecA* EM *Staphylococcus* spp ISOLADOS DA PELE
DE CÃES COM PIODERMITE RECIDIVANTE**

Tese apresentada à Universidade Federal Rural da Amazônia, como parte do requisito do Curso de Doutorado em Saúde e Produção Animal na Amazônia, para obtenção do título de Doutor em saúde e produção animal.

Orientador: Prof. Dr. PhD Andre Marcelo Conceição Meneses.

BELÉM
2018

Sousa, Sinerey Karla Salim Aragão de

Ocorrência do gene *mecA* em *Staphylococcus* isolados da pele de cães com piodermite recidivante e dermatite atópica / Sinerey Karla Salim Aragão de Sousa. – Belém, PA, 2018.67 f.

Tese (Doutorado em Saúde e Produção Animal na Amazônia) – Universidade Federal Rural da Amazônia, 2018.

Orientador: Andre Marcelo Conceição Meneses.

1. Dermatite Atópica Canina – DAC. 2. Gene *mecA*. 3. Piodermite Recidivante. 4. *Staphylococcus* spp. I. Meneses, Andre Marcelo Conceição (orient.) II. Título

CDD – 636.708951

SINEREY KARLA SALIM ARAGÃO DE SOUSA

**OCORRÊNCIA DO GENE *mecA* EM *Staphylococcus* spp ISOLADOS DA PELE
DE CÃES COM PIODERMITE RECIDIVANTE**

Tese apresentada à Universidade Federal Rural da Amazônia, como parte do requisito do Curso de Doutorado em Saúde e Produção Animal na Amazônia, para obtenção do título de Doutor em saúde e produção animal.

Orientador: Professor PhD André Marcelo Conceição Meneses

Aprovada:

Data: 04 /07 /2018

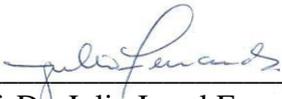
BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. PhD. André Marcelo Conceição Meneses
UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DA AMAZÔNIA- UFRA

Prof. Dr. Alexandre do Rosário Casseb
UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DA AMAZÔNIA- UFRA

Prof. Dr. Gustavo Góes Cavalcante
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ- UFPA

Dr. Sandro Patroca da Silva
INSTITUTO EVANDRO CHAGAS – IEC


Prof. Dr. Julio Israel Fernandes
UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO- UFRRJ

AGRADECIMENTOS

Não há como iniciar um agradecimento sem que o mesmo seja direcionado a **Deus**. Sem **Fé** nada somos e se cheguei até aqui foi porque tudo posso **N'ele** e sem **Ele NADA** seria possível. Obrigada **MEU DEUS!**

A **Nossa Senhora de Nazaré**, minha intercessora. Obrigada minha Mãe por todas as vezes que "...o medo, a angustia e a solidão me abatem, me entrego em teus braços, como criança carente em busca de alívio, carinho e proteção..." e sou atendida. **VIVA N. Sra DE NAZARÉ!**

A minha **MÃE NEREIDE**, que não está mais fisicamente aqui, mas que viveu boa parte deste trabalho comigo, e tenho certeza que onde ela estiver continua torcendo por mim e está muito feliz com minha conquista. **Amo-te pra sempre.**

A minha filha **MARINA**, meu primeiro e último pensamento do dia, meu **TUDO**.

Ao meu marido **CLÓVIS FILHO**, que do seu jeito peculiar, sempre me apoia. **Obrigada meu bem**, por me ajudar em mais essa conquista.

ANDRE MARCELO, você é o principal responsável por esse título, sempre me incentivando a fazer pós-graduações. Obrigada pela orientação nesse trabalho, pela amizade e carinho, Aqui não existiu um orientador e sim parceiro, sempre uma honra trabalhar com você.

SANDRO PATROCA DA SILVA, não tenho palavras pra lhe agradecer. Deus envia **anjos** pra nos ajudar e você com certeza foi um anjo enviado por Ele. **MUITO, MAS MUITO OBRIGADA POR TUDO.**

ALEXANDRE ROSÁRIO CASSEB, por permitir realizar meu experimento no laboratório de microbiologia, com toda a liberdade e pelo apoio em **TODAS** as vezes que lhe solicitei.

GUSTAVO GÓES CAVALCANTE, muito obrigada pela sua amizade e por sempre me ajudar, você é um ser humano maravilhoso.

A **UFRA** e ao **HOVET** por me permitirem realizar este doutorado.

Aos **residentes, estagiários, bolsistas e monitores** do laboratório de microbiologia e do **HOVET**, que me auxiliaram na coleta de material e na realização deste experimento.

JAIME, secretário da pós, obrigada por resolver **TODA** a burocracia do programa, sem você a secretaria do **PPGSPAA** não sobrevive.

Aos **CÃES E SEUS TUTORES** por me permitirem realizar as coletas das amostras para realização dessa pesquisa.

MUITO OBRIGADA!!

DEDICATÓRIA

À minha filha **MARINA**, minha energia diária, meu amor maior, meu coração que bate fora do meu peito. Obrigada por você existir. **Dedico.**

EPIGRAFE

Você não sabe o quanto eu caminhei
pra chegar até aqui.
Percorri milhas e milhas antes de dormir,
Eu nem cochilei...
Estrada - Cidade Negra.

LISTA DE FIGURAS -

Figura 1	Dermatite úmida aguda em lateral da face de cão. Observa-se o brilho do local devido exsudação, bem como eritema evidente na lesão.	21
Figura 2	Áreas de manifestação clínica mais comum na dermatite atópica canina (DAC).	36
Figura 3	Algoritmo para diagnóstico de dermatite atópica canina (DAC).	39
Figura 4	No teste intra-dérmico (TID) é necessária tricotomia de uma ampla área em região lateral de tórax para a aplicação dos alérgenos.	41
Figura 5	Imagem de placa de Petri mostrando crescimento bacteriano em meio Ágar – Sangue (A), com visualização de colônias circulares, opacas, de coloração creme (Seta). Figura B contém o meio Ágar- Mackonkey, com crescimento de colônias de Gram Negativos. Somente colônias características de <i>Staphylococcus</i> spp em Ágar- sangue foram selecionadas.	48
Figura 6 (AeB)	Imagem de placa de Petri contendo meio pra realização do teste de sensibilidade antimicrobiana. Os discos de antibióticos eram posicionados (A) e após 24 horas realizava-se a leitura dos halos (B) formados que eram avaliados em tabela padrão, como resistente e sensível.	48
Figura 7	Gel de Agarose com amostras positivas, tanto na PCR convencional quanto na qPCR, para utilização dos amplicons no sequenciamento genético. Poços de 1-9 com amostras positivas (Exceto poço 8 com amostra 22, que não formou banda), poço 10 com controle positivo (C+); poço 11 com controle negativo (C-), poços 12 e 13 sem amostras e poço 14 com o ladder de 100 pb.	57
Figura 8	Sequências obtidas a partir das amostras positivas e que	

foram alinhadas com uma sequência disponível no NCBI, demonstrando que as amostras sequenciadas correspondem ao gene *mecA*.

LISTA DE TABELAS –

Tabela 1	Resultado do teste de sensibilidade antimicrobiana aplicado nas amostras, segundo Kirby-Bauer (1966)	55
Tabela 2	Resultados das reações de PCR and qPCR, que foram realizadas nas amostras pra detecção do Gene mecA., existiram amostras positivas em ambas as reações e outras positivas em somente uma das reações. X significa positividade e a correlação com a sensibilidade a oxacilina, onde R significa resistente e S- sensível.	56

LISTA DE QUADROS-

Quadro 1	Alterações adicionais que predispõe ao aparecimento de piodermites.	22
Quadro 2	Critérios de Favrot (2010) para caracterização de Dermatite Atópica Canina.	36
Quadro 3	Escala de concordância do índice <i>Kappa</i> (ANDRADE & ZICKER, 1997)	51
Quadro 4	Critérios de Favrot, (2010) utilizados para direcionar o diagnóstico de dermatite atópica canina. A utilização desses critérios se baseia em respostas positivas ou negativas aos itens no alto do quadro.	52

LISTA DE ANEXOS

Anexo 1	Certificado CEUA	63
Anexo 2	Termo de consentimento livre e esclarecido - TCLE	64
Anexo 3	Ficha de identificação para coleta de material	65
Anexo 4	Expressão dos reagentes utilizados nas reações de PCR e qPCR	66

RESUMO

A piodermite pode ser definida como uma condição infecciosa produtora de pus com causa bacteriana que acomete a pele. *Staphylococcus* spp é a bactéria mais frequentemente envolvida nessas infecções em cães. A Dermatite atópica canina (DAC) é uma doença inflamatória e pruriginosa da pele cães com características clínicas e relacionada a uma resposta de hipersensibilidade tipo I, direcionada aos anticorpos de imunoglobulinas E (IgE) principalmente contra alérgenos ambientais DAC possui componente genético e leva a perda na barreira de proteção da pele, fazendo com que seus portadores apresentem quadros de piodermites recidivantes. Foram selecionados 25 cães de varias raças, idade e sem predileção sexual. Todos foram diagnosticados clinicamente como portadores de piodermite de repetição e DAC. Material purulento foi coletado para cultivo em meio Ágar sangue e Ágar Mackonkey e através de características microbiológicas fazer o isolamento de *Staphylococcus* spp e posterior realização de PCR e qPCR para detecção do gene *mecA*, e finalmente confirmando com o sequenciamento nucleotídico das amostras positivas. Nove (36%) amostras foram positivas em uma ou ambas as técnicas de PCR. Como primeira pesquisa acerca do tema realizada na região e com o resultado bastante representativo, concluímos que a detecção do gene nesses micro-organismos isolados de cães com doenças dermatológicas muito comuns, nos faz refletir sobre uma melhor abordagem terapêutica, visando uma melhor qualidade da saúde humana e animal.

ABSTRACT

Pyoderma can be defined as an infectious condition producing pus with a bacterial cause that affects the skin. *Staphylococcus* spp is the bacterium most frequently involved in these infections in dogs. Canine atopic dermatitis (CAD) is an inflammatory and pruriginous skin disease of dogs with clinical characteristics and related to a type I hypersensitivity response, targeted to immunoglobulin E (IgE) antibodies mainly against environmental allergens. CAD has a genetic component and leads to loss in the protective barrier of the skin, causing their carriers to present cases of recurrent pyoderma. We selected 25 dogs of various races, age and no sexual preference. All were clinically diagnosed as having recurrent pyoderma and CAD. Purulent material was collected for culture in Blood Agar and Mackonkey Agar and by means of microbiological characteristics to isolate *Staphylococcus* spp and subsequent PCR and qPCR for detection of the *mecA* gene, and finally confirming with the nucleotide sequencing of the positive samples. Nine (36%) samples were positive in one or both PCR techniques. As a first research on the topic performed in the region and with the result quite representative, we concluded that the detection of the gene in these microorganisms isolated from dogs with very common dermatological diseases, make us reflect on a better therapeutic approach, aiming at a better quality of health human and animal.

SUMARIO

OBJETIVOS	17
REVISÃO DE LITERATURA- PIODERMITES	18
1- Generalidades	18
2- Caracterização das espécies de <i>Staphylococcus spp</i>	18
3- Piodermites em cães	20
3.1 Etiologia das piodermites em cães	20
3.2 Classificação e aspectos clínicos das piodermites em cães	20
3.3 Diagnóstico das piodermites em cães	22
3.4 Piodermites multirresistentes	24
Referências	27
REVISÃO DE LITERATURA - DERMATITE ATÓPICA CANINA	32
1- Generalidades	32
2- Etiopatogenia	33
3 Fatores predisponentes	33
3.1 Raça	33
3.2 Gênero Sexual	34
3.3 Faixa Etária	34
4- Sinais Clínicos	35
5- Diagnóstico	36
Referências	42
MATERIAIS E MÉTODOS	46
1- Aspectos Éticos da Pesquisa	46
2- Local de Obtenção das Amostras	46
3- Seleção dos animais	46
3.1- Critérios de inclusão	46
4- Coleta das Amostras	47
5- Isolamento e Identificação da bactéria	47
6- Reação em Cadeia pela Polimerase- PCR	49
6.1- Extração do DNA	49
6.2- Reação em Cadeia pela Polimerase – PCR	49
7- Sequenciamento Nucleotídico	50
7.1- Purificação do DNA Amplificado	50
7.2- Sequenciamento das amostras	50
8- Análise Estatística	51
9- RESULTADO E DISCUSSÃO	52
10- CONCLUSÕES	59
Referências	60
ANEXOS	63

INTRODUÇÃO

A pele é uma estrutura de grande importância no organismo, pois além de ser prontamente visível, tem a finalidade de funcionar como barreira anatômica e fisiológica entre o animal e o meio ambiente.

As doenças dermatológicas tem uma ocorrência cada vez maior na clínica médica de animais de companhia e as piodermites superficiais em cães apresentam uma casuística alta e a perda de barreira de proteção cutânea ocasionada pela dermatite atópica canina parece ser uma causa importante nos casos recidivantes.

Staphylococcus pseudintermedius resistente a meticilina (MRSP) vem sendo descrito desde os anos 80, como sendo espécie frequente nas piodermites recorrentes, tornando o tratamento desta dermatopatia cada vez mais complicado. Alguns autores descrevem que nos Estados Unidos da América cepas resistentes dessa bactéria vêm apresentando crescimento em sua ocorrência. Os MRSP podem ser portadores do gene *mecA*, responsável pela transcrição da proteína Penicillin – Binding Protein 2^a (PBP2a) que reduz a susceptibilidade dessas bactérias aos antibióticos betalactâmicos.

A dermatite atópica canina (DAC) é uma enfermidade dermatológica de predisposição genética com características clínica inflamatória e pruriginosa com produção de imunoglobulinas E (IgE). Estudos têm mostrado que os cães portadores dessa alteração apresentam defeito de barreira cutânea com perda de água transepidérmica e redução de peptídeos antimicrobianos. Com efeito, diante destas alterações, cães portadores de DAC apresentam predisposição para desenvolvimento de piodermites superficiais de forma recidivante.

Staphylococcus spp é uma bactéria de alta ocorrência em piodermites superficiais, e visto que os cães são habitantes cada vez mais presentes nos lares brasileiros e a dermatite atópica uma enfermidade também cada vez mais frequentemente diagnosticada, vislumbra-se aqui um caso de extrema importância na saúde pública. Justifica-se então a realização da presente pesquisa para elucidar se há *Staphylococcus* spp com o gene *mecA* em cães com piodermites recidivantes na região norte do Brasil.

OBJETIVOS

GERAL:

- Detectar o gene *mecA* em *Staphylococcus* spp. isolados da pele de cães portadores de piodermite recidivante e dermatite atópica.

ESPECÍFICOS

- Utilizar os critérios de Favrot (2010) para formar um grupo homogêneo de portadores de dermatite atópica.
- Diagnosticar cães com piodermite de repetição.
- Isolar e identificar *Staphylococcus* spp. de piodermite de cães, bem como realizar técnicas de PCR e qPCR pra detecção do gene *mecA*.

REVISÃO DE LITERATURA

PIODERMITES

1-Generalidades

A pele forma uma barreira protetora sem a qual a vida seria impossível. Esta barreira tem quatro componentes, ambiental, físico, químico e microbiológico (MILLER, GRIFFIN e CAMPBELL, 2013) Seus componentes sensoriais percebem calor, frio, dor, prurido, toque e pressão. Desta forma, sua coesão dentre os sistemas orgânicos internos, reflete processos patológicos que são primários em outras partes do corpo ou compartilhados com outros tecidos (SCOTT, MILLER e GRIFFIN, 2001).

A pele tem sua microbiota normal formada por bactérias residentes, transitórias e fungos. Nos cães, os gêneros ou espécies bacterianas residentes encontradas são *Micrococcus* spp., *Staphylococcus pseudintermedius*, *Streptococcus* β -hemolítico, *Acinetobacter* spp., *Clostridium* spp. e recentemente foi encontrado *Propionibacterium acnes*. As bactérias transitórias incluem *Corynebacterium* spp., *Escherichia coli*, *Bacillus* spp., *Pseudomonas* spp. e *Proteus mirabilis* (SCOTT, MILLER e GRIFFIN, 2001).

Infecções piogênicas mistas acometem todos os mamíferos e todos seus sistemas orgânicos. Portanto, a piodermite também pode ser definida como uma condição infecciosa, produtora de pus, de causa bacteriana que acomete a pele em qualquer nível de profundidade (BIBERSTEIN & HIRSH, 2003; GUARDABASSI *et al.*, 2010).

2- Caracterização das espécies de *Staphylococcus* spp.

Staphylococcus são bactérias gram-positivas, anaeróbias facultativas e esféricas que normalmente compõem a microbiota da pele íntegra e das mucosas de mamíferos e aves (GRIFFETH *et al.*, 2008). Possui cerca de 41 espécies e 24 subespécies, e destas, 10 são de importância veterinária e podem causar doenças em animais: *S. aureus*, *S. intermedius*, *S.pseudintermedius*, *S. epidermidis*, *S. hyicus* spp. *hyiicus*, *S. schleiferi* spp. *coagulans*, *S. sciuri*, *S. lentus*, *S. caprae* e *S. gallinarum* (LEME, 2001; BIBERSTEIN & HIRSH, 2003; GRIFFETH *et al.*, 2008; EUZÉBY, 2009).

O gênero *Staphylococcus* pertence à família Micrococaceae, que agrupa os cocos Gram-positivos catalase-positivos que atacam carboidratos por oxidação e fermentação. Microscopicamente, os estafilococos são células esféricas, com 0,5 a 1,5 µm de diâmetro, ocorrendo isolados, em pares, tétrades, cadeias curtas ou como agrupamentos em forma de cachos de uvas. São imóveis, não-esporulados, anaeróbios facultativos, suas colônias geralmente são opacas, com coloração variável do branco ao creme e algumas vezes do amarelo ao laranja (LEME, 2001; BIBERSTEIN & HIRSH, 2003).

Resistem à dessecação por semanas, a aquecimento de até 60°C por 30 minutos, a concentrações de pH entre 4,0 e 9,5 e a concentrações salinas de 7,5% utilizadas nos meios seletivos para isolá-los. Alguns estafilococos, por possuírem enzimas que lhes conferem a capacidade de coagular plasma, são divididos em coagulase-positivos e coagulase-negativos, sendo essa característica de suma importância na identificação das espécies de estafilococos patogênicos em humanos e animais pelos laboratórios (BIBERSTEIN & HIRSH, 2003).

As espécies produtoras de coagulase (*S. aureus*, *S. hyicus*, *S. pseudointermedius* e *S. schleiferi subsp. coagulans*) são potencialmente patogênicas para uma grande variedade de animais, assim como para os seres humanos (WERCKENTHIN *et al.*, 2001; WEESE, DICK e WILLEY, 2006).

Para a diferenciação de espécies e subespécies do gênero *Staphylococcus*, algumas principais características são apontadas, como: diâmetro da colônia em mm (> 5mm), pigmento carotenóide da colônia, crescimento aeróbico, crescimento anaeróbico em tioglicolato, crescimento em ágar contendo 10 e 15% de cloreto de sódio (NaCl), crescimento a 15 e 45°C, teste de oxidase (detecção do citocromo C), produção de ácido láctico a partir de L(+)-isômeros e D(-) – isômeros, produção de acetoína, teste da aldolase, produção de ácidos a partir de diversos substratos, presença de enzima hialuronidase, redução de nitrato, teste da fosfatase alcalina, coagulase (sangue de coelho), hemólise, produção de DNase, resistência à novobiocina (concentração inibitória mínima $\geq 1,6 \mu\text{g/mL}$) e testes de catalase, dentre outros (BIBERSTEIN e HIRSH, 2003).

3-Piodermite em cães

A infecção piogênica da pele recebe o nome de piodermite, (MEDLEAU, LONG e BROWN, 1986; IHRKE, 1987; SCOTT e PARADIS, 1990; CARLOTTI, JASMIN e GUAGUERE, 1995). Segundo Miller, Griffin e Campbell (2013) a piodermite bacteriana superficial é uma das dermatopatias mais frequentes em cães e trata-se de uma infecção dos folículos pilosos e epiderme adjacente que é, na grande maioria das vezes, secundária a causas como dermatopatias infecto- parasitárias, alergias, disqueratoses e endocrinopatias.

A suscetibilidade da pele dos cães à piodermite está relacionada ao fato da epiderme do cão apresentar uma camada córnea mais delgada e compacta em comparação à camada córnea de outras espécies; o óstio folicular ser mais aberto, o pH cutâneo ser mais neutro ou levemente ácido e a pele inflamada associada à doenças alérgicas e disqueratóticas estão associadas com a diminuição de peptídeos antimicrobianos, o que favorece à colonização por estafilococos coagulase-positivos mais rapidamente do que a pele sadia (PIANTA *et al.*, 2006).

3.1- Etiologia das piodermite em cães

A principal espécie envolvida no processo é *S. pseudintermedius*, embora *S. aureus* e *S. schleiferi* possam também ser causadores de infecções recorrentes (BIBERSTEIN e HIRSH, 2003; GUARDABASSI *et al.*, 2010).

Devriese *et al.* (2005) e Pianta *et al.* (2006) caracterizaram esta bactéria baseada na reação negativa para prova de coagulase.

Já Frank *et al.*, (2003), cita que a espécie *S. schleiferi*, embora isolada com menor ocorrência em cães, parece ser mais frequente e comum nas piodermite recorrentes.

3.2- Classificação e aspectos clínicos das piodermite em cães

Levando-se em consideração seu perfil clínico pode ser classificada em superficial e profunda, e isto dependem de qual camada da pele à infecção esta acometendo (PREVOST; COUPPIE; MONTEIL, 2003).

Alguns autores citam que na piодermite superficial não há invasão da epiderme e sim uma colonização sobre a superfície da pele. Estas são caracterizadas por erosão superficial da camada córnea associada com eritema, exsudação e prurido (MASON, 1991). Destacam-se nessa categoria a dermatite úmida aguda e o intertrigo (MORIELLO, 1994, SCOTT, MILLER e GRIFFIN, 2001; GROSS *et al.*, 2005).

Figura 1: Dermatite úmida aguda em lateral da face de cão. Observa-se o brilho do local devido exsudação, bem como eritema evidente na lesão.



Fonte: Arquivo pessoal

Nas piодermites superficiais há colonização bacteriana da epiderme (impetigo) e do epitélio folicular (foliculite). De acordo com Larsson Jr. (2008) a piодermite superficial tem um importante papel na dermatologia canina, devido ser mais frequente que as profundas e conceitualmente tem etiologia múltipla e, em alguns cães, assumem caráter crônico e recidivante.

Seus sinais clínicos mais comuns são pápulas, pústulas, colarinhos epidérmicos, crostas melicéricas, eritema, alopecia circular e hiperpigmentação, entretanto, Larsson Jr (2008) relata que a apresentação clinica pode ser bastante versátil devido a variáveis como padrão racial, resposta individual do paciente e fatores intrínsecos do agente etiológico.

As foliculites bacterianas podem progredir para camadas mais profundas ou transformar-se em furunculose e celulite (GROSS *et al.*, 2005).

Estudos realizados por Scott, Miller e Griffin (2001) relatam que as piodermites podem ainda ser classificadas em primária e secundária em função da ausência ou presença de uma causa adicional. Pode-se também encontrar esta classificação como sendo primária e secundária ou ainda idiopática (CURTIS, LAMPORT; LLOYD, 2006).

As primárias são raras e ocorrem em função da inatividade de mecanismos de defesa presentes na pele, enquanto que as secundárias ocorrem mais comumente e são dependentes de alterações adicionais (Quadro 1) que alteram a resistência da pele a infecções (IHRKE, 1987; SCOTT, MILLER e GRIFFIN, 1996).

Quadro 1: Alterações adicionais que predispõe ao aparecimento de piodermites.

Hipersensibilidade	Dermatite alérgica à picada de pulga e carrapatos, alergia alimentar e atopia
Parasitárias	Demodicose e escabiose
Fúngicas	Dermatofitoses
Endócrinas	Hipotireoidismo, hiperadrenocorticismo, dermatoses relacionadas aos hormonais sexuais.
Outras	Defeitos de queratinização; manejo higiênico inadequado e uso prolongado de drogas imunossupressoras.

3.3- Diagnóstico das piodermites em cães

O diagnóstico de piodermite é baseado na anamnese, exame físico e exames complementares. O proprietário descreve com precisão a evolução das lesões pustulosas, que são facilmente observadas pelo clínico (LARSSON JR, 2008).

Dentre os exames complementares, o citológico pode ser bastante conclusivo para diagnóstico de piodermite. Uma amostra citológica da pele normal consiste em

células superficiais com queratina com pouca presença de células bacterianas. Vale ressaltar que componentes inflamatórios (neutrófilos e macrófagos), presença de cistos (células glandulares sebáceas), e neoplasias (melanócitos, mastócitos), podem ser identificadas pela técnica citológica (BANKS, 1992).

A citologia permite fazer distinção entre a infecção bacteriana da pele e a colonização bacteriana. A visualização de neutrófilos degenerados e bactérias fagocitadas são compatíveis com o quadro de infecção. A presença bacteriana na pele sadia se mostra presente em pequeno número (SCOTT, MILLER e GRIFFIN, 1996). Segundo Carlotti e Pin (2004) pode-se visualizar na citologia a presença de granulócitos neutrófilos degenerados, imagens de fagocitose, cocos ou bacilos, macrófagos, linfócitos, plasmócitos, granulócitos e eosinófilos. Cora-se o esfregaço da secreção pelo método de Gram ou ainda usando coloração rápida, como o panótico rápido, Giemsa ou Wright (CONCEIÇÃO; FABRIS, 1999).

A cultura bacteriana e os testes de sensibilidade a antibióticos (TSA) estão indicados quando na citologia são observados bastonetes, quando a antibioterapia escolhida de forma empírica é ineficaz e em casos de piodermite recorrente (NOLI, 2003).

O uso da cultura com antibiogramas gera controvérsias entre pesquisadores e clínicos. Segundo Scott, Miller e Griffin (2001), a citologia deve ser o primeiro exame a ser solicitado e, caso haja a visualização de cocos intracelulares, deve-se instituir antibioticoterapia adequada para estafilococos coagulase positivos. Entretanto, Cole *et al.*, (1998) diz que devido a grande proporção de cepas bacterianas resistentes aos antimicrobianos usados na clínica veterinária, a realização de cultura com antibiograma é extremamente necessária.

Segundo Hill e Moriello, (1994) o fato de não se encontrar cocos Gram positivos no exame citológico não exclui o diagnóstico de piodermite bacteriana, e a cultura bacteriana deve vir acompanhada de antibiograma quando for visualizado no exame citológico um grande número de bastonetes Gram negativos que torna o diagnóstico etiológico incerto. Hillier, *et al.* (2006) também concordam que ausência de bactérias em exames citológicos não exclui diagnóstico de piodermite bacteriana.

3.4- Piodermites multirresistentes

A multirresistência é definida quando o microrganismo apresenta resistência *in vitro* para pelo menos três diferentes classes de antimicrobianos, além de antibióticos β -lactâmicos (COOMBS, NIMMO e BELL.,2004).

Meticilino-resistente é a expressão empregada para denominar as cepas de estafilococos que não respondem a terapia com meticilina e, por extensão, as isoxazolilpenicilinas (oxacilina) e as cefalosporinas, em função da resistência cruzada aos antibióticos β -lactâmicos (PENTEADO FILHO, LOPES e LEVI, 2007).

A proteína que se liga à penicilina (*penicillin-binding protein* - PBP2a ou PBP2') codificada pelo gene *mecA* é a responsável pela resistência à meticilina (NIEMEYER *et al.*, 1996; CHAMBERS, 1997; GORTEL *et al.*, 1999; WAYNE, 2003).

Pesquisadores relatam que uma das origens da resistência é a importação dos genes causadores do fenômeno, consistindo na resistência transferível ou horizontal (CUNHA, 1998; TAVARES, 2000; ALTERTHUM, 2005). Essa transferência, horizontal, do gene *mecA* em *Staphylococcus* spp. tem contribuído para a circulação mundial de clones meticilina-resistentes e multidroga-resistentes (AARESTRUP *et al.*, 2001) e tem sido apontada como mecanismo comum de resistência a fármacos (TRAMPER-STRANDERS *et al.*, 2007).

Estes *Staphylococcus* spp. resistentes à meticilina isolados de animais domésticos têm sido documentados desde a década de 70 (DEVRIESE, VANDAME e FAMEREE, 1972), sendo que MORRIS *et al.*, (2006) conseguiram isolar, em cães, cepas de *S. aureus*, *S. intermedius* e *S. schleiferi* resistentes à meticilina.

A ocorrência no Brasil foi documentada por Maluta *et al.*, (2008) que conseguiram isolar duas cepas de Methicilin Resistant coagulase Negative *Staphylococcus* (MRCoNS) de cães (4%) e 18 cepas de seres humanos (36%) em um hospital veterinário de ensino, muito embora não tenham isolado cepas de *S. aureus* e *S. intermedius* resistentes à meticilina (MRSA e MRSI, respectivamente).

Outro estudo detectou resistência em 48,6% dos isolados de *Staphylococcus* spp. de diferentes sítios infecciosos de animais de companhia (PEREIRA *et al.*, 2009). Tunon, Silva e Faiersteim (2008) isolaram cepas de *Staphylococcus* spp. de ouvido de

cães com otites e encontraram 83% de cepas resistentes a pelo menos um dos antibióticos utilizados.

Os estafilococos que apresentem heterorresistência possuem crescimento mais lento que a população sensível à oxacilina. Desta forma, os testes de sensibilidade convencionais, como o método de difusão em disco, nem sempre são sensíveis o suficiente para detectar essas populações heterorresistentes. Atualmente, o teste de triagem para essas cepas é feito por meio da verificação da sensibilidade à oxacilina e à determinação da presença do gene *mecA* por técnicas moleculares utilizando a reação em cadeia mediada pela polimerase (PCR) (PENTEADO FILHO, LOPES e LEVI, 2007).

O potencial risco tanto à saúde humana quanto à do animal, diante da possibilidade do surgimento de bactérias resistentes nos animais de companhia, tem sido, até agora, considerado insignificante. No entanto, estão surgindo resistência relevante do ponto de vista clínico em bactérias isoladas, sobretudo de cães (GUARDABASSI, SCHWARZ e LLOYD, 2004). As principais razões para preocupação são, em ordem de importância, *S.aureus* resistente a meticilina (MRSA) e *S. intermedius* resistente a meticilina (MRSI) (GUARDABASSI *et al.*, 2010).

O uso de antimicrobianos pelos clínicos de pequenos animais tem na piodermite uma razão frequente para prescrição, e tanto faz se é superficial ou profunda, pois *Staphylococcus pseudintermedius* está presente, e em muitos casos recorrentes, tem-se a presença de *S. aureus* e *S. schleiferi* (PIANTA *et al.*, 2006; GUARDABASSI *et al.*, 2010).

A amplificação de DNA a partir de “primers” ou iniciadores específicos é muito útil para se estabelecer o perfil de resistência das linhagens de amostras clínicas. Os testes moleculares, dentre eles a PCR, podem ser usados como referência, inclusive para se avaliar novas técnicas que determinam a referida resistência (TENOVER *et al.*, 1995; NEVES *et al.*, 2007).

O aparecimento de *S. aureus* resistentes à meticilina (MRSA) está cada vez mais documentado em cães e gatos (O’MAHONY *et al.*, 2005; MORRIS, ROOK e SHOFER, 2006; BOOST, O’DONOGHUE e SIU, 2007; GRIFFETH *et al.*, 2008), face à elevada morbidade e mortalidade em todo o mundo, esta resistência é preocupante.

Os animais, assim como humanos, podem ser portadores assintomáticos de MRSA na superfície da pele e mucosas. Além de apresentarem resistência a todas as penicilinas e cefalosporinas, essas bactérias são, com frequência, resistentes a fluoroquinolonas, aminoglicosídeos, tetraciclinas, macrolídeos e lincosaminas (GUARDABASSI *et al.*, 2010).

REFERENCIAS

AARESTRUP, F. M. *et al.*, Effect of abolishment of the use of antimicrobial agents for growth promotion on occurrence of antimicrobial resistance in fecal enterococci from food animals in Denmark. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy - American Society for Microbiology**, Maryland, v.45, n.7, p. 2054-2059, 2001.

ALTERTHUM, F. Mecanismo de ação dos antibacterianos e mecanismos de resistência. In: TRABULSI, L. R.; ALBERTHUM, F. **Microbiologia**. 4.ed. São Paulo: Atheneu. cap.11. p.79-84p.2005.

BANKS, W. J. Sistema tegumentar In: BANKS, W. J. **Histologia veterinária aplicada**. 2. ed. São Paulo: Manole, p. 391-424, 1992.

BIBERSTEIN, E. L.; HIRSH, D. C. In: HIRSH, D. C.; ZEE, Y. C. **Microbiologia Veterinária**. 2.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. cap.21. 108- 112p. 2003.

BOOST, M. V.; O'DONOGHUE, M. M.; SIU, K. H. Characterisation of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates from dogs and their owners. **Clinical Microbiology and Infection**, Marseille, v.13. , n.7, p.731- 733, 2007.

CARLOTTI, D. N.; PIN, D. **Diagnóstico dermatológico**. São Paulo: Ed. Roca, 2004.

CARLOTTI, D. N.; JASMIN, P.; GUAGUÉRE, E. Utilisation de la marbofloxacin dans le traitement des pyodermites du chien. **Pratique Médicale et Chirurgicale de L'animal de Compagnie**, Paris, v. 30, p. 231-293, 1995.

CHAMBERS, H. F. Methicillin resistance in staphylococci: molecular and biochemical basis and clinical implications. **Clinical Microbiology**, Washington, v.10, n.4, p.781-791, 1997.

COLE, L. K.; KWOCKA, K. W.; KOWALKI, J. J. HILLIER, A. Microbial flora and antimicrobial susceptibility patterns of isolated pathogens from the horizontal ear canal and middle ear in dogs with otitis media. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, Chicago, v. 212, n. 4, p. 534-538, 1998.

COOMBS, G. W; NIMMO, G. R; BELL J. M. Genetic diversity among community methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains causing outpatient infections in Australia. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington DC, v.42, p.4735-43, 2004.

CONCEICAO, L. G.; FABRIS, V. E. Piodermite Canina - Parte II. **Cães & Gatos**, São Paulo, v. n.86, p. 16-20, 1999.

CUNHA, B. A. Antibiotic resistance. **Drugs of Today**. Barcelona, v.34, n.8, p.691-698, 1998.

CURTIS, C.F., LAMPORT, A.I., LLOYD, D.M. Masked controlled study to investigate the efficacy of a *Staphylococcus intermedius* autogenous bacterin for the control of canine idiopathic recurrent superficial pyoderma. **Veterinary Dermatology**, v.17, n.3, p.163-168, 2006.

DEVRIESE, L. A.; VANDAMME, L. R.; FAMEREE, L. Methicillin (cloxacillin)-resistant *Staphylococcus aureus* strains isolated from bovine mastitis cases. **Zentralblatt Fur Veterinarmedizin Riehe B**, Berlim, v.19, n.7, p.598-605, 1972.

DEVRIESE, L. A. *et al.*, *Staphylococcus pseudintermedius* sp. nov., a coagulasepositive species from animals. **International Journal of Systematic and Environmental Microbiology**, Reading, v. 55, n. 4, p. 1569-1573, 2005.

EUZÉBY, J. P. List of bacterial names with standing in nomenclature. Disponível em: <http://www.bacterio.cict.fr/s/staphylococcus.html> . Acesso em: 30 set. 2015.

FRANK, L. A. *et al.* Isolation of *Staphylococcus schleiferi* from dogs with pyoderma. **Journal of The American Veterinary Medical Association**, Schaumburg, v. 222, n. 4, p. 451-454, 2003.

GORTEL, K. *et al.*, Methicillin resistance among staphylococci isolated from dogs. **American Journal of Veterinary Research**, Chicago, v.60, n.12, p.1526-1530, 1999.

GRIFFETH, G. C. *et al.*, Screening for skin carriage of methicillin-resistant coagulasepositive staphylococci and *Staphylococcus schleiferi* in dogs healthy and inflamed skin. **Veterinary Dermatology**, Oxford, v.19, n.3, p.142-149, 2008.

GUARDABASSI, L.; SCHWARZ, S.; LLOYD, D. H. Pet animals as reservoirs of antimicrobial-resistant bacteria. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, Oxford, v.54, n.2, p.321-322, 2004.

GUARDABASSI, L. *et al.*, Orientações para o uso de antimicrobianos em cães e gatos. In: GUARDABASSI, L.; JENSEN, L. B.; KRUSE, H. **Guia de antimicrobianos em veterinária**. 1.ed. Porto Alegre: Artmed. cap.11. 224-246p. 2010.

GROSS, T. L. *et al.*, **Skin diseases of the dog and cat, Clinical and histopathologic diagnosis**, Missouri, v. 2, p. 4-9, 2005.

HILLIER, A. *et al.*, Pyoderma caused by *Pseudomonas aeruginosa* infection in dogs: 20 cases. **Veterinary Dermatology**, Oxford, v. 17, n. 6, p. 432-439, 2006.

HILL, P.B., MORIELLO, K.A. Canine Pyoderma. **Journal of American veterinary medical association**. V.204, 3, p. 334-340, 1994.

IHRKE, P. J. An overview of bacterial skin disease in the dog. **British veterinary journal**, London, v.143, p.112-118, 1987.

LARSSON JR, C.E., Estudo comparativo da eficácia da imunoterapia com bacterina e de dois esquemas de pulsoterapia antibiótica no manejo de piodermite superficiais idiopáticas recidivantes caninas. **Dissertação de mestrado**. Faculdade de medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo. 88f. 2008.

LEME, I. L. Estafilococcias. In: FERREIRA, A. W.; ÁVILA, S. L. **Diagnóstico Laboratorial das Principais Doenças Infecciosas e Auto-Imunes**. 2.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. cap 12. 147-159p. 2001.

MALUTA, R. P. *et al.*, isolamento de estafilococos resistentes a meticilina e perfil de suscetibilidade a antimicrobianos de cepas isoladas em um hospital veterinário de ensino no Brasil. In: Congresso Brasileiro de Iniciação Científica, 2008, Gramado. **Anais eletrônicos...**[online]. Disponível em: www.sovergs.com.br/conbravet2008/anais/cd/resumos/R0200-3.pdf. Acesso em: 17 mai. 2009.

MANSON, I.S. Canine pyoderma. **Journal of Small Animal Practice**, Oxford, v. 32, p. 381-386, 1991.

MEDLEAU, L.; LONG, R. E.; BROWN, J. *et al.* Frequency and antimicrobial susceptibility of *Staphylococcus* species isolated from canine pyodermas. **American Journal of Veterinary Research**, Chicago, v. 47, p. 229-231, 1986.

MILLER, W., GRIFFIN, C., CAMPBELL, K. **Small Animal Dermatology**. 7 ed, Elsevier, 2013.

MORIELLO, K. A. Diseases of the skin. In: SHERDING, R. G. **The cat: diseases and clinical management**. 2. ed. New York: Churchill Livingstone. v. 2, p. 1915- 1916. 1994.

MORRIS, D. O.; ROOK, K. A.; SHOFER F. S. Screening of *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus intermedius*, and *Staphylococcal schleiferi* isolates obtained from small companion animals for antimicrobial resistance: a retrospective review of 749 isolates (2003–2004). **Veterinary Dermatology**, Oxford, v.17, n.5, p.332–337, 2006.

MULLER, G. H.; KIRK, R. W.; SCOTT, D. W. Bacterial skin diseases. In: In: GRIFFIN, C.E MILLER & KIRK'S. **Small animal dermatology**. 4 ed. Phyladelphia: W.B.Saunders. p. 244-287. 1989.

NEVES, M.C. *et al.* Detecção de gene de Resistencia antimicrobiana em cormossomos e plasmídeos de *Staphylococcus* spp. **Arquivo do Instituto Biológico**. São Paulo, v.74, n.3, p. 207-213. 2007.

NIEMEYER D. M. *et al.*, Role of *mecA* transcriptional regulation in the phenotypic expression of methicillin resistance in *Staphylococcus aureus*. **Journal of Bacteriology**, Washington, v.178, n.18, p.5464-5471, 1996.

NOLI, C. Staphylococcal pyoderma. In A. Foster & C. Foil (Eds.) BSAVA manual of small animal dermatology, **British small animal veterinary association**. Gloucester, UK (2 nd ed), p.159-168. 2003.

O'MAHONY, R. *et al.* Methicillin – Resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) isolated from animals and veterinary personnel in Ireland. **Veterinary Microbiology**. Amsterdã. V.109, n.3-4, p.285-296. 2005.

PENTEADO FILHO, S. R.; LOPES, H. V.; LEVI, G. C.. Antibióticos clássicos: principais características e uso terapêutico. In: NETO, V. A.; NICODEMO, A. C.; LOPES, H. V.. **Antibióticos na Prática Médica**. 6.ed. São Paulo: Sarvier. cap 4. 94-96p. 2007.

PEREIRA, I. A. *et al.*, Suscetibilidade à Azitromicina de Isolados Bacterianos de Processos Infeciosos em Cães e Gatos. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, Rio de Janeiro, v.29, n.2, p.153-156, 2009.

PIANTA C. *et al.*, Pioderma estafilocócico canino: identificação das espécies e sensibilidade aos antimicrobianos. **Revista de Ciências Agroveterinárias**, Lages, v. 5, n. 1, p. 60-63, 2006.

PREVOST,G., COUPPIE, P., MONTEIL,H. Staphylococcal epidermolysis, **Current opinion in infections diseases**, v.16, n.2, p.71-76, 2003.

SCOTT, D. W.; PARADIS, M. A survey of canine and feline skin disorders seen in a university practice: small animal clinic, University of Montréal, Saint-Hyacinthe, Québec. **Canadian Veterinary Journal**, Ottawa, v. 31, n.12, p. 830-835, 1990.

SCOTT, D. W.; MILLER, W. H.; GRIFFIN, C. E. In: SCOTT, D. W.; MILLER, W. H.; GRIFFIN, C. E. **Dermatologia de pequenos animais**. 5. Ed. Rio de Janeiro: Interlivros. p. 301-359. 1996.

_____ **Muller e Kirk's small animal dermatology**. 6. ed. Philadelphia: W. B. Saunders,. 1527 p., 2001.

TAVARES, W. Bactérias gram-positivas problemas: resistência do estafilococo, do enterococo e do pneumococo aos antimicrobianos. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Uberaba, v.33, n.3, p.281- 301, 2000.

TENOVER, F.C. *et al.* Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by pulsed-field gel electrophoresis: criteria for bacterial strain typing. **Journal of clinical microbiology**. V.33, issue 9. P. 2233-2239. 1995.

TRAMPER-STRANDERS, G. A. *et al.*, Macrolide-Resistant *Staphylococcus aureus* Colonization in Cystic Fibrosis Patients: Is There Transmission to Household Contacts? **Journal of Antimicrobial and Chemotherapy - American Society for Microbiology**, Maryland, v.60, n.3, p.665-668, 2007.

TUNON, G. I. L.; SILVA, E. P.; FAIERSTEIN, C. C.. Isolamento de Estafilococos Multirresistentes de Otites em Cães e sua Importância para a Saúde Pública. **Boletim Epidemiológico Paulista**, São Paulo, v.58, n.5, 2008.

WAYNE, P. A. Performance standards for antimicrobial disk susceptibility tests; Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically. **National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS)**. Approved Standard, M2-A8. 2003.

WEESE, J. S.; DICK, H.; WILLEY, B. M. Suspected transmission of methicillinresistant *Staphylococcus aureus* between domestic pets and humans in veterinary clinics and in the household. **Veterinary Microbiology**, Amsterdam, v.115, n.1-3, p.148-155, 2006.

WERCKENTHIN, C. *et al.*,. Antimicrobial resistance in staphylococci from animals with particular reference to bovine *Staphylococcus aureus*, porcine *Staphylococcus hyicus*, and canine *Staphylococcus intermedius*. **Veterinary Research**, Les Ulis, v.32, n.3-4, p.341-362, 2001.

REVISÃO DE LITERATURA

DERMATITE ATÓPICA CANINA – DAC

1-Generalidades

Trata-se de uma doença cutânea de caráter inflamatório crônico geralmente presente com erupções, frequentemente complicadas por infecções recorrentes (BOGUNIEWICZ, 2006) provocadas por bactérias ou leveduras (DETHIOUX, 2006). Dethioux, (2006) define a DAC como uma afecção cutânea, multifatorial, de natureza alérgica e inflamatória, que afeta indivíduos com predisposição genética e se manifesta através de sinais clínicos característicos, e de forma geral associada à produção de anticorpos IgE específicos principalmente para alérgenos ambientais.

A DAC é uma das doenças de pele mais comuns em cães com prevalência de 3-15% nos cães e representa entre 3-58% dos cães afetados com dermatopatias (SARIDOMICHELAKIS e OLIVRY, 2016).

Pacientes atópicos possuem a tendência hereditária de desenvolver reação a imunoglobulinas da classe E (IgE) mediada por uma infinidade de alérgenos ambientais (OLIVRY, DEBOER e GRIFFIN, 2001; SOUSA & MARSELLA, 2001). É uma alteração que afeta a qualidade de vida dos indivíduos portadores (FAVROT, *et al.*, 2010), bem como de seus proprietários (RUIVO, 2015).

A DAC apresenta alta ocorrência (HILLIER, 2002), afetando aproximadamente 10% da espécie canina e, embora haja um componente genético, os fatores ambientais desempenham um papel muito importante no desencadeamento e desenvolvimento da doença (HILLIER e GRIFFIN, 2001), que é muito semelhante à doença no homem, não só pela presença de hiper-reatividade imunológica, mas também quanto ao tipo e à distribuição topográfica lesional, alterações de barreira cutânea e resposta imunológica antimicrobiana, o que facilita a ocorrência de complicações infecciosas, ocasionadas principalmente por *Staphylococcus* spp. (LOURENÇO-MARTINS *et al.*, 2010).

Alguns relatos já foram feitos sobre a ocorrência de dermatite atópica no Brasil, como em Minas Gerais (Alves, 2016) e em Salvador (Santos e Santos, 2016), mas ainda não existem relatos acerca da DAC no norte do país.

2-Etiopatogenia

A DAC tem uma patogenia complexa e ainda não totalmente compreendida, mas o que está bem esclarecido é que a via percutânea é a principal via de penetração dos alérgenos no organismo animal (OLIVRI e HILL, 2001)

Existe uma predisposição genética levando ao desenvolvimento de reação de hipersensibilidade tipo I, envolvendo a produção de imunoglobulinas da classe E (IgE), mais comumente dirigida contra alérgenos ambientais, por isso os sintomas estão diretamente relacionados com a disfunção imune hereditária e com defeitos na barreira cutânea que entre outras ações, facilitam a penetração dos alérgenos na pele (MARSELLA, OLIVRY, 2001; MARSELLA e SAMUELSON, 2009; JASMIN, 2011; LAUBER *et al.*, 2012).

Os alérgenos ambientais são elementos de alto peso molecular e estrutura terciária complexa capazes de ligarem-se a duas moléculas de IgE e causarem uma resposta ao penetrarem no epitélio, quer por ingestão, inalação, mas principalmente pela via percutânea (MARSELLA, NICKLIN e LOPEZ, 2006)

Os principais alérgenos implicados na DAC são proteínas provenientes de fungos anemófilos, pólenes, micro-organismos (MASON *et al.*, 2003), saliva de artrópodes e ácaros domiciliares (OLIVRY *et al.*, 2007; MILLER, GRIFFIN e CAMPBELL, 2013), sendo estes últimos os mais frequentes naqueles animais que permanecem a maior parte do tempo domiciliados, com acesso restrito aos ambientes externos (ARLIAN e PLATTS-MILLS, 2001; PLATTS-MILLS, 2009; MILLER, GRIFFIN e CAMPBELL, 2013). Entre os ácaros de poeira doméstica, destaca-se o *Dermatophagoides farinae* (MILLER, GRIFFIN e CAMPBELL, 2013), que segundo Jasmin (2011), é o mais presente, além de *Dermatophagoides pteronyssinus*, em menor ocorrência.

3-Fatores Predidponentes

3.1- Raça

Existe uma importante predisposição racial no desenvolvimento da DAC (SOUSA; MARSELLA, 2001). As raças mais incriminadas são SharPei, West Highland White Terrier, Scotch Terrier, Lhasa Apso, Shih Tzu, Fox Terrier de Pêlo Duro, Dálmata, Pug, Setter Irlandês, Boston Terrier, Golden Retriever, Boxer, Setter Inglês, Labrador

Retriever, Schnauzer Miniatura, Pastor Belga (SCOTT; MILLER; GRIFFIN, 1996) e Buldog Inglês (WHITE, 1998; GRIFFIN; DEBOER, 2001;). Há também outras raças citadas com menor frequência como Pastor Alemão, Cocker Spaniel, Dachshund, Doberman e Poodle Gigante (GRIFFIN; DEBOER, 2001). White, (1998) cita que também afeta mestiços. Bisikova, *et al.*, (2015) referem que as mais comuns são: West Highland White Terrier, Retriever do Labrador, Golden Retriever, Boxer, Buldogue Francês, Pastor Alemão e Cocker Spaniel Inglês. Prélaud (2007) faz referência a animais que nunca demonstraram DAC, como o Doberman, e o Pinscher miniatura, nos Estados Unidos e Europa Ocidental. Favrot (2009) e Souza; Marsella (2001) citam que a predisposição racial pode variar, dependendo da localização geográfica.

3.2- Gênero Sexual

Uma maior incidência de DAC em fêmeas tem sido descrita por alguns autores, entretanto isso não é uma unanimidade e variações ocorrem de acordo com o perfil de criação e preferencias regionais (SCOTT; MILLER; GRIFFIN, 1996; THOMPSON, 1997; WHITE, 1998; GRIFFIN; DEBOER, 2001), porém, os dados mais recentes sugerem a inexistência de predisposição sexual (WILHEM, KOVALIC e FAVROT, 2010).

3.3- Faixa Etária

A idade de aparecimento dos primeiros sintomas varia de seis meses a sete anos, sendo que, cerca de 70% dos cães manifestam o problema entre um e três anos de idade (SCOTT; MILLER; GRIFFIN, 1996; WHITE, 1998; GRIFFIN; DEBOER, 2001; MILLER, GRIFFIN E CAMPBELL, 2013). Muito embora, cães das raças SharPeis, Akitas e Golden Retrievers possam ocasionalmente apresentar sinais de dermatite atópica antes dos 6 meses de idade (PRÉLAUD, 2007; WILHEM, KOVALIC e FAVROT, 2010).

Uma média de 60% dos indivíduos afetados manifestam a doença no primeiro ano de vida e cerca de 85% a desenvolverão nos primeiros 5 anos (EMERSON, WILLIAMS e ALLEN, 2001).

4-Sinais Clínicos

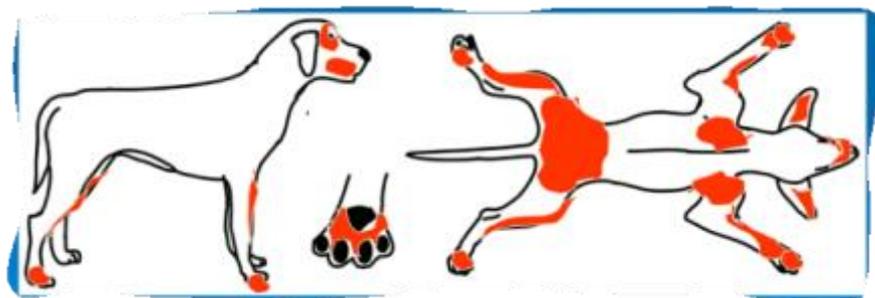
O prurido é o sinal mais comum na DAC (GRIFFIN & DEBOER, 2001; LOURENÇO- MARTINS *et al.*, 2010; MARSELLA *et al.*, 2012; MILLER, GRIFFIN e CAMPBELL, 2013) e a sua ausência praticamente exclui esta doença (LOURENÇO- MARTINS *et al.*, 2010); geralmente é primário, ou alesional, tem caráter crônico e, quando o animal está em crise, pode ser de intenso à grave. Responde de forma significativa a corticóides e ao oclacitinib, é contínuo e geralmente, perene, o que diminui muito a qualidade de vida dos cães, e afeta o convívio familiar com os proprietários, embora o prurido seja sintoma de muitas dermatopatias inflamatórias e psicofisiológicas, na dermatite atópica ele é uma característica fundamental (RUIVO, 2015).

Segundo Nuttal e McEwan (2006) o prurido é um sinal clínico difícil para avaliar objetivamente. Um estudo com monitor de atividade para detectar ações de movimento em cão com DAC comparado com cães saudáveis concluiu que essa avaliação poderia ser uma ferramenta útil para monitorar o prurido de forma objetiva nestes animais.

Para Arias *et al.*, (2013) existem escalas comportamentais e lesionais, para avaliar o prurido que são utilizadas há anos, sendo a escala lesional mais conhecida o CADESI (Canine Atopic Dermatitis Extent and Severity Index) e a escala comportamental, desenvolvida por HILL e RYBNICEK (2007), que é a mais utilizada atualmente.

Em relação a topografia lesional (FIGURA 2) as áreas mais afetadas são as orelhas, face (regiões perioculares, peri labiais, mentonianas e o plano nasolabial) axilas, abdômen, região inguinal, porção distal dos membros (superfícies dorso digitais e interdigitais dorsal e ventral), áreas flexurais (flexuras carpianas, tíbio-társicas, as flexuras anticubitais e as flexuras poplíteas) e região perineal (SCOTT; MILLER; GRIFFIN, 2001; HILLIER, 2002; ; FARIAS, 2007; FAVROT, 2009). Otites de repetição estão entre as queixas mais mencionadas pelos tutores destes animais (FAVROT, 2009).

FIGURA 2: Áreas com manifestações clínicas mais comuns de Dermatite atópica canina (DAC).



(Fonte: Hensel *et al.*, 2015- Adaptado).

5-Diagnóstico

Desde 1941 quando Wittich relatou a ocorrência de uma dermatite pruriginosa em cão tem se estabelecido diversas abordagens diagnósticas para a DAC (GRIFFIN, DEBOER, 2001)

Devido a enfermidade não apresentar sinal clínico patognomônico, seu diagnóstico primário é embasado somente no exame clínico (FAVROT *et al.*, 2010). Willemse (1986) e Prélaud *et al.* (1998) estabeleceram critérios diagnósticos usados principalmente em estudos clínicos. Em estudos mais recentes, pesquisadores avaliaram a especificidade e sensibilidade de ambos os critérios de Willemse (1986) e Prélaud *et al.* (1998) e introduziram um novo conjunto destes (Critérios de Favrot - 2010) para DAC, cujo principal objetivo é o de auxiliar o clínico no diagnóstico presuntivo.

Esses critérios criados por Favrot *et al.*, (2010) apresentam maior sensibilidade e especificidade que os critérios anteriormente utilizados. O Quadro 2 sumariza os critérios adotados para o caracterização de DAC.

Quadro 2: Critérios de Favrot (2010) para caracterização de Dermatite Atópica Canina

1-	Início dos sinais clínicos antes dos 3 anos de idade
2-	Cães habitam normalmente ambientes internos – Indoor
3-	Prurido responsivo ao corticoide
4-	Prurido como sinal inicial (prurido alesional)
5-	Membros anteriores afetados
6-	Pavilhões auriculares afetados

7-	Margens das orelhas não afetadas
8-	Área dorso-lombar não afetada
	A combinação de 5 critérios satisfatórios tem uma sensibilidade de 85% e especificidade de 79% para diferenciar cães com DA de cães com prurido crônico recorrente sem DA.

Fonte: Olivry *et al*, 2010. Adaptado

O diagnóstico definitivo da DAC normalmente não é concluído na primeira consulta. Exames complementares como raspados de pele e exames micológicos são métodos que devem ser sempre solicitados para pacientes portadores de dermatopatias, podendo se realizar uma triagem terapêutica com uso de alguns medicamentos como anti-histamínicos e / ou corticoides para confirmar ou excluir diagnósticos diferenciais (HILLIER, 2002).

Hillier (2002) ainda sugere exames de “imprint” para citologias e “swab” de lesões pustulares para cultura bacteriana; o mesmo autor apresenta um algoritmo para facilitar o diagnóstico da atopia em cães (FIGURA 3).

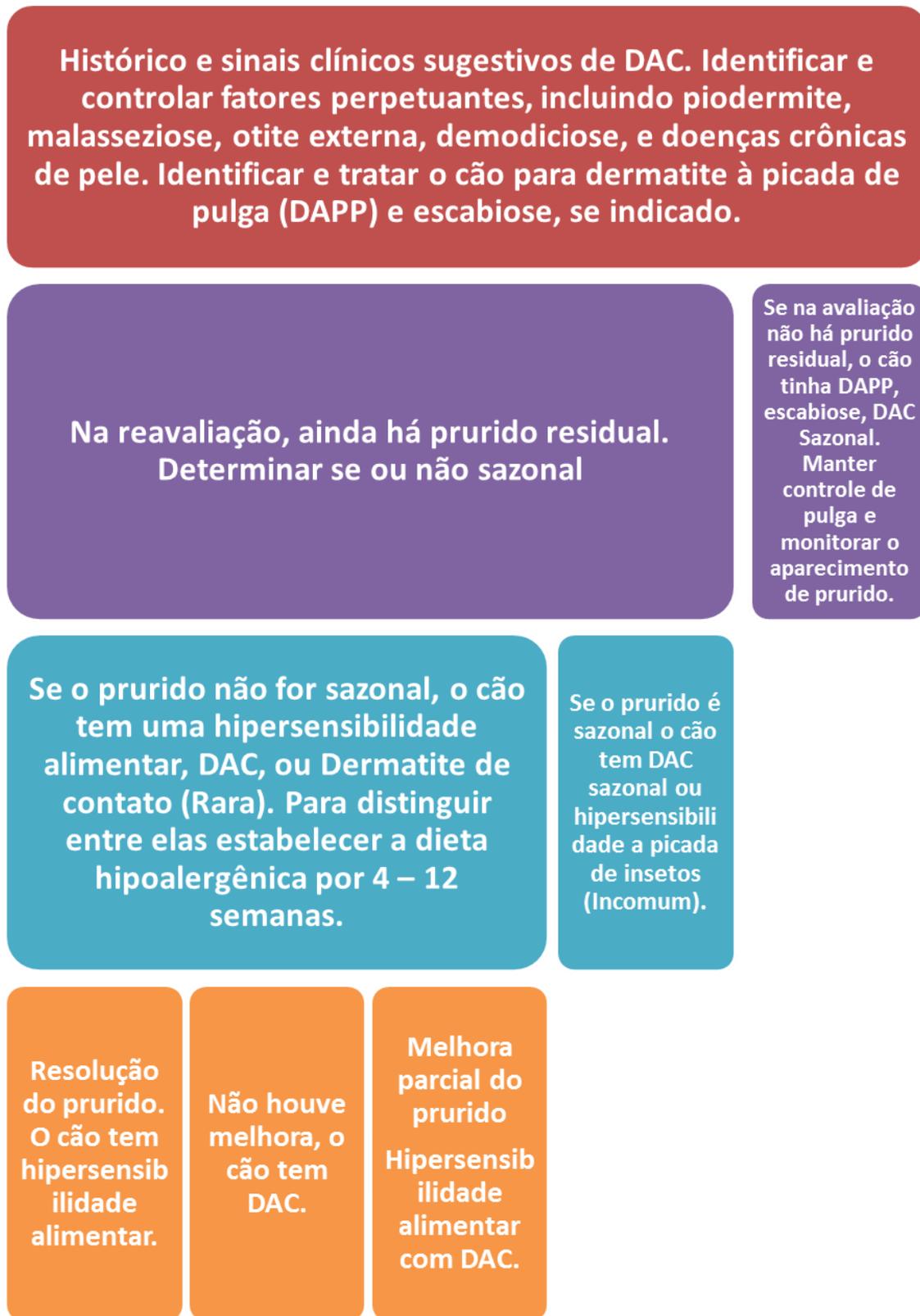
Feita a confirmação de DAC, realizar-se-á teste alérgicos com o objetivo de conhecer os alérgenos que o animal desenvolveu sensibilidade e a partir daí elaborar uma vacina específica com ao intuito de realizar a imunoterapia alérgeno-específica. O teste intradérmico (TID) para detecção dos alérgenos envolvidos na precipitação ou agravamento do eczema atópico, além de testes alérgicos sorológicos (SCOTT; MILLER; GRIFFIN, 1996). Considera-se o teste intradérmico como único método *in vivo* aceito para investigar alérgenos causadores de sinais clínicos em cães (THOMPSON, 1997; HILLIER; DEBOER, 2001; MILLER, GRIFFIN e CAMPBELL, 2013;).

O referido teste é realizado injetando-se por via intradérmica alérgenos suspeitos e a observação imediata de hipersensibilidade com rubor e pápula local, que são graduados subjetivamente através de inspeção visual e palpação (THOMPSON, 1997). Um resultado positivo não diagnostica DAC, mas é útil para selecionar alérgenos para a utilização de imunoterapia alérgeno específica (HILLIER, 2002). As reações com formação de eritema e pápulas significam que o cão apresenta anticorpos na pele, mas não necessariamente possui sinais clínicos de alergia, por isso faz-se necessário que as

respostas positivas sejam interpretadas de acordo com o histórico do animal (SCOTT; MILLER; GRIFFIN, 1996; HILLIER; DEBOER, 2001).

Todas as medicações que possam interferir no teste devem ser suspensas, e se o mesmo estiver usando anti-histamínico, deve-se retirá-lo cerca de 10 dias antes da realização do referido exame (SCOTT; MILLER; GRIFFIN, 1996; HILLIER; DEBOER, 2001). White (1998), entretanto, cita que o mesmo deve ser suspenso com 14 dias de antecedência ao teste. Já os glicocorticoides, estes devem ser descontinuados com três semanas (SCOTT; MILLER; GRIFFIN, 1996; WHITE, 1998; HILLIER; DEBOER, 2001), e caso os mesmos sejam de longa duração, deve-se retirá-los com seis a 12 semanas de antecedência (WHITE, 1998).

Figura 3: Algoritmo para diagnóstico de Dermatite atópica canina (DAC)



Fonte: (HILLIER, 2002 Adaptado).

O teste alérgico sorológico pode ser útil em situações onde o intradérmico não é uma opção, devido à indisponibilidade, interferência de fármacos, comprometimento grave da pele (WHITE, 1998) e quando os resultados forem negativos em um cão com grande evidência de DAC (SCOTT; MILLER; GRIFFIN, 1996, 2001). Estes testes identificam os anticorpos IgE específicos circulantes no soro dos pacientes com DAC (WHITE, 1998). Como exemplos temos o teste radioalergoabsorvente (RAST), o ensaio imunoabsorvente ligado a enzimas (ELISA) e o ensaio imunoenzimático de fase líquida, que detectam níveis relativos de IgE alérgeno específicos no soro (SCOTT; MILLER; GRIFFIN, 1996, 2001) .

White (1998) e Scott; Miller; Griffin, (1996, 2001) e ainda Miller,Griffin e Campbell (2013) demonstraram que o teste alérgico sorológico pode provocar reações falso-positivas como por exemplo na presença de endo e ecto parasitas, devido produzirem níveis elevados de IgE, desta forma a ocorrência de falsos – positivos nos testes sorológicos constitui uma das suas principais desvantagens.

O TID, em medicina humana, por ser pouco invasivo e de boa reprodutibilidade, se aplicado corretamente, é indicado para confirmar resposta alérgica, principalmente em pacientes com rinite e asma (FARIAS, 2007).

O TID é considerado procedimento rápido e seguro (HILLIER E DEBOER, 2001; CUNHA *et al.*, 2007; FERREIRA, 2013), em que extratos alergênicos são aplicados por via intradérmica para avaliar, de acordo com a intensidade da reação, se há hipersensibilidade mediada por IgE aos alérgenos utilizados (FERREIRA, 2013), e se estes devem ser incluídos no protocolo de imunoterapia alérgeno-específica ou não.

O referido teste é um importante auxílio no diagnóstico da DAC, por avaliar o órgão-alvo desta síndrome (CARLOTTI E COSTRAGENT, 1992; STURE *et al.*, 1995). Sua principal limitação é a possibilidade de interferência no potencial reacional cutâneo, pelo uso prévio de várias medicações, como anti-histamínicos e corticoides, como anteriormente descrito (HILLIER e DEBOER, 2001; FERREIRA, 2013).

Quando se compara os testes sorológicos e intradérmicos, vê-se que o diagnóstico sorológico é mais vantajoso por não haver a necessidade de tricotomia e nem de contenção química, sofrer menos influência de tratamentos e, sobretudo, ser bem menos invasivo, pois são necessários somente de 3-5 mL de soro sanguíneo (WHITE, 1998) (FIGURA 4).

Figura 4: No Teste Intra Dérmico (TID) é necessária tricotomia de uma ampla área em região lateral de tórax para a aplicação dos alérgenos.



Fonte: Dra. Erica Correa

Uma vez que nenhum teste sorológico disponível é totalmente sensível ou específico, tal teste não é indicado como triagem para classificar pacientes como alérgicos ou não alérgicos (HILLIER e DEBOER, 2001). No entanto, pode ser uma útil ferramenta diagnóstica para guiar a escolha dos alérgenos que irão compor a imunoterapia ou o manejo clínico do cão com DAC, na redução dos alérgenos no ambiente (OLIVRY *et al.*, 2010).

O exame histopatológico da pele é considerado não específico para diagnóstico de atopia. Entretanto, se estabeleceu que essas lesões apresentem características inflamatórias com padrão de cronicidade e dermatite perivascular hiperplástica, puras ou espongíóticas. São encontradas células epiteliotrópicas como células de Langerhans, linfócitos e raros eosinófilos. Na derme encontram-se mastócitos, linfócitos e ocasionalmente eosinófilos intactos ou degranulados (OLIVRY; HILL, 2001).

REFERENCIAS

ALVES, B.H., Ocorrência de dermatite atópica em cães atendidos na clínica de medicina veterinária (CLIMVET) do centro universitário de Formiga (UNIFOR – MG) entre os anos de 2010 – 2015. Trabalho de Conclusão de Curso. 2016.

ARLIAN, L.G.; PLATTS-MILLS, T.A.E. The biology of dust mites and the remediation of mite allergens in allergic disease. **Journal of allergy and clinical immunology**. V.10, Issue 3, p.406-413, 2001

BAUER, A.W., KIRB, W.M.M., SHERRIS, J.C. *et al.* Antibiotics susceptibility testing by a standardized single disk method. **American Journal of Pathology**, v.19, p.493-496, 1966.

BISIKOVA, P., *et al.*, Review: clinical and histological manifestations of canine atopic dermatitis. **Veterinary Dermatology**, v. 26, 79- e24. 2015.

BOGUNIEWICZ, M., SCHMID-GRENDELMEIER, P., AND LEUNG, D. Y. M. Atopic dermatitis. **Journal Allergy Clinical Immunology**. 117(suppl): S475-80. 2006.

CARLOTTI, D.N., COSTRAGENT, F. Analysis of positive skin tests in 449 dogs with allergic dermatitis. **Pratique Medicine Médicale et Chirurgical de l'animal de compagnie**, 27:53-69, 1992.

CUNHA, V.E.S. *et al.* Evaluation of skin sensitivity in dogs bearing allergic dermatites to standardized allergenic extract of house dust and storage mites. **Pesquisa Veterinária Brasileira**. v. 27, p. 341-344. 2007.

DEBOER, D.J., Abordagem diagnóstica de cães pruríticos. **Medvep Dermato**. V.3, n.10, (jul/set), Curitiba. 292-293p. 2014.

DETHIOUX, FABIENNE. Dermatite atópica canina, um desafio para o clínico. **Revista Focus Royal Canin**. P- 1-56. 2006.

EMERSON, R. M, WILLIAMS, H. C e ALLEN, B. R. What is the cost of atopic dermatitis in preschool children? **British Journal of Dermatology**, 143, 514-522. 2001.

FARIAS, M. R. Dermatite atópica canina: da fisiopatologia ao tratamento. **Clínica Veterinária**, n. 69, p. 48-62, 2007.

FAVROT, C. Clinical signs and diagnosis of canine atopic dermatitis. **European Journal of Companion Animal Practice**, v. 19, p. 219-222, 2009.

FAVROT, C., *et al.*, A prospective study on the clinical features of chronic canine atopic dermatitis and its diagnosis, **Veterinary Dermatology**, v.21, 23-31p. 2010.

FAVROT, C. *et al.*, Development of a questionnaire to assess the impact of atopic dermatitis on health-related quality of life of affected dogs and their owners. **Veterinary Dermatology**, 21, 64-70. 2010.

FERREIRA, R.R. Avaliação de diferentes concentrações de histamina e extratos alergênicos em cães sadios submetidos a testes intradérmicos. **Tese de doutorado**. UFRGS- Porto Alegre- RS. Faculdade de Veterinária. 70p. 2013.

- GRIFFIN, C. E.; DEBOER, D. J. The ACVD task force on canine atopic dermatitis (XIV): clinical manifestations of canine atopic dermatitis. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, Amsterdam, v. 81, n. 3-4, p. 255-269, 2001.
- HENSEL, P. *et al.*, Canine atopic dermatitis: Detailed guidelines for diagnosis and allergen identification. **BMC Veterinary Research**, 11:196. 2015
- HILL, P. B. *et al.*, Survey of the prevalence, diagnosis and treatment of dermatological conditions in small animals in general practice. **Veterinary Record**, London, v. 158, p. 533-539, 2006.
- HILLIER, A., DEBOER, D.J. The ACVD task force on canine atopic dermatitis (XV): fundamental concepts in clinical diagnosis. **Veterinary Immunology and Immunopathology**. V. 81, Issue 3-4, p. 271-276. 2001.
- HILLIER, A. Definitively diagnosing atopic dermatitis in dogs. **Veterinary Medicine**, v. 97, n. 3, p.198-208, 2002.
- HILLIER, A.; GRIFFIN, C. E. The ACVD task force on canine atopic dermatitis (I): incidence and prevalence. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, Amsterdam, v. 81, n. 3-4, p. 147-151, 2001.
- IHRKE, P.J. An overview of bacterial skin diseases in the dogs. *British Veterinary Journal*. V. 143, Issue 2, p. 112-118. 1987.
- JASMIN, P. Canine Atopic Dermatitis. In **Clinical Handbook on Canine Dermatology**. (3 th ed.). (121-132). Virbac Animal Health. 2011.
- LAUBER, B., *et al.*, Total IgE and allergen-specific IgE and IgG antibody levels in sera of atopic dermatitis affected and non-affected Labrador- and Golden retrievers. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, 149, 112-118. 2012.
- LOURENÇO-MARTINS, A. M. L, *et al.*, Será o cão o melhor amigo de um atópico? **Revista Portuguesa de Imunologia**, 18 (5), 405-418. 2010.
- MACDONALD, J. Allergen specific immunotherapy for atopy. In: **Proceedings of north American veterinary conference**. January, 7-11, p. 396-398. 2006.
- MARSELLA, R. e SAMUELSON, D. Unravelling the skin barrier: a new paradigm for atopic dermatitis and house dust mites. **Veterinary Dermatology**, 20, 533-540. . 2009
- MARSELLA, R., OLIVRY, T. e CARLOTTI, D. Current evidence of skin barrier dysfunction in human and canine atopic dermatitis. **Veterinary Dermatology**, 22, 239-248. 2011.
- MARSELLA, R. e OLIVRY, T. The ACVD task force on canine atopic dermatitis (VII): mediators of cutaneous inflammation. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, 81, 205-213. 2001.
- MARSELLA, R. *et al.*, Current understanding of the pathophysiologic mechanisms of canine atopic dermatitis. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, 241 (2), 194-207. 2012.

- MARSELLA, R., NICKLIN, C., LOPEZ, J. Studies on the role of routes of allergen exposure in high IgE-producing beagle dogs sensitized to house dust mites. **Veterinary Dermatology**. V. 17. Issue 5, p. 306-312. 2006.
- MILLER, W. H., GRIFFIN, C. E. e CAMPBELL, K. L.. Atopic disease. In **Muller and Kirk's Small Animal Dermatology**, (7th ed.). (p.p.364-388). St. Louis: Saunders-Elsevier. 2013.
- NUTTAL, T., McEwan, N. Objective measurement of pruritus in dogs: a preliminary study using activity monitors. *European Society of Veterinary Dermatology*. V. 17, 348-351p. 2006.
- OLIVRY, T., DEBOER, D.J. e GRIFFIN, C.E. The ACVD task force on canine atopic dermatitis: forewords and lexicon. **Veterinary Immunology and Immunopathology** 81, 143–5. 2001.
- OLIVRY, T. e HILL, P. B. The ACVD task force on canine atopic dermatitis (IX): the controversy surrounding the route of allergen challenge in canine atopic dermatitis. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, 81, 219–225. 2001.
- OLIVRY, T., DE BOER, D., FAVROT, C., JACKSON, H., MUELLER, R., NUTTAL, T. e PRELAUD, P. 2010. Clinical practice guidelines from the international Task Force on Canine Atopic Dermatitis. **Veterinary Dermatology**. 21(3): 233-248.
- OLIVRY, T *et al.* Validation of CADESI-03, a severity scale for clinical trials enrolling dogs with atopic dermatitis. **Veterinary Dermatology**. V. 18, Issue 2. P. 78-86. 2007.
- PLATTS-MILLS, T.A E. *et al.*, The evidence for a causal role of dust mites in asthma. **American journal in respiratory and critical care medicine**. V.180, n.2, 2009.
- PRELAUD, P. *et al*, Réévaluation des criteres de diagnostic de la dermatite atopique. **Revue de Médecine Vétérinaire**. V. 149, n.11. 1008
- PRÉLAUD, P. Dermatite Atopique Canine: Une Maladie Génétique? **Bull Acad Vét France**, 3, 229-234. 2007.
- RUIVO, C.I.R.O. Dermatite Atopica Canina – Impacto na qualidade de vida dos doentes e dos donos. **Dissertação de mestrado**. Faculdade de medicina veterinária – Universidade de Lisboa. 80f. 2015.
- SANTOS, M.G., SANTOS, M.M. Perfil da dermatite atópica canina em Salvador – Brasil. **PUBVET**. V.10, n.11, p.839-843. 2016.
- SARIDOMICHELAKIS, M.N.; OLIVRY, T. Na update on the treatment of canine atopic dermatites. **The veterinary journal**, n.207, p.29-37, 2016.
- SCOTT, D. W.; MILLER, W. H.; GRIFFIN, C. E. In: SCOTT, D. W.; MILLER, W. H.; GRIFFIN, C. E. **Dermatologia de pequenos animais**. 5. Ed. Rio de janeiro: Interlivros. p. 301-359. 1996.
- SCOTT, D. W.; MILLER, W. H.; GRIFFIN, C. E. **Small animal dermatology**. 6.ed. Philadelphia: W. B. Sauders Company,. p. 667-779. 2001

SCOTT, D.W., PARADIS, M. A survey of canine and feline skin disorders seen in a university practice: Small Animal Clinic, University of Montréal, Saint-Hyacinthe, Québec (1987-1988). **The Canadian Veterinary Journal**. 31 (12) p. 830-835. 1990.

SHIMADA K. et al, 2009. Increased transepidermal water loss and decreased ceramide content in lesional and non lesional skin of dogs with atopic dermatitis, **Veterinary dermatology**. 20(5-6): 541-546.

SOUSA, C.A. & MARSELLA, R. The ACVD task force on canine atopic dermatitis (II): genetic factors. **Veterinary Immunology and Immunopathology** 81, 155–7. 2001.

STURE G.H. *et al.*, Canine atopic disease: The prevalence of positive intradermal skin tests at two sites in the north and south of Great Britain. **Veterinary Immunology e Immunopathology**. V. 44, p. 293-308. 1995.

THOMPSON, J. P. Moléstias imunológicas. In: ETTINGER, S. J.; FELDMAN, E. C. **Tratado de medicina interna veterinária**. 4.ed. São Paulo: Manole,. v. 2, p. 2766-2802. 1997.

WHITE, P. D. Atopia. In: BICHARD, S. J.; SHERDING, R. G. **Manual saunders: clínica de pequenos animais**. São Paulo: Roca,. p. 343-351. 1998.

WILHEM, S., KOVALIK, M.e FAVROT, C. Breed-associated phenotypes in canine atopic dermatitis. **Veterinary Dermatology**, 22, 143-149. 2010.

WILLIAMSE, T. Doença de pele atópica: Uma revisão e uma reconsideração de critérios diagnósticos. **Journal of small animal practice**.1986.

WITTICH, F.W. Spontaneous allergy (atopy) in the lower animal: Seasonal hay fever (fall type) in a dog. **Journal of allergy**. v.12, Issue 3, p. 247-251. 1941.

MATERIAL E MÉTODOS

1-Aspectos Éticos da Pesquisa

O presente projeto foi aprovado pelo comitê de ética da UFRA (CEUA-UFRA) sob o Protocolo 004/2014 (CEUA) – 23084.001959/2014-99 (UFRA). (ANEXO1).

Os animais selecionados tiveram seus tutores informados através de uma ficha de identificação e um termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE), autorizando a participação na presente pesquisa. (ANEXO 2 e 3)

2- Local de Obtenção das Amostras.

As amostras foram obtidas a partir de pacientes caninos atendidos no Serviço de Dermatologia Veterinária do Hospital Veterinário Dr. Mario Dias Teixeira na Universidade Federal Rural da Amazônia (HOVET-UFRA), na cidade de Belém-Pará-Brasil.

3- Seleção dos Animais

3.1 Critérios de inclusão

Para o presente estudo foram utilizados cães que apresentavam quadros de piodermite recidivante, cuja causa de base era a dermatite atópica canina (DAC).

Todos os cães inclusos nessa pesquisa foram oriundos da rotina do atendimento clínico dermatológico no hospital veterinário da UFRA, onde foram submetidos à anamnese, exame clínico e exames laboratoriais dermatológicos compostos por raspado de pele e cultura de pelos para detecção de fungos com o objetivo descartar dermatopatias associadas à DAC. Sendo inclusos aqueles com resultados negativos para os exames anteriormente citados.

Todos os animais selecionados apresentavam histórico de piodermite superficiais que se manifestava de forma recidivante sempre após a suspensão do tratamento com antibioticoterapia sistêmica, em tempos variados após a suspensão da mesma. Em tempo, esses pacientes só eram inclusos na pesquisa se estivessem sem uso de terapia antimicrobiana sistêmica por um período mínimo de 30 dias.

O diagnóstico de dermatite atópica é um diagnóstico clínico-presuntivo, visto que não existe sinal patognomônico, sendo aqui estabelecido de acordo com os critérios de Favrot *et al.*, 2010, os quais referem que a dermatite atópica geralmente acomete cães intra-domiciliados, com início até três anos de idade, e se caracteriza por prurido alelesional, responsivo a corticóides, geralmente na superfície distal dos membros

anteriores e condutos auditivos, sem afetar as bordas dos pavilhões auriculares e região lombo-sacral.

4- Coleta das Amostras

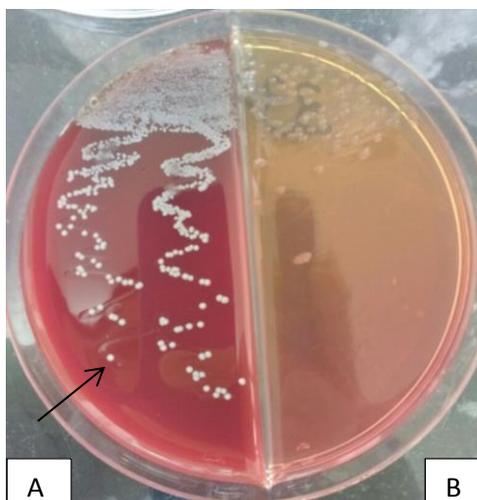
Foram coletadas amostras de 25 cães que corresponderam aos critérios de inclusão. As coletas foram realizadas assepticamente com auxílio de swab friccionando diretamente sobre as lesões e armazenados em meio de Stuart, até o momento da manipulação no laboratório de microbiologia.

5- Isolamento e Identificação da Bactéria

O material coletado foi analisado no laboratório de microbiologia do Instituto de Saúde e Produção Animal da UFRA (ISPA-UFRA), onde foram realizadas as seguintes etapas:

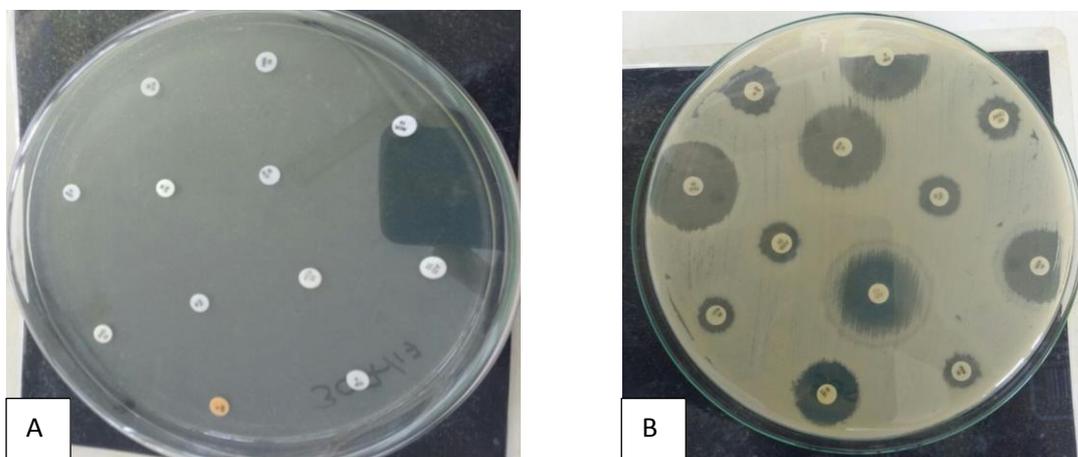
- a) Exame direto: Realizado por meio de um esfregaço da amostra em uma lâmina, corados pela técnica de Gram e observados em objetiva de imersão (aumento de 1000 vezes) em 10 campos.
- b) Posteriormente a amostra foi semeada em meio de Ágar sangue e Ágar Mackonkey e incubadas em aerobiose durante 24 horas.
- c) Após as 24 horas realizou-se a avaliação do crescimento em Ágar-Sangue, classificando as bactérias com base na morfologia da colônia em seguida selecionava uma colônia característica e realizava-se o esfregaço em lâmina e corava pelo método de Gram (FIGURA 5).
- d) Para a realização dos testes de sensibilidade do micro-organismo a fármacos antimicrobianos, foi utilizado o método Kirby-Bauer (BAUER *et al.*,1966). Os antimicrobianos usados incluíram: Amoxicilina + Ácido clavulânico (AMC), Amicacina (AMI), Ampicilina + Sulbactam (ASB), Ciprofloxacino (CIP), Cefalotina (CFL), Cloranfenicol (CLO), Gentamicina (GEN), Nitrofurantoína (NIT), Norfloxacino (NOR), Oxaciclina (OXA), Penicilina (PEN), Rifampicina (RIF). (FIGURA 6 – A e B).

Figura 5: Imagem de placa de Petri mostrando crescimento bacteriano em meio Agar – Sangue (A), com visualização de colônias circulares, opacas, de coloração creme (Seta). Figura B contém o meio Ágar-Mackonkey, com crescimento de colônias de Gram Negativos. Somente colônias características de *Staphylococcus* spp em Ágar- sangue foram selecionadas.



Fonte Arquivo pessoal.

Figura 6 (A e B): Imagem de placa de Petri contendo meio pra realização do teste de sensibilidade antimicrobiana. Os discos de antibióticos eram posicionados (A) e após 24 horas realizava-se a leitura dos halos (B) formados que eram avaliados em tabela padrão, como resistente e sensível.



Fonte: Arquivo Pessoal.

Após os procedimentos acima citados realizou-se o congelamento da bactéria para submetê-la à Reação em Cadeia pela Polimerase (PCR). Para tal procedimento utilizou-se 500 μ L de meio de Caldo-Cérebro-Coração (CCC) em um tubo tipo Eppendorf e com o auxílio de uma alça de Henle, aplicava a colônia no meio, deixando-

o *overnight* em estufa a 37°C, centrifugando a 10.000 RPM/ 10 minutos, desprezando o sobrenadante e finalmente congelando à -80° C.

6- Reação em Cadeia Mediada pela Polimerase – PCR

6.1- Extração do DNA

O DNA foi extraído com o auxílio do *kit* comercial Purelink Genomic DNA Mini Kit (Invitrogen), seguindo instruções do fabricante. Os produtos obtidos no final das extrações foram armazenados a -80°C.

6.2- Reação em Cadeia pela Polimerase (PCR)

Foram realizadas PCR convencional (PCR) e PCR Tempo Real (qPCR) da amostra após extração do DNA. Tal protocolo foi estabelecido para identificação da presença do gene *mecA*. Os oligonucleotídeos iniciadores utilizados nas reações foram os primers *mecA*-F1 (5'-AAAATCGATGGTAAAGGTTGGC-3'), *mecA*-F2 (5'-CGGACAAGGTGAAATACTGA-3') e *mecA*-R (5'-AGTTCTGCAGTACCGGATTTGC-3'). Os iniciadores F1 e R foram os mesmos utilizados por Maluta (2008), enquanto que F2 foi desenhado e padronizado pelos autores.

A PCR convencional foi realizada segundo o protocolo descrito por Maluta (2008), sendo utilizado os primers *mecA*-F1 e *mecA*-R. O volume final da reação foi de 25 µL contendo 15,15 µL de água; 2,5 µL de 10x PCR Buffer; 0,5 µL de 10 mM dNTP; 0,75 µL de 50 mM MgCl₂; 0,5 µL de Primer *mecA*-F1 (10 µM); 0,5 µL Primer *mecA*-R (10 µM); 0,1 µL de Platinum Taq DNA polimerase e 5 µL de DNA (Anexo4). O processo de amplificação da PCR convencional foi realizado em termociclador com as seguintes condições de tempo e temperatura: desnaturação inicial a 94°C durante 5 minutos; composto de 40 ciclos com desnaturação 94°C durante 40 segundos, anelamento a 64°C durante 50 segundos e extensão a 72°C durante 1 minuto; além de uma etapa de extensão final a 72°C durante 4 minutos.

Os amplicons gerados foram submetidos à análise pela eletroforese em gel de agarose a 2%, sob voltagem constante (100 v) por 40min e visualizados sob luz ultravioleta (UV), obtendo-se um fragmento de aproximadamente 533 pares de base

Na qPCR foi utilizado o kit Platinum® SYBR® Green qPCR SuperMix-UDGo volume final da reação foi de 25 µL, composto de 5,5 µL de água; 12,5 µL de master mix; 1,0 µL de MgCl₂; 0,5 µL de primer *mecA*-F2(10 µM); 0,5 µL de primer *mecA*-R

(10 μM) e 5 μL de DNA (Anexo 4). O processo de amplificação da qPCR ocorreu com desnaturação inicial de 95°C durante 5 minutos; 45 ciclos com desnaturação a 95°C durante 10 segundos; hibridização e extensão a 62°C durante 30 segundos. Usando o equipamento CFX96 Touch™ Real-Time PCR Detection System, gerando fragmentos de 252 pares de base.

Devido não haver controle positivo foi realizado o sequenciamento das amostras positivas, pela técnica de Sanger *et al.*, (1977) para a validação da presença do gene mecA, utilizando as amostras positivas na PCR convencional e qPCR.

7-Sequenciamento Nucleotídico

7.1-Purificação do DNA Amplificado

A purificação do DNA amplificado na PCR convencional foi realizada com o kit da Quick Gel extraction (Promega, EUA), seguindo as instruções contidas no manual do fabricante que consistiu em, após ter sido realizada a corrida do gel de agarose com o resultado da PCR, as melhores bandas foram selecionadas e destacadas do gel e pesados em balança de precisão, sendo essas bandas condicionadas dentro de microtubos sendo pesadas logo em seguida, onde foi adicionado a diferença de peso entre a banda e o tubo em μL de *Bind Solution*, e levados para banho Maria a 65°C, por cerca de 10 minutos ou até o gel se dissolver por completo.

Posteriormente foi passado o volume de 700 μL da solução para uma coluna e centrifugada por 1 minuto a 15.000 g, adicionado em seguida 700 μL de *Membrane Wash Solution* e centrifugado por 1 minuto a 15.000 g, adicionando mais uma vez *Membrane Wash Solution* no volume 500 μL e centrifugado por 5 minutos a 18.000 g.

As colunas ficaram então em repouso por cerca de 1 minuto, tempo para a evaporação do etanol, então a coluna foi passada para um novo microtubo adicionando-se 50 μL de H_2O *free*, incubando por 1 minuto a temperatura ambiente, e por fim realizou-se uma centrifugação por 1 minuto a 15.000 g.

7.2-Sequenciamento das Amostras

O DNA purificado, foi sequenciado em ciclos com o Kit ABI PRISM Dye Terminator versão 3.0, que emprega o método de terminação de cadeia por didesoxiribonucleotídeo (SANGER *et al.*, 1977) marcados com diferentes fluoróforos para cada nucleotídeo na extremidade 3'. Na mistura para cada reação de sequenciamento continha 4 μL de Terminator ready reaction mix, 50 ng do produto de

PCR, 3,5 pmoles de oligonucleotídeos utilizados para a PCR (primers mecA-F1 e mecA-R) e quantidade suficiente de água para um volume final de 20 µL.

A amplificação foi realizada usando o programa que consistiu de 25 ciclos, cada um composto por etapas de desnaturação a 96°C por 10 segundos, hibridização dos iniciadores a 52°C por 5 segundos e extensão a 60°C por 4 min. Após este processo o produto de sequenciamento foi purificado utilizando o kit comercial X-terminator (applied biosystems, EUA) conforme descrito pelo fabricante. A montagem e curadoria das leituras obtidas foram feitas utilizando o programa Geneious v.9.1.6. As sequências nucleotídicas obtidas pelo sequenciamento foram alinhadas e comparadas entre si e contra outras sequências de diferentes amostras de *Staphylococcus* spp. disponíveis no Genbank (www.ncbi.nlm.nih.gov) utilizando o programa Mafft v.7.

8- Análise Estatística

A análise da concordância dos resultados obtidos entre os resultados obtidos na PCR e a qPCR, foi avaliado pelo índice *Kappa*. Quadro 3.

A concordância dos resultados obtidos no teste de sensibilidade antimicrobiana entre a oxacilina e a presença do gene mecA foram avaliados pelo Teste Exato de Fisher.

O Teste Exato de Fisher também foi aplicado para avaliar a influencia do sexo na PCR de acordo com Serra Freire (2002) com nível de significância de 5%.

Quadro 3: Escala de concordância do indicador *Kappa* (ANDRADE & ZICKER, 1997)

<i>Kappa</i>	Concordância
< 0,00	Nenhum
0,00 – 0,20	Fraco
0,21 – 0,40	Sofrível
0,41 – 0,60	Regular
0,61 – 0,80	Boa
0,81 – 0,99	Ótima
1,00	Perfeita

9-RESULTADOS E DISCUSSÃO

Foram selecionados 25 cães portadores de piodermite e dermatite atópica. Os animais selecionados e seus sinais clínicos de acordo com os critérios citados estão disponibilizados no Quadro 4.

Quadro 4: Critérios de FAVROT (2010), utilizados para direcionar o diagnóstico de DAC. A utilização desses critérios se baseia em respostas positivas e negativas aos itens no alto do quadro.

Animal / Amostra	Indoor	Início Até 3 anos	Prurido alésional	Prurido Responsivo ao corticóide	MAs afetados	Conduto Auditivo Afetado	Borda De orelha Livre	Lombo Sacra livre
01	+	6 m	+	+	+	+	+	+
02	+	7 a	+	+	+	+	+	+
03	+	1 a	+	+	-	-	+	+
04	+	5 a	+	+	+	-	+	+
05	+	4 a	+	+	+	+	+	+
06	+	1 a	+	+	+	-	+	+
07	+	6 m	+	+	+	+	+	+
08	+	5 a	+	+	+	-	+	+
09	+	4 a	+	+	-	-	+	+
10	+	6 a	+	+	+	-	+	+
11	+	6 m	+	+	+	-	+	+
12	+	3 a	+	+	+	+	+	+
13	+	3 a	+	+	+	-	+	+
14	+	2 a	+	+	+	+	+	+
15	+	3 a	+	+	-	-	+	+
16	+	1 a	+	+	+	-	+	+
17	+	3 a	+	+	+	-	+	+
18	+	1 a	+	+	+	-	+	+
19	+	3 a	+	+	-	+	+	+
20	+	3 m	+	+	-	+	+	+
21	+	4 a	+	+	+	-	+	+
22	+	1 a	+	+	-	-	+	+

23	+	1 a	+	+	-	-	+	+
24	+	4 m	+	+	-	-	+	+
25	+	5 a	+	+	+	+	+	+

Indoor: Animais (Cães) que vivem a maioria do tempo, dentro de casa;

(+) – Positivo / (-) – Negativo

Na coluna **Início ate os 3 anos de idade:** A idade citada para cada animal representa a idade informada pelo tutor do início do aparecimento dos sintomas da DAC, e que FAVROT cita que a maioria dos animais tem o início desses sinais ate o 3º ano de vida.

Segundo Olivry *et al.*, (2010) a combinação de 5 critérios satisfatórios tem uma sensibilidade de 85% e especificidade de 79% para diferenciar cães com DA de cães com prurido crônico recorrente sem DA, os 25 animais de nosso estudo foram positivos para pelo menos 5 critérios. Os exames de raspado de pele e micológicos não mostraram co-morbidades, corroborando com Hillier (2002), pois ele cita que são exames que devem ser sempre solicitados para pacientes portadores de dermatopatias.

O presente estudo foi composto por 20/25 (80%) cães com raça definida (CRD) e 5/25 (20%) sem raça definida (SRD), revelando maior prevalência da DAC em cães CRDs, dos animais CRD aqui analisados 2/20 (10%) eram Pitt Bull; 3/20 (15%) Yorkshire; 6/20 (30%) Poodles; 3/20 (15%) Shitzu; e as raças Schnauzer, Bulldog Ingles, Border Collie, Pug, Pastor Alemão e Pinscher corresponderam a 1/20 (5%) cada. Sousa; Marsella (2001) citam que há uma importante predisposição racial nesta enfermidade, também defendido por Griffin; Deboer, (2001). Enquanto que White, (1998) sinaliza que pode afetar também mestiços, assim como encontrado no presente estudo em cães SRD. Outros pesquisadores como Favrot (2009) e Souza; Marsella (2001) defendem a tese de que predisposição racial pode variar, dependendo da localização geográfica, o que talvez seja um objeto de estudo futuro para se avaliar a certeza da predisposição racial ou não.

A predisposição sexual nos dados obtidos na presente pesquisa não mostrou diferença significativa, pois ocorreu um equilíbrio entre machos e fêmeas, composto por 13 e 12, respectivamente. Alguns autores como Scott; Miller; Griffin, (1996); Thompson, (1997); White, (1998); Griffin; Deboer, (2001,) sugerem que essa prevalência seja maior nas fêmeas, mas citam ainda que variações ocorrem de acordo com o perfil de criação e preferencias regionais, porém, Wilhem, Kovalic e Favrot, (2010) sugerem a inexistência de prevalência sexual, corroborando com a presente pesquisa.

A faixa etária do início do aparecimento dos sintomas dos animais afetados no presente estudo revelou 5/25 (20%) animais com sintomas antes de 1 ano de idade, 12/25 (48%) entre 1 e 3 anos de idade e 8/25 (32%) com início dos sinais acima dos 4 anos de idade. Tal achado está de acordo com aqueles de Miller, Griffin e Campbell, (2013); Griffin; Deboer, (2001); e White,(1998) que afirmam que o aparecimento dos primeiros sintomas se dá entre 6m e 7 anos de idade. Entretanto, os critérios preconizados por Favrot et al., (2010) referem que o aparecimento dos primeiros sinais ocorre na maioria das vezes até os 3 anos de idade, visualizado aqui em 17/25 cães, correspondendo a 68% dos animais estudados.

O material coletado mostrou a presença de *Staphylococcus* spp, com base na morfologia da colônia e provas bioquímicas aplicadas para classificação da bactéria Pianta *et al.*, 2006 observou nos cultivos obtidos no meio de ágar-sangue, e observou as características coloniais, a reação da catalase e a coloração de Gram, o que lhe permitiu inicialmente classificar as amostras examinadas por ele como pertencentes ao gênero *Staphylococcus*.

Os pacientes do presente estudo, para serem inclusos, precisavam apresentar além da DAC, quadro de piodermite recidivante, sinalizando uma doença de caráter inflamatório e crônico, em conformidade com o descrito por Boguniewicz, (2006) e Dethioux, (2006) que citam que a DAC geralmente está presente com erupções, frequentemente complicadas por infecções recorrentes provocadas por bactérias e /ou leveduras. Ainda por ser uma doença crônica, cada vez mais diagnosticada, afetando a relação tutor e animal corroborando com Favrot, Linek *et al* (2010) que diz que a doença afeta a qualidade de vida dos animais e tutores. Ruivo (2015) realizou um trabalho semelhante e constatou que a DAC afeta a vida de seus proprietários com base em um questionário aplicado em sua pesquisa.

Ainda com base nos critérios de inclusão no que diz respeito a piodermite recidivante de acordo com Miller, Griffin e Campbell (2013) a piodermite bacteriana superficial é uma das dermatopatias mais frequentes em cães, na grande maioria das vezes, secundária a causas de base tais como alergias e endocrinopatias. De acordo com Larsson Jr. (2008) a piodermite superficial tem um importante papel na dermatologia canina, devido ser mais frequente que as profundas e conceitualmente tem etiologia múltipla e, em alguns cães, assumem caráter crônico e recidivante. Fato observado em todos os animais do estudo que precisavam ser portadores de piodermite superficial recidivante para serem inclusos no estudo.

A característica de pacientes com quadro de piodermite de repetição se deve ao fato dos cães com DAC possuírem uma redução na barreira epidérmica de proteção, sendo, portanto a infecção bacteriana mais frequentes em pacientes com este tipo de alteração genética e que têm como consequência perda na barreira transepidérmica, sendo este apontado como fator fundamental para o desenvolvimento dos sinais clínicos da doença, como defendido por Olivry *et al.*, (2010). Desta forma, percebemos que a DAC apresenta muitas similaridades com a dermatite atópica humana preconizada por Marsella e Olivry (2003).

Na avaliação da sensibilidade aos antimicrobianos, o antibiograma mostrou uma alta ocorrência de Resistência aos fármacos utilizados, como mostra a Tabela 1.

Tabela 1: Resultado do teste de sensibilidade antimicrobiana aplicado nas amostras, segundo Kirby-Bauer (1966).

ANTIMICROBIANO	SENSIVEL	RESISTENTE
Amoxicilina + Ac. Clavulânico (AMC)	11 (44%)	14 (56%)
Amicacina (AMI)	06 (24%)	19 (76%)
Ampicilina + Sulbactan (ASB)	07 (28%)	18 (72%)
Ciprofloxacino (CIP)	13(52%)	12 (48%)
Cefalotina (CFL)	08 (32%)	17 (68%)
Cloranfenicol (CLO)	08 (32%)	17 (68%)
Gentamicina (GEN)	10 (40%)	15 (60%)
Nitrofurantoina (NIT)	05 (20%)	20 (80%)
Norfloxacino (NOR)	11 (44%)	14 (56%)
Oxacilina (OXA)	04 (16%)	21 (84%)
Penicilina (PEN)	05 (20%)	20 (80%)
Rifampicina (RIF)	08 (32%)	17 (68%)

A resistência aos antimicrobianos utilizados no teste de sensibilidade mostrou que a Amoxicilina com Ácido Clavulânico foi a droga que mostrou maior nível de sensibilidade (11/25), enquanto que os mais resistentes foram a amicacina (19/25), penicilina (20/25) e a Oxacilina (21/25), respectivamente. Tunon, Silva e Faienstein (2008) isolaram cepas de *Staphylococcus* spp. em otites caninas e encontraram 83% de cepas resistentes a pelo menos um dos antibióticos utilizados, enquanto que Pianta et

al., (2006) encontrou cerca de 95% de sensibilidade a amoxicilina com ácido clavulânico de piódermas canino por ele examinado.

De acordo com Pentead Filho, Lopes e Levi, (2007) os testes de sensibilidade convencionais, como o método de difusão em disco, nem sempre são sensíveis o suficiente para detectar populações heterorresistentes. Atualmente, o teste de triagem para essas cepas é feito por meio da verificação da sensibilidade à oxacilina e à determinação da presença do gene *mecA* por técnicas moleculares utilizando a reação em cadeia mediada pela polimerase (PCR), assim como realizada no presente estudo onde a resistência a oxacilina detectada pelo método Kirby-Bauer foi de 21/25 (84%).

A amplificação do gene *mecA* foi positiva em 9 animais (36%), sendo as amplificações validadas pelo sequenciamento genético das amostras positivas e a correlação com a sensibilidade a oxacilina (Tabela 2, Figura 7).

Tabela 2: Resultados das reações de PCR and qPCR, que foram realizadas nas amostras pra detecção do Gene *mecA*., existiram amostras positivas em ambas as reações e outras positivas em somente uma das reações. X significa positividade e a correlação com a sensibilidade a oxacilina, onde R significa Resistente e S- sensível.

AMOSTRA	qPCR	PCR	TSA- OXA	SEXO
07	X	X	R	F
12	X	X	R	F
13	X	X	R	F
15	X	X	R	F
17	X	-	R	M
19	X	-	R	F
21	X	-	R	M
22	-	X	S	M
24	-	X	S	M

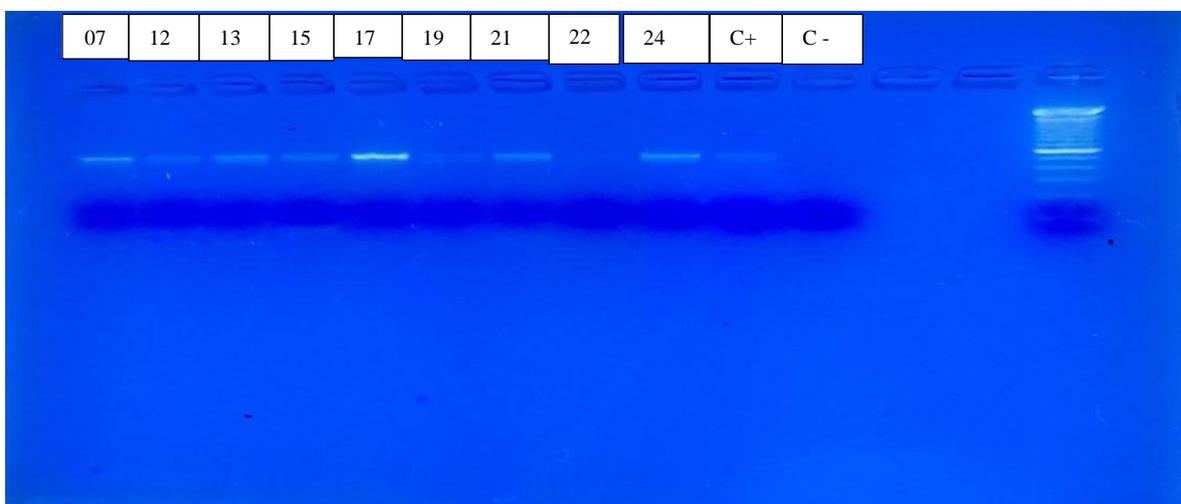
TSA- OXA: teste de sensibilidade antimicrobiana à Oxacilina.

O índice *Kappa* aplicado para a análise dos dados obtidos entre a PCR e qPCR concluiu uma concordância de $K=0,84$, mostrando uma ótima concordância, ou seja, ótima replicabilidade entre as técnicas utilizadas.

O Teste Exato de Fisher aplicado para avaliar a associação entre uma das técnicas de PCR aplicadas e o sexo do animal, mostrou um $P=1$, concluindo não haver

associação entre as informações analisadas. O mesmo Teste de Fisher foi utilizado para analisar a associação entre a resistência a oxacilina e a presença do gene *mecA*, e o mesmo retornou um $P=0,57$, digo, não existe uma associação entre a resistência a oxacilina com a presença do gene *mecA*, mostrando que podem existir outros mecanismos envolvidos na resistência que não estão ligados a presença do gene *mecA*.

Figura 7: Gel de Agarose com amostras positivas, tanto na PCR convencional quanto na qPCR, para utilização dos amplicons no sequenciamento genético. Poços de 1-9 com amostras positivas (Exceto poço 8 com amostra 22, que não formou banda), poço 10 com controle positivo (C+); poço 11 com controle negativo (C-), poços 12 e 13 sem amostras e poço 14 com o ladder de 100 pb.

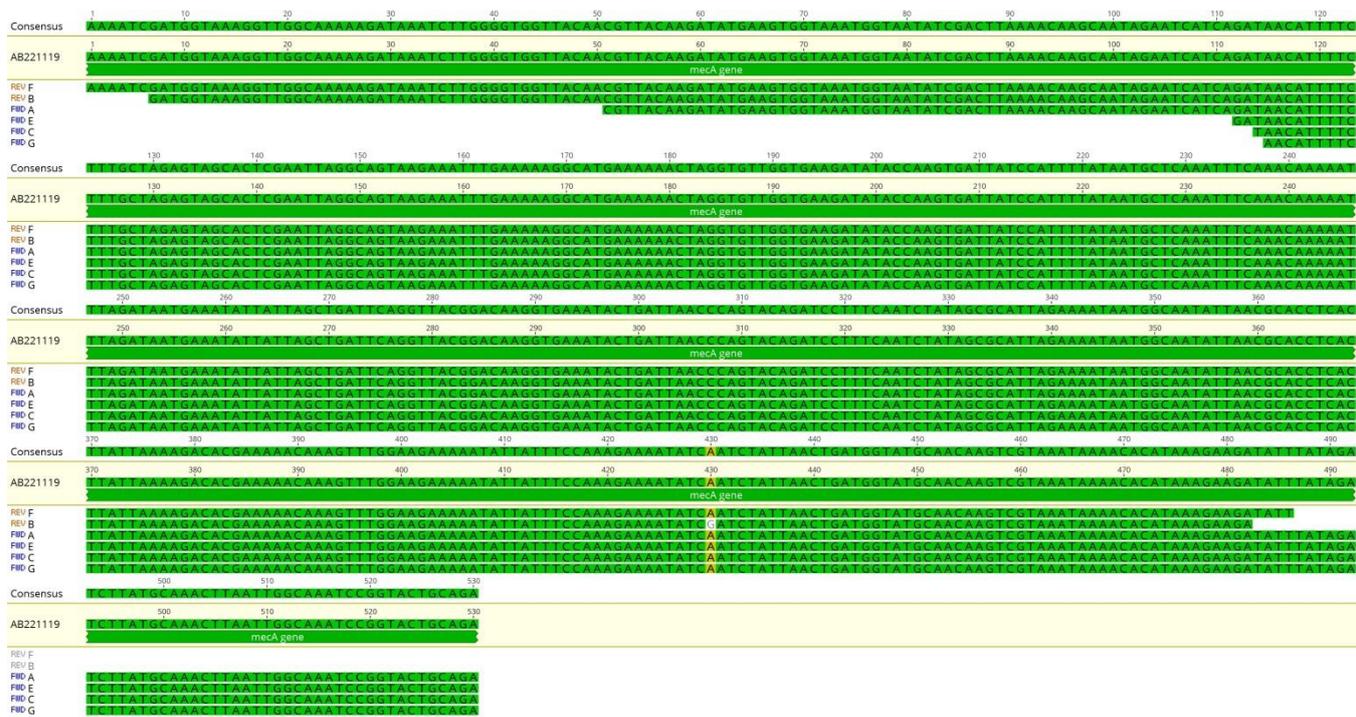


Fonte: Arquivo Pessoal

A ocorrência do gene *mecA* na reação mediada pela polimerase, que foi presente em 9 animais (36%), sendo dois positivos somente na PCR convencional e três na qPCR; e quatro cães positivos em ambas técnicas de PCR utilizadas. Maluta *et al.*, (2008) conseguiram isolar duas cepas de estafilococos meticilina resistente em 4 % dos cães de seu experimento e ainda isolou 18 cepas, correspondente a 36%, de seres humanos. Diante do resultado da presente pesquisa, considera-se a ocorrência de *Staphylococcus* spp. bastante significativa, o que justifica a preocupação de Guardabassi, Schwarz e Lloyd (2004) que dizem que o potencial risco à saúde humana e animal, diante da possibilidade do surgimento de bactérias resistentes nos animais de companhia, tem sido, até agora, considerado insignificante, e principalmente em cães estão surgindo resistência relevante do ponto de vista clínico em bactérias isoladas.

Como forma de confirmação de que foi detectado *Staphylococcus* spp com presença do gene da multirresistência (mecA), foi realizado o sequenciamento das amostras positivas e confirmou tratar-se do referido gene (FIGURA 8).

Figura 8: Sequencias obtidas a partir das amostras positivas e que foram alinhadas com uma sequência disponível no NCBI, demonstrando que as amostras sequenciadas correspondem ao gene mecA.



9-CONCLUSÕES

- A detecção do gene *mecA*. revelou uma ocorrência significativa nos *Staphylococcus* spp. isolados para esta pesquisa.
- As técnicas de PCR e qPCR mostraram ótima concordância entre si.
- A resistência a oxacilina não esta diretamente ligada a presença do gene *mecA*.

REFERENCIAS

- ANDRADE, A.L.S.S., ZICKER, F. (Org). Avaliação de testes diagnósticos. In: **Métodos de Investigação Epidemiológica em Doenças Transmissíveis**. Brasília: OPAS: FNS, v.1, p 9-30. 1997
- BAUER, A.W., KIRB, W.M.M., SHERRIS, J.C. *et al.* **Antibiotics susceptibility testing by a standardized single disk method**. American Journal of Pathology, v.19, p.493-496, 1966.
- BOGUNIEWICZ, M., SCHMID-GRENDELMEIER, P.,AND LEUNG, D. Y. M. **Atopic dermatitis**. *Journal Allergy Clinical Immunology*. 117(suppl): S475-80. 2006.
- DETHIOUX, FABIENNE. **Dermatite atópica canina, um desafio para o clínico**. Revista Focus Royal Canin. p. 1-56. 2006.
- FAVROT, C. **Clinical signs and diagnosis of canine atopic dermatitis**. European Journal of Companion Animal Practice, v. 19, p. 219-222, 2009.
- FAVROT, C., *et al.*, A prospective study on the clinical features of chronic canine atopic dermatitis and its diagnosis , **Veterinary Dermatology**, v.21, p.23-31. 2010.
- FAVROT, C. *et al.*, **Development of a questionnaire to assess the impact of atopic dermatitis on health-related quality of life of affected dogs and their owners**. Veterinary Dermatology, 21, p.64-70. 2010.
- GRIFFIN, C. E.; DEBOER, D. J. **The ACVD task force on canine atopic dermatitis (XIV): clinical manifestations of canine atopic dermatitis**. Veterinary Immunology and Immunopathology, Amsterdam, v. 81, n. 3-4, p. 255-269, 2001.
- GUARDABASSI, L.; SCHWARZ, S.; LLOYD, D. H. **Pet animals as reservoirs of antimicrobial-resistant bacteria**. Journal of Antimicrobial Chemotherapy, Oxford. v.54, n.2, p.321-322, 2004.
- HILLIER, A. **Definitively diagnosing atopic dermatitis in dogs**. Veterinary Medicine, v. 97, n. 3, p.198-208, 2002.
- IKRAM, M. **Microbiologia diagnóstica**. In: HENDRIX, C. M. Procedimentos laboratoriais para técnicos veterinários. 4. ed. São Paulo: Roca, p.109-225. 2005.
- LARSSON JR, C.E., Estudo comparativo da eficácia da imunoterapia com bacterina e de dois esquemas de pulsoterapia antibiótica no manejo de piodermite superficiais idiopáticas recidivantes caninas. **Dissertação de mestrado**. Faculdade de medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo. 88f. 2008.
- MALUTA, R. P. Isolamento e perfil de suscetibilidade a antimicrobianos de cepas de estafilococos resistentes à em um hospital veterinário de ensino no Brasil. Jaboticabal. **Dissertação** (Mestrado em Microbiologia Agropecuária – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, SP). 44p, 2008.

MARSELLA, R. & OLIVRY, T. **Animal Models of Atopic Dermatitis**. Clinics in Dermatology, 21, 122–133. 2003.

MILLER, W. H., GRIFFIN, C. E. & CAMPBELL, K. L. **Atopic disease**. In Muller and Kirk's Small Animal Dermatology, 7th ed. p.364-388 St. Louis: Saunders-Elsevier. 2013.

OLIVRY, T., DE BOER, D., FAVROT, C., JACKSON, H., MUELLER, R., NUTTAL, T. & PRELAUD, P. **Clinical practice guidelines from the international Task Force on Canine Atopic Dermatitis**. Veterinary Dermatology. v.21(3): p.233-248. 2010.

PENTEADO FILHO, S. R.; LOPES, H. V.; LEVI, G. C.. **Antibióticos clássicos: principais características e uso terapêutico**. In: Neto, V. A.; Nicodemo, A. C.; Lopes, H. V.. Antibióticos na Prática Médica. 6.ed. São Paulo: Sarvier. cap 4. p.94-96. 2007.

PIANTA C. *et al.*, **Pioderma estafilocócico canino: identificação das espécies e sensibilidade aos antimicrobianos**. Revista de Ciências Agroveterinárias, Lages, v. 5, n. 1, p. 60-63, 2006.

RUIVO, C.I.R.O. Dermatite Atópica Canina – Impacto na qualidade de vida dos doentes e dos donos. **Dissertação de mestrado**. Faculdade de medicina veterinária – Universidade de Lisboa. 80f. 2015.

SANGER, F., NICKELN, S. AND COULSON, A.R. **DNA sequencing with chain terminating inhibitors**. Proceedings of the National Academy of Sciences. USA. v. 74, n12, p.5463-5467. 1977.

SCOTT, D. W.; MILLER, W. H.; GRIFFIN, C. E. In: Scott, D. W.; Miller, W. H.; Griffin, C. E. **Dermatologia de pequenos animais**. 5. Ed. Rio de Janeiro: Interlivros. p. 301-359. 1996.

SERRA-FREIRE, N.M. Testes de Significância. In: _____. Planejamento e análises de pesquisas parasitológicas. Niterói, RJ: Ed. Universidade Federal Fluminense. P.169-173. 2002.

SOUSA, C.A. & MARSELLA, R. **The ACVD task force on canine atopic dermatitis (II): genetic factors**. Veterinary Immunology and Immunopathology. v.81, p.155–157. 2001.

THOMPSON, J. P. **Moléstias imunológicas**. In: Ettinger, S. J.; Feldman, E. C. Tratado de medicina interna veterinária. 4.ed. São Paulo: Manole, v. 2, p. 2766-2802. 1997.

TUNON, G. I. L.; SILVA, E. P.; FAIERSTEIN, C. C.. **Isolamento de Estafilococos Multirresistentes de Otites em Cães e sua Importância para a Saúde Pública**. Boletim Epidemiológico Paulista, São Paulo, v.58, n.5, 2008.

WHITE, P. D. **Atopia**. In: Bichard, S. J.; Sherding, R. G. Manual saunders: clínica de pequenos animais. São Paulo: Roca, p. 343-351. 1998.

WILHEM, S., KOVALIK, M.& FAVROT, C. Bredd-associated phenotypes in canine atopic dermatitis. *Veterinary Dermatology*, v.22, p.143-149. 2010.

ANEXO 1



UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DA AMAZÔNIA
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

ATESTADO

Protocolo 004/2014 (CEUA) – 23084.001959/2014-99 (UFRA)

Título do Projeto: O perfil da infecção estafilocócica de repetição em cães com dermatite atópica na cidade de Belém-Pará

Docente/Pesquisador Responsável: Med. Veterinária Sinerey Karla Salim A. de Sousa

Instituição: Instituto da Saúde e Produção Animal – ISPA / UFRA

PARECER

O Comitê de Ética no Uso de Animais da UFRA, apreciou o protocolo acima e verificou que foram atendidas todas as exigências da Lei Federal 11.794/08 (Lei Arouca), sendo respeitados os Princípios Éticos da Experimentação Animal do CONCEA. Portanto, manifesta-se pela sua aprovação.

Parecer: APROVADO

Liberado para o início da pesquisa sendo obrigatório a entrega nesta CEUA do relatório semestral e de conclusão ao final da pesquisa. Comunicar por escrito, toda e qualquer modificação no projeto/plano de ensino.

Belém, 26 de março de 2014.

Profa. Dra. Ana Sílvia Sardenha Ribeiro
Coordenadora CEUA/UFRA

ANEXO 2



Universidade Federal Rural da Amazônia

Programa de Pós Graduação em Saúde e Produção Animal na Amazônia - Doutorado

Orientador: Prof. Dr. André Marcelo Conceição Meneses

Co Orientador: Prof. Dr. Marconi Rodrigues de Farias

Aluna: Sinerey Karla Salim Aragão de Sousa

Tema: **OCORRÊNCIA DO GENE *mecA* EM *Staphylococcus* spp ISOLADOS DA PELE DE CÃES COM PIODERMITE RECIDIVANTE**

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO - TCLE

Nome do animal:.....

Idade:.....

Raça:.....

Sexo:.....

Proprietário:.....

Endereço:.....

Bairro:..... Fone:.....

Autorizo a coleta de material do animal de minha propriedade acima identificado para compor amostra do projeto “Perfil da infecção estafilocócica de repetição em cães com dermatite atópica na cidade de Belém - Pará”.

Belém,/...../.....

.....

CPF-

ANEXO 3



Universidade Federal Rural da Amazônia

Programa de Pós Graduação em Saúde e Produção Animal na Amazônia - Doutorado

Orientador: Prof. Dr. Andre Marcelo Conceição Meneses

Aluna: Sinerey Karla Salim Aragão de Sousa

Tema: **OCORRÊNCIA DO GENE *mecA* EM *Staphylococcus* spp ISOLADOS DA
PELE DE CÃES COM PIODERMITE RECIDIVANTE
FICHA DE IDENTIFICAÇÃO PARA COLETA DE MATERIAL**

NOME:.....IDADE:.....

RAÇA:..... SEXO:.....

PROPRIETÁRIO:.....

ENDEREÇO:.....

BAIRRO:.....TELEFONE:.....

MATERIAL:

- SWAB:.....

OBSERVAÇÕES:.....

.....

.....

.....

DATA DA COLETA:...../...../.....

ANEXO 4

Invitrogen™ Platinum™ Taq DNA Polymerase

Pub. no. MAN000925 Rev. B.0

	Catalog number	Size	
Package contents	10966-018	120 rxns	Kit contents
	10966-026	300 rxns	
	10966-034	600 rxns	
	10966-083	5000 rxns	

Enzyme characteristics

Hot-start: Antibody
Length: Up to 5 kb
Fidelity vs. Taq: 1X
Format: Separate components

	25- μ L rxn	50- μ L rxn	Custom	Final conc. in 50- μ L rxn
Water, nuclease-free	to 25 μ L	to 50 μ L	to μ L	—
10X PCR Buffer, – Mg	2.5 μ L	5 μ L	μ L	1X
50 mM MgCl ₂	0.75 μ L	1.5 μ L	μ L	1.5 mM
10 mM dNTP mix	0.5 μ L	1 μ L	μ L	0.2 mM each
10 μ M forward primer	0.5 μ L	1 μ L	μ L	0.2 μ M
10 μ M reverse primer	0.5 μ L	1 μ L	μ L	0.2 μ M
Template DNA	varies	varies		<500 ng/rxn
KB Extender (optional)*	varies	varies	μ L	3–9%
Platinum™ Taq DNA Polymerase	0.1 μ L	0.2 μ L	μ L	2 U/rxn

* Recommended for targets >5 kb or with >65% GC sequences.

Storage conditions

- Store all contents at –20°C.

Required materials

- Template: cDNA, gDNA, ADNA
- Forward and reverse gene-specific primers
- Invitrogen™ 10 mM dNTP mix (Cat. no. 18427-088)
- Water, nuclease-free
- Invitrogen™ E-Gel™ General Purpose Gels, 1.2% (Cat. no. G5018-01)
- Invitrogen™ TrackIt™ 1 kb Plus DNA Ladder (Cat. no. 10488-085)
- 0.2 or 0.5-mL nuclease-free microcentrifuge tubes
- Gel loading buffer

Timing

Varies depending on amplicon length

Selection guide

PCR Enzymes and Master Mixes
 Go online to view related products.

Product description

- Platinum™ Taq DNA Polymerase is a recombinant Taq polymerase complexed with a proprietary antibody that blocks the polymerase activity at ambient temperatures.
- Activity is restored after the initial denaturation step in PCR cycling at 94°C, providing an automatic “hot start” and offering increased sensitivity, specificity, and yield, while allowing reaction assembly at room temperature.
- This enzyme has a non-template-dependent, terminal transferase activity that adds a single deoxyadenosine (A) to the 3' ends of PCR products.
- Like standard Taq, it has both 5' to 3' polymerase and 5' to 3' exonuclease activity, but lacks 3' to 5' exonuclease activity.

Important guidelines

Click here for important PCR guidelines.

Online resources

Visit our [product page](#) for additional information and protocols.
 For support, visit thermofisher.com/techresources.

For Research Use Only. Not for use in diagnostic procedures.

PCR setup

Use the measurements below to prepare your PCR experiment, or enter your own parameters in the column provided.

PCR protocol

See page 2 for instructions to prepare and run your PCR experiment.

Optimization strategies

Click here for guidelines to optimize your PCR experiment.

Purchaser notification

Click here for Limited warranty, Disclaimer, and Licensing information.

Print Options

Platinum™ Taq DNA Polymerase

The example PCR procedure below shows appropriate volumes for a single 50- μ L reaction. For multiple reactions, prepare a master mix of components common to all reactions to minimize pipetting error, then dispense appropriate volumes into each 0.2–0.5 mL PCR tube prior to adding template DNA and primers.

Steps	Action	Procedure details																					
1 	Thaw reagents	Thaw, mix, and briefly centrifuge each component before use.																					
2 	Prepare PCR master mix	<p>Add the following components to each PCR tube.</p> <p>Note: Consider the volumes for all components listed in steps 2 and 3 to determine the correct amount of water required to reach your final reaction volume.</p> <table border="1"> <thead> <tr> <th>Component</th> <th>50-μL rxn</th> <th>Final conc.</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>Water, nuclease-free</td> <td>to 50 μL</td> <td></td> </tr> <tr> <td>10X PCR Buffer, – Mg</td> <td>5 μL</td> <td>1X</td> </tr> <tr> <td>50 mM MgCl₂</td> <td>1.5 μL</td> <td>1.5 mM</td> </tr> <tr> <td>10 mM dNTP mix</td> <td>1 μL</td> <td>0.2 mM each</td> </tr> <tr> <td>KB Extender (optional)*</td> <td>1.5–4.5 μL</td> <td>3–9%</td> </tr> <tr> <td>Platinum™ Taq DNA Polymerase</td> <td>0.2 μL</td> <td>2 U/rxn</td> </tr> </tbody> </table> <p>*For targets >5 kb or with >65% GC sequences.</p> <p>Mix and then briefly centrifuge the components.</p>	Component	50- μ L rxn	Final conc.	Water, nuclease-free	to 50 μ L		10X PCR Buffer, – Mg	5 μ L	1X	50 mM MgCl ₂	1.5 μ L	1.5 mM	10 mM dNTP mix	1 μ L	0.2 mM each	KB Extender (optional)*	1.5–4.5 μ L	3–9%	Platinum™ Taq DNA Polymerase	0.2 μ L	2 U/rxn
Component	50- μ L rxn	Final conc.																					
Water, nuclease-free	to 50 μ L																						
10X PCR Buffer, – Mg	5 μ L	1X																					
50 mM MgCl ₂	1.5 μ L	1.5 mM																					
10 mM dNTP mix	1 μ L	0.2 mM each																					
KB Extender (optional)*	1.5–4.5 μ L	3–9%																					
Platinum™ Taq DNA Polymerase	0.2 μ L	2 U/rxn																					
3 	Add template DNA and primers	<p>Add your template DNA and primers to each tube for a final reaction volume of 50 μL.</p> <table border="1"> <thead> <tr> <th>Component</th> <th>50-μL rxn</th> <th>Final conc.</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>10 μM forward primer</td> <td>1 μL</td> <td>0.2 μM</td> </tr> <tr> <td>10 μM reverse primer</td> <td>1 μL</td> <td>0.2 μM</td> </tr> <tr> <td>Template DNA</td> <td>varies</td> <td><500 ng/rxn</td> </tr> </tbody> </table> <p>Cap each tube, mix, and then briefly centrifuge the contents.</p>	Component	50- μ L rxn	Final conc.	10 μ M forward primer	1 μ L	0.2 μ M	10 μ M reverse primer	1 μ L	0.2 μ M	Template DNA	varies	<500 ng/rxn									
Component	50- μ L rxn	Final conc.																					
10 μ M forward primer	1 μ L	0.2 μ M																					
10 μ M reverse primer	1 μ L	0.2 μ M																					
Template DNA	varies	<500 ng/rxn																					
4 	Incubate reactions in a thermal cycler	<table border="1"> <thead> <tr> <th>Step</th> <th>Temperature</th> <th>Time</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>Initial denaturation</td> <td>94°C</td> <td>2 minutes</td> </tr> <tr> <td rowspan="3">25–35 PCR cycles</td> <td>Denature</td> <td>94°C</td> </tr> <tr> <td>Anneal</td> <td>~55°C (depending on primer T_m)</td> </tr> <tr> <td>Extend</td> <td>72°C</td> </tr> <tr> <td>Hold</td> <td>4°C</td> <td>indefinitely</td> </tr> </tbody> </table>	Step	Temperature	Time	Initial denaturation	94°C	2 minutes	25–35 PCR cycles	Denature	94°C	Anneal	~55°C (depending on primer T _m)	Extend	72°C	Hold	4°C	indefinitely					
Step	Temperature	Time																					
Initial denaturation	94°C	2 minutes																					
25–35 PCR cycles	Denature	94°C																					
	Anneal	~55°C (depending on primer T _m)																					
	Extend	72°C																					
Hold	4°C	indefinitely																					
5 	Add gel loading buffer and analyze with gel electrophoresis	<p>Add gel loading buffer to 10 μL of PCR sample, mix, and briefly centrifuge the contents.</p> <p>Analyze the sample using agarose gel electrophoresis.</p> <p>Use your PCR product immediately in down-stream applications, or store it at –20°C.</p>																					