



**UNIVERSIDADE DE CAXIAS DO SUL**  
**ÁREA DO CONHECIMENTO DE CIÊNCIAS DA VIDA**  
**INSTITUTO DE BIOTECNOLOGIA**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA**

RESISTÊNCIA ANTIMICROBIANA DE *STAPHYLOCOCCUS* SPP.  
ISOLADOS DE CÃES E GATOS DA REGIÃO DA SERRA GAÚCHA

**ALINE DE BARROS MOYSES**

Caxias do Sul  
2020

ALINE DE BARROS MOYSES

RESISTÊNCIA ANTIMICROBIANA DE *STAPHYLOCOCCUS* SPP.  
ISOLADOS DE CÃES E GATOS DA REGIÃO DA SERRA GAÚCHA

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Biotecnologia da Universidade de Caxias do Sul, visando à obtenção de grau de Mestre em Biotecnologia. Orientador: Prof. Dr. André Felipe Streck. Co-orientadores: Dra. Simone Silveira e Prof. Msc. Gustavo Brambatti.

Caxias do Sul  
2020

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)  
Universidade de Caxias do Sul  
Sistema de Bibliotecas UCS - Processamento Técnico

M938r Moyses, Aline de Barros

Resistência antimicrobiana de *Staphylococcus* spp. isolados de cães e gatos da região da Serra Gaúcha / Aline de Barros Moyses. – 2020.  
56 f. : il. ; 30 cm

Dissertação (Mestrado) - Universidade de Caxias do Sul, Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, 2020.

Orientação: André Felipe Streck.

Coorientação: Simone Silveira, Gustavo Brambatti.

1. Resistência a metilina. 2. Agentes antiinfecciosos. 3. Resistência microbiana a medicamentos. 4. Antibióticos. 5. Animais - Doenças. I. Streck, André Felipe, orient. II. Silveira, Simone, coorient. III. Brambatti, Gustavo, coorient. IV. Título.

CDU 2. ed.: 577.181

Catalogação na fonte elaborada pela(o) bibliotecária(o)  
Carolina Machado Quadros - CRB 10/2236

**ALINE DE BARROS MOYSES**

RESISTÊNCIA ANTIMICROBIANA DE *STAPHYLOCOCCUS* SPP.  
ISOLADOS DE CÃES E GATOS DA REGIÃO DA SERRA GAÚCHA

*Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação  
em Biotecnologia da Universidade de Caxias do Sul,  
visando à obtenção de grau de Mestre em Biotecnologia.*

Orientador: Prof. Dr. André Felipe Streck  
Co-orientadora: Profa. Dra. Simone Silveira  
Co-orientador: Prof. Msc. Gustavo Brambatti

DISSERTAÇÃO APROVADA EM 06 DE MARÇO DE 2020

---

Orientador: Prof. Dr. André Felipe Streck

---

Co-orientadora: Profa. Dra. Simone Silveira

---

Co-orientador: Prof. Msc. Gustavo Brambatti

---

Prof. Dr. Cláudio Wageck Canal

---

Prof. Dr. Vagner Ricardo Lunge

---

Prof. Dra. Suelen Osmarina Paesi

## AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador professor Dr. André Felipe Streck pela oportunidade de realizar este projeto, e que não me deixou desistir diante dos obstáculos e dificuldades que surgiram, sempre incentivando a conclusão deste trabalho.

Aos meus coorientadores Dra. Simone Silveira e Msc. Gustavo Brambatti pelas contribuições para realização do projeto.

Às estagiárias, Olívia, Júlia, Paula, Cristiane, Gabriela, Luiza, às colegas de mestrado Tamiris e Jéssica e a técnica Simone, por trabalharem junto comigo neste projeto, contribuindo imensamente para esta conclusão.

À professora Dra. Mariana Roesch Ely e o Laboratório de Genômica, Proteômica e Reparo de DNA por ter disponibilizado o laboratório para realização da pesquisa.

À agência de fomento CAPES pelo suporte financeiro e à Universidade de Caxias do Sul pela infraestrutura de pesquisa, que permitiram o desenvolvimento deste trabalho e aos professores e funcionários do Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, pelas contribuições a minha formação acadêmica.

A minha família por acreditar em mim, sempre me incentivando a buscar novos conhecimentos, me dando amor e carinho, me encorajando e não me deixando desistir nos momentos difíceis.

Enfim, a todas as pessoas que contribuíram para a realização desta dissertação de mestrado, meu muito obrigada.

# ÍNDICE

<b>RESUMO</b> .....	6
<b>ABSTRACT</b> .....	7
<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	8
<b>2 OBJETIVOS</b> .....	10
2.1 OBJETIVO GERAL .....	10
<b>3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b> .....	11
3.1 ESTAFILOCOCOS .....	11
3.2 USO DE ANTIMICROBIANOS EM ANIMAIS DE COMPANHIA .....	13
3.3 RESISTÊNCIA BACTERIANA NA MEDICINA HUMANA E VETERINÁRIA E O RISCO PARA SAÚDE PÚBLICA .....	16
3.4 MECANISMOS DE RESISTÊNCIA BACTERIANA .....	18
3.5 RESISTÊNCIA À METICILINA .....	20
3.6 MRSA E MRSP RESISTENTES A OUTRAS CLASSES DE ANTIMICROBIANOS .....	23
3.7 IDENTIFICAÇÃO DOS MRSA E MRSP .....	25
<b>4 RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	27
<b>5 CONCLUSÕES FINAIS</b> .....	47
<b>6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	48

## RESUMO

*Staphylococcus pseudintermedius* resistente à meticilina (MRSP) e *Staphylococcus aureus* resistente à meticilina (MRSA) são bactérias comuns em animais e humanos causando infecções de difícil tratamento. Por possuir o gene *mecA*, possuem resistência a todos os antibióticos  $\beta$ -lactâmicos. O objetivo deste estudo foi conhecer a resistência antimicrobiana de *Staphylococcus* spp. isolados de cães e gatos da Serra Gaúcha, considerando que as infecções por estas bactérias quando multirresistentes são um problema de saúde pública. Para isso, suabes foram coletadas de diferentes regiões do corpo de 90 animais. Destas amostras foi possível isolar através de cultura bacteriológica e identificar como *Staphylococcus* spp. o total de 94 bactérias. Os *Staphylococcus* spp. isolados foram submetidos ao método de disco-difusão de oxacilina para avaliar a resistência à meticilina e mais outros dez antibióticos mais usados na medicina veterinária. Das 94 amostras isoladas, 22,4% (21/94) tinham resistência à meticilina. Quando considerando o total de animais coletados (90) tivemos uma média de 18,8% (17/90) de animais positivos para *Staphylococcus* resistentes à meticilina (MRS). Grande parte dos animais tem contato direto com seus tutores como o convívio dentro de casa e dormir na mesma cama, o que alerta ao risco de transmissão de genes de resistência entre bactérias de humanos e animais. Conclui-se que a resistência à meticilina está presente nos animais da Serra Gaúcha.

**Palavras-chave:** resistência, *Staphylococcus pseudintermedius*, *Staphylococcus aureus*, meticilina.

## **ABSTRACT**

Methicillin-resistant *Staphylococcus pseudintermedius* (MRSP) and Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) are common bacteria in animals and humans causing infections that are difficult to treat. Because they have the *mecA* gene, they are resistant to all  $\beta$ -lactam antibiotics. The aim of this study was to understand the antimicrobial resistance of *Staphylococcus* spp. isolated from dogs and cats of Serra Gaúcha, considering that infections by these bacteria when multi-resistant are a public health problem. For this, Swabians were collected from different regions of the body of 90 animals. From these samples it was possible to isolate through bacteriological culture and identify as *Staphylococcus* spp. the total of 94 bacteria. *Staphylococcus* spp. isolates were subjected to the oxacillin disk-diffusion method to assess methicillin resistance and ten other antibiotics most used in veterinary medicine. Of the 94 isolated samples, 22.4% (21/94) had methicillin resistance. When considering the total of animals collected (90), we had an average of 18.8% (17/90) of animals positive for methicillin-resistant *Staphylococcus* (MRS). Most animals have direct contact with their tutors, such as living together and sleeping in the same bed, which warns of the risk of transmitting resistance genes between bacteria in humans and animals. It is concluded that methicillin resistance is present in animals from Serra Gaúcha.

**Keywords:** resistant, *Staphylococcus pseudintermedius*, *Staphylococcus aureus*, methicillin.



## 1 INTRODUÇÃO

Antibióticos desempenham um papel crítico na saúde e bem-estar dos seres humanos e animais. O advento e a subsequente ampla disponibilidade de agentes antibióticos foram transformadores para a medicina moderna. Sem antibióticos eficazes no tratamento e profilaxia de microrganismos, grandes avanços médicos e cirúrgicos teriam sido impossíveis, e as doenças infecciosas representariam uma ameaça ainda maior à saúde.

Em todo o mundo, há uma crescente preocupação com o aumento da prevalência de resistência a antibióticos. É aceito que o principal fator de risco para este aumento na resistência em bactérias patogênicas é o aumento do uso de antibióticos. Isso tem levado, inevitavelmente, ao surgimento e disseminação de bactérias resistentes e genes de resistência (Fedesa, 2000). Atualmente, a resistência a antibióticos é considerada uma grande ameaça à saúde humana em todo o mundo (World Health Organization, 2019).

Em animais de companhia, os antibióticos são usados na prevenção e tratamento de doenças infecciosas, principalmente as infecções de pele, otite externa, infecções respiratórias, infecções do trato urinário, do trato gastrointestinal (Guardabassi *et al.*, 2004), feridas traumáticas (Pereira & Bahr Arias, 2002) e na profilaxia cirúrgica (Aiello *et al.*, 2007; Umber & Bender, 2009). As classes de antibióticos usados em animais de companhia, em geral, incluem cefalosporinas, penicilinas, lincosamidas, macrolídeos, tetraciclinas, sulfas potencializadas, aminoglicosídeos e fluoquinolonas (Pereira & Bahr Arias, 2002; Guardabassi *et al.*, 2004; Bahr Arias *et al.*, 2008).

Nos últimos anos, a resistência à meticilina surgiu como um problema considerável em bactérias do gênero *Staphylococcus*. A resistência à meticilina nos estafilococos é conferida pelo

gene *mecA* que codifica a proteína 2a de ligação à penicilina (PBP2a), que tem uma afinidade reduzida para todos os antibióticos  $\beta$ -lactâmicos (Weese, 2010). Dentre as bactérias deste gênero, se destaca o *S. aureus* resistente à meticilina (MRSA), que é um patógeno importante na medicina humana e é uma preocupação na medicina veterinária (Weese, 2010; Chambers, 2009). Os relatos crescentes de *S. pseudintermedius* resistentes a antibióticos, especialmente o surgimento e disseminação rápida de *S. pseudintermedius* resistente à meticilina (MRSP) são, portanto, preocupantes, pois limitam as opções de tratamento (Kadlec *et. al.*, 2010; Perreten *et.al.* 2010).

Um aumento no número de animais de companhia e sua maior aproximação com humanos, juntamente com o aumento do uso de antibióticos são fatores que contribuem para o crescimento de resistência bacteriana aos antibióticos. Com isso, ocorre também a disseminação de genes de resistência e transferência destes entre espécies. Tendo em vista que a evolução dos mecanismos de resistência das bactérias aos antibióticos é um problema de emergência em saúde pública e que os estafilococos resistentes à meticilina são uma grande preocupação para a medicina humana e a medicina veterinária, investigações sobre a incidência de *Staphylococcus* resistentes em cães e gatos e seus riscos à saúde pública vem ganhando importância.

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 OBJETIVO GERAL

- Determinar a resistência antimicrobiana em *Staphylococcus spp.* isolados de cães e gatos da Região da Serra Gaúcha.

### 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Isolar e identificar *Staphylococcus spp.* coletados na pele, pavilhão auricular, conjuntiva nasal, conjuntiva ocular e reto de cães e gatos da Região da Serra Gaúcha.

- Determinar a resistência dos isolados de *Staphylococcus spp.* a onze antimicrobianos, através do método de disco-difusão em ágar.

- Conhecer o perfil epidemiológico dos animais que apresentaram *Staphylococcus spp.* resistentes a antibióticos, por meio de aplicação de um questionário epidemiológico.

- Avaliar o risco de transmissão de resistência bacteriana entre humanos e animais de companhia.

### 3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

#### 3.1 OS ESTAFILOCOCOS

Os estafilococos são cocos facultativamente anaeróbios e Gram-positivos. São um grupo de bactérias que habitam a pele, as glândulas da pele e as membranas mucosas de humanos e outros mamíferos (Otto, 2010). Dois grupos principais distinguem-se pela sua capacidade de coagular o sangue: estafilococos coagulase-positivo, sendo as espécies mais importantes *Staphylococcus aureus* e *Staphylococcus intermedius*, e estafilococos coagulase-negativos, que compreendem a maioria das espécies, incluindo *Staphylococcus epidermidis* (Kloos, 1983).

Estafilococos coagulase-positivos (CoPS) na medicina veterinária, são os maiores causadores das infecções cutâneas e de tecidos moles. Historicamente, *S. intermedius* foi o primeiro CoPS reconhecido como distinto de *S. aureus* em meados da década de 1970. Desde 1976, o grupo *S. intermedius* (SIG) compreende três espécies geneticamente demonstráveis: *S. intermedius*, *S. pseudintermedius* e *S. delphini*, cada qual ocupando nichos ecológicos distintos (Hajet, 1976). A importância da diferenciação dos membros do SIG ocorre devido a maior patogenicidade de *S. pseudintermedius* em comparação com *S. intermedius*. Análises comparando o genoma todo de membros do SIG identificaram variações no conteúdo de elementos genéticos móveis, proteínas associadas à parede celular e transportadores de ferro e açúcar. *S. pseudintermedius* também continham mais elementos genéticos transponíveis (transposons) envolvidos na resistência a múltiplos fármacos do que outros membros do grupo SIG (Ben Zakour *et al.*, 2012).

*Staphylococcus pseudintermedius* é um importante patógeno oportunista em gatos e cães, causando infecções da pele e dos tecidos moles, otite externa e infecções de ferida após a cirurgia (Van Duijkeren *et al.*, 2011). Este pode ser encontrado em grande número na pele canina e pode ocasionalmente ser transferido para a pele de contactantes humanos, e então pode ser diagnosticado como *S. aureus*, pois compartilham características bioquímicas importantes como a capacidade de produzir coagulase. O diagnóstico errôneo pode acabar subestimando a ocorrência de infecções por *S. pseudintermedius* em humanos (Kloos *et al.*, 1976; Börjesson *et al.*, 2015).

Dentro dos *Staphylococcus* coagulase-positiva está o *S. aureus*, um patógeno oportunista significativo de humanos e animais. As infecções mais relatadas por *S. aureus* são infecções de feridas, sítios cirúrgicos, piodermites, otites e infecções do trato urinário, mas podem ocorrer infecções oportunistas, em vários outros locais do corpo (Baptiste *et al.*, 2005; Griffeth *et al.*, 2008; Leonard *et al.*, 2006; Morris *et al.*, 2006; Tomlin *et al.*, 1999; Vitale *et al.*, 2006; Weese *et al.*, 2006).

A prevalência de *S. aureus* em caninos e felinos tende a ser mais comum quando estes animais de estimação vivem com uma pessoa que foi recentemente diagnosticada com infecção por *S. aureus* resistente à metilina (MRSA). Um aumento na frequência de infecções humanas causadas por MRSA provavelmente levaram à disseminação dessas bactérias para espécies veterinárias (Cohn, 2010).

Como exemplo, Faires *et al.* (2009) avaliaram a taxa de transmissão de MRSA de animais infectados para humanos e vice-versa. Na identificação de animais infectados com MRSA, pelo menos um indivíduo do domicílio colonizado por MRSA foi identificado em mais

de 25% (6/22, 27,3%) dos casos. Em contraste, apenas um em cada oito (12,5%) humanos infectados com MRSA tinham um animal de estimação colonizado por MRSA.

### 3.2 USO DE ANTIMICROBIANOS EM ANIMAIS DE COMPANHIA

A utilização de antimicrobianos nos animais começou há mais de 50 anos, quando o resíduo excedente da fermentação da clortetraciclina provou melhorar o crescimento e a saúde animal. Desde então, mudanças substanciais têm sido feitas na alimentação de animais de produção e na medicina de animais de companhia (Guardabassi *et al.*, 2010).

Ao longo do tempo, o número de animais de companhia tem aumentado substancialmente na sociedade moderna, sendo estes tratados como membros das famílias, o que resulta em aumento nas despesas com cuidados veterinários e terapia antimicrobiana. A utilização de antimicrobianos tornou-se disseminada tanto para os animais de produção como para os de companhia. Atualmente, estima-se que mais da metade de todos os antimicrobianos produzidos mundialmente é utilizada nos animais (Gardabassi *et al.*, 2010).

Em medicina veterinária os antibióticos podem ser utilizados de quatro maneiras, conforme descreve Schwarz (2001) abaixo:

- uso terapêutico - quando o seu uso tem como objetivo controlar uma infecção;
- uso profilático - quando o seu objetivo é evitar o possível surgimento de uma infecção;
- uso metafilático - quando o seu uso tem objetivos terapêuticos e profiláticos;
- uso como promotor de crescimento e desenvolvimento animal.

Em animais de companhia, os principais antimicrobianos são utilizados com intuito de tratar e prevenir doenças infecciosas, principalmente otites, doenças de pele, infecções respiratórias, infecções do trato urinário, do trato gastrointestinal, trato reprodutivo e feridas traumáticas (Guardabassi *et al.*, 2004; Pereira & Bahr Arias, 2002; Aiello *et al.*, 2007; Umber & Bender, 2009). Para tais fins, as classes de antibióticos mais utilizados são: cefalosporinas, penicilinas, lincosamidas, macrolídeos, tetraciclina, sulfas potencializadas, aminoglicosídeos e fluoroquinolonas (Pereira & Bahr Arias, 2002; Guardabassi *et al.*, 2004; Bahr Arias *et al.*, 2008).

Os antimicrobianos mais utilizados para tratamento de doenças infecciosas em animais de companhia são: amoxicilina associada ao ácido clavulânico, seguido de cefalosporinas (sendo estes dois primeiros pertencentes à classe dos  $\beta$ -lactâmicos) e fluoroquinolonas. A Tabela 1 resume os principais antimicrobianos utilizados na clínica veterinária.

Tabela 1 - Opções de antimicrobianos de primeira escolha e de escolha alternativa para tratamento de infecções nos animais de companhia.

	<b>Antimicrobianos de primeira escolha</b>	<b>Antimicrobianos alternativos</b>
<b>Pele</b>	Amoxicilina e Ácido clavulânico Cefalosporinas	Sulfonamidas e Trimetropin Fluoroquinolonas Clindamicina e Cloranfenicol
<b>Trato Urinário</b>	Cefalosporinas Amoxicilina ou Ampicilinas Amoxicilina e Ácido clavulânico	Trimetropim e Sulfonamidas Fluoroquinolonas Tetraciclina
<b>Septicemias</b>	Amoxicilina e Ácido clavulânico Fluoroquinolonas Cefalosporinas	Aminoglicosídeos Cefalosporinas (2º ou 3º geração)

<b>Ossos e Articulações</b>	Cefalosporinas	Sulfonamidas e Trimetropim
	Amoxicilina e Ácido clavulânico	Clindamicina
		Cefalosporinas (2º ou 3º geração)
<b>Trato Respiratório</b>	Amoxicilina e Ácido clavulânico	Fluoroquinolonas
	Fluoroquinolonas	Macrolídeos
	Cefalosporinas	Aminoglicosídeos
		Clindamicina
<b>Patologias intracelulares</b>	Doxiciclina	Cefalosporinas (2º ou 3º geração)
	Fluoroquinolonas	Azitromicina
		Clindamicina

Fonte: Louis (2010).

Buckland *et al.* (2017) realizaram um estudo no Reino Unido durante dois anos para avaliar a frequência e a quantidade de antimicrobianos utilizados em cães e gatos. Para ambas as espécies, os principais agentes administrados eram do tipo penicilina e cefalosporinas (Figura 1). Amoxicilina+clavulanato foi o agente potencializado mais comumente utilizado para ambas às espécies.

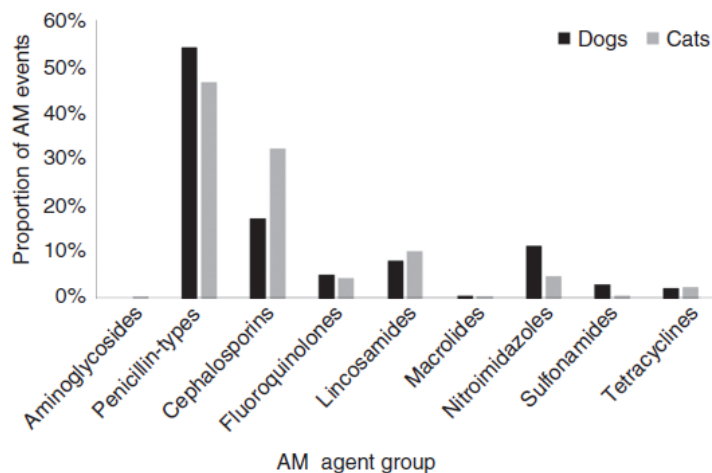


Figura 1 – Antimicrobianos (AM) mais utilizados em cães (preto) e gatos (cinza) em uma pesquisa à um banco de dados envolvendo 963.463 cães e 594.812 gatos no Reino Unido entre 2012 e 2014. Fonte: Buckland *et al.* (2017).



Diante deste estudo podemos ter uma visão dos antibióticos mais utilizados nos animais de companhia, no entanto, há marcada diferença em relação a regulação, disponibilidade de mercado, distribuição e utilização de produtos antimicrobianos entre os países. Em muitos países, drogas apenas licenciadas para uso humano são administradas para animais, e produtos veterinários são utilizados em espécies animais em que o fármaco pode ser inapropriado (*off-label use*) (Guardabassi *et al.*, 2010).

### 3.3 RESISTÊNCIA BACTERIANA NA MEDICINA HUMANA E VETERINÁRIA E O RISCO PARA SAÚDE PÚBLICA

Um aumento constante da atenção dedicada ao bem-estar animal, resultando em maiores cuidados veterinários, prevenção e tratamento de doenças infecciosas, traz consequências, pois os agentes antimicrobianos são frequentemente utilizados em animais de companhia, particularmente em medicina canina, incluindo antibióticos licenciados para uso humano e compostos de importância primária no tratamento de infecções humanas (Watson & Rosin, 2000). A situação do uso indiscriminado de antibióticos no tratamento e prevenção de doenças é um problema de saúde pública e animal uma vez que elevadas taxas de resistência a antimicrobianos são relatadas em todo mundo. Esta preocupação levou a Organização Mundial de Saúde (OMS) a considerar a resistência bacteriana como uma das dez principais ameaças à saúde mundial em 2019 (World Health Organization, 2019).

Bactérias humanas transmitidas a animais de estimação podem adquirir genes de resistência através da flora comensal dos animais de estimação e pode ser selecionado por tratamento antimicrobiano nestes animais. Além disso, mesmo no caso de transmissão de bactérias já resistentes de humanos para animais, estes contribuem para a disseminação destas

bactérias adquiridas através das fezes, aumentando, portanto, sua disseminação na população humana e o ambiente (Guardabassi, 2004).

O contato próximo entre animais domésticos e humanos oferece condições favoráveis para a transmissão de bactérias, seja pelo contato entre esses (acariciar, lambar, ferimentos físicos, etc.) ou pelo contato com o ambiente doméstico (contaminação de alimentos, móveis, etc.). As crianças podem correr maior risco que os adultos por causa do contato físico com gatos e cães, bem como um maior contato com ambientes contaminados por animais de estimação (pisos, tapetes, áreas de recreação, etc.).

Outro fator que contribui para o aumento de resistência aos antibióticos é a carência de recursos de diagnóstico laboratorial ou a não utilização destes quando disponíveis. Além disso, muitas vezes os profissionais da área cometem equívocos de conduta e prescrevem antibióticos sem sua devida necessidade. Esse fato associado a sub-dosagens ou suspensão do tratamento quando da melhora clínica do animal, sem observar o tempo correto e indicado da antibioticoterapia, contribuem para o aparecimento da resistência bacteriana (Mota *et al.*, 2005).

O uso empírico de antimicrobianos deve ser evitado, eles devem ser prescritos de preferência com base em diagnóstico laboratorial e teste de suscetibilidade antimicrobiana. Seu uso deve ser sempre baseado na análise do caso clínico, no diagnóstico de uma infecção bacteriana e na seleção de um agente antimicrobiano clinicamente eficaz. Os antimicrobianos devem ser utilizados apenas quando a infecção é bacteriana, uma vez que os vírus não são sensíveis a essa terapia. No entanto, em certas situações, como quando o animal está gravemente doente ou se há um surto com alta mortalidade ou rápida disseminação, a terapia pode ser iniciada com base no diagnóstico clínico (tratamento empírico) (Guardabassi, 2010).

### 3.4 MECANISMOS DE RESISTÊNCIA BACTERIANA

Qualquer uso de antimicrobianos, seja considerado terapêutico ou não, expõe bactérias patogênicas e a microbiota comensal para concentrações variáveis de medicamentos antimicrobianos. Isso cria uma pressão de seleção que pode resultar em emergência de resistência ou, se uma subpopulação resistente está presente, a um aumento de bactérias resistentes (Weese *et al.*, 2015). Uma bactéria é definida como clinicamente resistente a um agente antimicrobiano quando o mesmo, após a administração da dose recomendada, é incapaz de inibir efetivamente o crescimento bacteriano ou causar a morte. Esta definição tem em consideração os parâmetros farmacológicos relevantes para a terapia sistêmica com determinado agente antibiótico e a concentração inibitória mínima (CIM) da bactéria presente (Schwarz *et al.*, 2017).

Dados sugerem que o uso terapêutico de antimicrobianos em várias espécies animais contribui para a resistência antimicrobiana. No entanto, ainda há poucos estudos sobre bactérias resistentes isoladas de animais; por exemplo, sobre contra quais drogas específicas e classes de drogas as bactérias apresentam maior resistência. Neste cenário, os *Staphylococcus* resistentes à meticilina (MRS) seja *S. aureus* (MRSA) ou *S. pseudintermedius* (MRSP) são as bactérias resistentes mais conhecidas e emergentes (Beck *et al.*, 2012; Weese *et al.*, 2012).

Os mecanismos de resistência antimicrobiana podem ser classificados em quatro categorias principais, em que o agente antimicrobiano pode: (1) ser impedido de atingir seu alvo reduzindo sua penetração na célula bacteriana; (2) ser expelido para fora da célula por bombas de efluxo gerais ou específicas; (3) ser inativado por modificação ou degradação, antes ou depois de penetrar na célula; ou (4) ser modificado ou protegido por outra molécula impedindo o acesso do

antibiótico ao seu alvo, de forma que o antimicrobiano não possa mais atuar nele. Alternativamente, o alvo do agente antimicrobiano pode ser dispensado pela aquisição ou ativação de uma via alternativa pelo microrganismo (Giguère *et al.*, 2013).

No contexto da resistência antimicrobiana, as bactérias apresentam três fenótipos fundamentais: suscetibilidade, resistência intrínseca ou resistência adquirida. A resistência intrínseca é natural a todos os membros de um grupo taxonômico bacteriano específico, como um gênero, espécie ou subespécie bacteriana. Este tipo de resistência é mais frequentemente visto através de características estruturais ou bioquímicas inerentes ao microrganismo nativo. Por exemplo, muitas bactérias Gram-negativas são naturalmente resistentes à atividade de macrolídeos, uma vez que essas substâncias químicas são muito grandes para atravessar a parede celular e obter acesso ao seu alvo citoplasmático. Resistência adquirida decorre de alterações genéticas no genoma bacteriano, as quais podem ser uma consequência de mutações ao acaso em genes próprios ou aquisição horizontal de genes exógenos. As bactérias podem adquirir genes de resistência pela captura de DNA (transformação), via bacteriófagos (transdução) ou pela transferência de célula para célula (conjugação). A conjugação é o mais importante mecanismo para a transferência de genes de resistência, devido ao seu vasto espectro de hospedeiros e à localização frequente de genes de resistência em elementos conjugativos como plasmídeos e transposons. Em alguns casos, a resistência pode também resultar da combinação de eventos de mutação e de transferência de genes (por exemplo, resistência a cefalosporina devido à extensão do espectro da  $\beta$ -lactamase) (Giguère *et al.*, 2013; Guardabassi *et al.*, 2010).

A resistência bacteriana aos antibióticos pode resultar da mutação de genes envolvidos em processos fisiológicos normais e estruturas celulares, da aquisição de genes de resistência de outras bactérias ou de uma combinação desses mecanismos. As mutações ocorrem

continuamente, mas com frequência relativamente baixa nas bactérias, levando ao surgimento aleatório ocasional de mutantes resistentes. No entanto, sob condições de estresse (incluindo aquelas encontradas por patógenos quando enfrentam defesas do hospedeiro ou na presença de antimicrobianos), populações bacterianas com frequências de mutação aumentadas podem ser encontradas (Couce & Blázquez, 2009).

### 3.5 RESISTÊNCIA À METICILINA

Antes do advento dos antimicrobianos, pacientes com bacteremia por *S. aureus* tinham uma taxa de mortalidade de até 80% (Skinner & Keefer, 1941). Após a introdução da penicilina G no início da década de 1940, o tratamento de infecções bacterianas melhorou drasticamente, mas cepas resistentes foram identificadas já em 1942 (Rammelkamp & Maxon, 1942). A resistência à penicilina ocorre devido a uma enzima penicilinase/ $\beta$ -lactamase que hidrolisa o anel  $\beta$ -lactâmico e inativa o fármaco (Bondi & Dietz, 1945; Kirby, 1944). Esta enzima é codificada por blaZ, que normalmente reside em um grande transposons plasmideal. Atualmente, a taxa de resistência a penicilina é maior que 90% em *S. aureus* isolados de humanos, tornando o uso de penicilina essencialmente inútil para tratar essas infecções. Em resposta ao surgimento e disseminação da resistência a penicilina foi desenvolvido então um  $\beta$ -lactâmico resistente à penicilinase semissintética chamada meticilina, esta (comercializada como celbenina), foi introduzida na clínica médica em 1959. Logo após, em 1961, ocorreu a primeira descrição de uma cepa de *S. aureus* resistente à meticilina (“methicillin-resistant *S. aureus*”, MRSA) em hospitais no Reino Unido (Barber, 1961; Jevons, 1961). No campo da medicina veterinária, o

primeiro isolamento de uma cepa MRSA foi em 1972 a partir de leite de vacas mastíticas (Devriese, Van Damme & Famaree, 1972).

Em vários lugares do mundo, a MRSA surgiu na década de 1960, incluindo em países onde a meticilina ainda não estava disponível, e agora bactérias MRSA consideradas são ubiqüitárias (Ayliffe, 1997; Chambers, 2009; Grundmann, *et al.* 2006; Moellering, 2012). Historicamente, os estafilococos que apresentam essa resistência a drogas  $\beta$ -lactâmicas são denominados como “resistentes à meticilina”, pois a meticilina era o antibiótico de escolha para ser utilizada em antibiogramas. Desde 2003, se usa a oxacilina em testes de susceptibilidade *in vitro*, visto que a oxacilina é a mais sensível a resistência do que a meticilina, entretanto, o termo “meticilina resistente” é ainda usado (NCCLS, 2003).

A resistência à meticilina foi gerada pela aquisição de *mecA*, um gene que codifica uma proteína de ligação específica à penicilina (PBP2a) com baixa afinidade a todos os  $\beta$ -lactâmicos (penicilinas, cefalosporinas e carbapenemos) (Berger & Rohrer, 2002), frequentemente a primeira linha em medicina veterinária (Weese & van Duijkeren, 2010; Kadlec & Schwarz, 2012; Shore & Coleman, 2013; Becker *et al.*, 2014).

A transcrição do gene *mecA* é controlada pelos elementos reguladores *mecI* e *mecR1*. Acredita-se que *MecR1* seja uma proteína de transdução de sinal com domínio extracelular de ligação à penicilina que detecta a presença de  $\beta$ -lactâmicos e ativa seu domínio citoplasmático (Zhang *et al.*, 2005).

O gene *mecA* e seu sistema regulatório são encontrados em um elemento genético móvel chamado cromossomo *Staphylococcal Cassette Mec* (SCCmec) que se integra no cromossomo bacteriano (Ito *et al.*, 2001). Um cassete SCCmec, possui dois componentes genéticos essenciais,

contém um complexo genético recombinase (*ccr*) e um complexo gene *mec*, que contém o gene *mecA* (Zhang *et al.*, 2005; Ito *et al.*, 2009). O complexo gênico *ccr* é responsável pela inserção e excisão do SCC*mec* ao cromossomo hospedeiro, ou seja, promove sua motilidade. O complexo *mec* é composto pelos genes IS431 *mec*, *mecA* e genes regulatórios intactos ou truncados, chamados de *mecR1* e *mecI* (Zhang *et al.*, 2005). Genes adicionais com uma variedade de funções também podem estar presentes, tais como transposons, elementos IS, sistemas de modificação de restrição e genes de resistência contra metais (Ito *et al.*, 2009).

Em 2011, foi descrito um gene homólogo ao gene *mecA*, denominado gene *mecC*, encontrado em isolados MRSA de humanos e bovinos (García-Álvarez *et al.*, 2011; Shore *et al.*, 2011; Ito *et al.*, 2012). Este gene está bastante disseminado entre animais de produção, domésticos e selvagens (Becker *et al.*, 2014), mas a prevalência em isolados MRSA de humanos é baixa (Shore & Coleman, 2013). Isso poderá ser devido a dificuldades na detecção deste gene, pois alguns isolados MRSA com *mecC* apresentam baixas concentrações inibitórias mínimas para a oxacilina e cefoxitina (podendo mesmo alguns serem suscetíveis) (Paterson *et al.*, 2012; Shore & Coleman, 2013; Becker *et al.*, 2014). Além disto, as reações de PCR para detecção de *mecA* não detectam *mecC*, sendo necessário um PCR específica para este gene (Becker *et al.*, 2014).

Desde a década de 80, tem sido também descrito na medicina veterinária o *S. pseudintermedius* resistente à meticilina (MRSP). Esta resistência também é conferida pelo gene *mecA*, assim como no *S. aureus*. Estes microrganismos apresentam grande relevância na clínica médica de pequenos animais por se tratarem de bactérias residentes da pele de cães e responsáveis por infecções oportunistas. Infecções por MRSP têm sido associadas a surtos em clínicas veterinárias e as cepas de MRSP são frequentemente resistentes contra múltiplas classes

de antimicrobianos, o que tornar-se um desafio o tratamento dessas infecções (Weese & van Duijkeren, 2010; Loeffler, 2007; Beck *et al.*, 2012; Miller *et al.*, 2013).

O sequenciamento do gene *mecA* de *S. pseudintermedius* revelou um alto grau de homologia (95–100%) com o gene *mecA* de *S. aureus*, sugerindo transferência horizontal do gene ou aquisição de uma fonte comum (por exemplo, *Staphylococcus* sp.). Análises filogenéticas de isolados MRSP sugerem que o gene *mecA* foi introduzido por esta espécie estafilocócica em múltiplas ocasiões e em vários continentes diferentes (Berg & Wendell, 1984).

### 3.6 MRSA E MRSP RESISTENTES A OUTRAS CLASSES DE ANTIMICROBIANOS

Os MRS frequentemente carregam corresponsabilidade a muitos outros medicamentos não  $\beta$ -lactâmicos, incluindo clindamicina, fluoroquinolonas, macrolídeos, tetraciclina, trimetoprim e sulfonamidas. No estudo de Bemis *et al.* (2009), mais de 90% dos isolados de MRSP também foram resistentes a mais de quatro outras drogas. A causa do aumento da frequência da resistência não foi identificada, mas o uso de fluoroquinolonas e cefalosporinas tem sido associado ao surgimento de resistência a MRS (Dancer, 2008; Harbarth & Samore, 2008).

Entre as resistências a outras classes de antibióticos os estafilococos podem apresentar resistência às tetraciclina que pode ser mediada por genes de plasmídeos (*tetK* ou *tetL*) que codificam para efluxo de antimicrobianos, ou pelo cromossomo ou genes *tetM* ou *tetO* situados no transposons, que codificam para alteração do ribossomo local alvo antimicrobiano (Trzcinski *et al.*, 2000). Em isolados de MRSP, os genes *tetK* e *tetM* parecem ser importantes mediadores



de resistência (Perreten *et al.*, 2010), entretanto, faltam estudos para saber sua abrangência em animais.

Já a resistência estafilocócica às fluoroquinolonas pode ser mediada por mutações cromossômicas nos genes que codificam a DNA girase e TP- IV. Ambas as enzimas contêm duas subunidades: a DNA girase é composta por GyrA e GyrB (codificado pelos genes *gyrA* e *gyrB*, respectivamente) e o TP-IV é composto por GrlA e GrlB (codificado pelos genes *grlA* e *grlB*, respectivamente). Em *S. aureus*, mutações que codificam para aminoácidos, substituições em GyrA e GrlA, e subsequente resistência à fluoroquinolona, ocorrem com mais frequência nas regiões determinantes da resistência à quinolona bem conservada dos genes *gyrA* e *grlA* (Lin, 2007; Entorre, 2007). Em isolados veterinários de MRSA e MRSP resistentes às fluoroquinolonas foram demonstradas mutações nos genes que codificam a DNA girase e a topoisomerase IV (Onuma, 2011; Descloux, 2008; Lin, 2007; Intorre, 2007).

Por sua vez, a resistência aos macrolídeos e antimicrobianos relacionados a lincosamidas, incluindo a clindamicina, pode ser transmitida pelo gene estafilocócico *msrA*, que codifica para o efluxo de antimicrobianos, ou os genes *erm*, que codificam para alterações no local alvo antimicrobiano ribossômico. Para tratar infecções por MRSA e MRSP em cães e gatos, a clindamicina pode ser selecionada devido à sua ampla e eficaz atividade antimicrobiana. No entanto, uma forma induzível de resistência à clindamicina pode estar presente em alguns estafilococos. Essas cepas estafilocócicas parecem suscetíveis nos testes de rotina de sensibilidade antimicrobiana, mas a resistência pode ser induzida durante o tratamento, possivelmente resultando em falha do tratamento (Swenson *et al.*, 2007; Yilmaz *et al.*, 2007). A resistência à clindamicina codificada pelos genes *erm* pode ser constitutiva, na qual é conferida resistência a todos os medicamentos nessas classes relacionadas (isto é, eritromicina e

clindamicina), ou induzível, na qual a presença de um agente indutor (por exemplo, eritromicina) promove a expressão de um fenótipo resistente (Rich, 2005; Faires, 2009). A resistência induzível à clindamicina foi documentada em isolados de MRSA de humanos e animais e foi relatada em alguns isolados de MRSP (Perreten, 2010; Rich, 2005; Faires, 2009; Rubin, 2011).

### 3.7 IDENTIFICAÇÃO DOS MRSA E MRSP

A diferenciação dos *S. aureus* dos *S. pseudintermedius* é dificultada na rotina microbiológica, pois as duas espécies compartilham de características bioquímicas idênticas, como a capacidade de produzir coagulase (Kloos *et al.*, 1976; Börjesson *et al.*, 2015). Como pode-se observar no Quadro 1, uma diferença entre as duas espécies que podemos observar é que *S. aureus* é resistente a polimixina enquanto *S. pseudintermedius* é sensível, o que pode ser um teste prático para uma triagem na diferenciação entre eles.

Os métodos de identificação tradicionais baseados nas características fenotípicas, como: características das colônias, reações bioquímicas e teste de suscetibilidade a antibióticos, têm sido utilizados há bastante tempo (Sabat *et al.*, 2013). Contudo, os métodos moleculares, por permitirem uma melhor discriminação entre isolados quando comparados aos testes fenotípicos são cada vez mais utilizados (Faria *et al.*, 2008). Os métodos moleculares mais utilizados em *Staphylococcus* spp. resistentes à metilina são a eletroforese em gel de campo pulsado, sequenciamento de múltiplos *loci*, tipagem *spa* e tipagem *SCCmec*, entretanto estes métodos se tornam mais onerosos na rotina clínica.

Quadro 1. Características que diferenciam *S. pseudintermedius* de outras espécies de *Staphylococcus* coagulase-positivas e relacionadas.

Características	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Aerobiose	+	-	+	+	+	+	+	+	+
Catalase	+	+	-	+	+	+	+	+	+
Diametro da colônia > 5mm	+	+	-	+	+	-	+	+	+
Pigmento	-	+	-	-	-	-	-	-	-
Coagulase	+	+	+	+	D-	-	+	+	+
Clumping factor	-	+	-	D	-	+	-	-	-
DNase	+	+	+	+	+	+	+	-	+
Hemólise	+	+	+	+	-	+	+	+	+
β-hemólise	+	D	+	+	-	+	ND	ND	+
Teste de Voges-Proskauer	+	+	-	W	-	+	+	-	-
Pirrolidonil arilamidase	+	-	-	+	-	+	D	ND	ND
Produção ácida:									
Maltose	+	+	+	-/w	-	-	D	+	+
Sacarose	+	+	+	+	+	-	-	+	ND
D-trealose	+	+	-	+	D+	D	-	-	+
D-xylose	-	-	-	-	-	-	-	-	+
Sensibilidade à:									
Acriflavina	+	-	ND	+	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)
Polimixina	+	-	ND	+	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)

As classes são representadas pela seguinte numeração, 1: *S. pseudintermedius* sp. nov.; 2: *S. aureus* subsp. *aureus*; 3: *S. aureus* subsp. anaeróbio; 4: *S. intermedius*; 5: *S. hyicus*; 6: *S. schleiferi* subsp. *schleiferi*; 7: *S. schleiferi* subsp. *coagulans*; 8: *S. Delphini*; 9: *S. lutrae*. As características são pontuadas da seguinte forma: D, dependente de tensão; D+, geralmente positivo; D-, geralmente negativo; ND, não determinado; W, fraco; os resultados mostrados entre parênteses foram testados com a cepa do tipo no presente estudo. Fonte: Luc *et al.* (2005).

#### **4 RESULTADOS E DISCUSSÃO**

Os resultados desta dissertação estão apresentados na forma de artigo científico intitulado:

**“Resistência antimicrobiana de *Staphylococcus* spp. isolados de cães e gatos da Região da Serra Gaúcha, Rio Grande do Sul, Brasil”.**

**“Resistência antimicrobiana de *Staphylococcus* spp. isolados de cães e gatos da Região da Serra Gaúcha, Rio Grande do Sul, Brasil”.**

RESUMO

A resistência antimicrobiana é considerada uma das principais ameaças globais a saúde mundial. Entre as bactérias que frequentemente apresentam resistência estão as *Staphylococcus* resistente à meticilina (MRS), sejam elas *S. aureus* (MRSA) ou *S. pseudintermedius* (MRSP). Elas são bactérias comuns resistentes a múltiplas drogas (multirresistentes), podendo estar presentes em animais e humanos causando infecções de difícil tratamento. Além do mais há possibilidade de transmissão entre humanos e animais, devido ao contato próximo entre os mesmos. Portanto, o objetivo deste estudo foi conhecer a resistência antimicrobiana de *Staphylococcus* spp. isolado de cães e gatos da Região da Serra Gaúcha, Rio Grande do Sul, Brasil. Para isto, swabs de diferentes regiões do corpo de 90 animais (cães e gatos) foram coletados e analisados. A partir de isolamento bacteriano, foi possível identificar 94 isolados de *Staphylococcus* sp., sendo que 38,2% destes isolados eram bactérias multirresistentes, 22,4% eram resistentes a meticilina (MRS) e 24,4% eram multirresistentes sem a presença de resistência à meticilina. Conclui-se que bactérias MRS e multirresistentes estão presentes em cães e gatos da Serra Gaúcha em uma frequência preocupante.

**Palavras-chave:** resistência, *Staphylococcus pseudintermedius*, *Staphylococcus aureus*, meticilina.

## **ABSTRACT**

Antimicrobial resistance is considered one of the main global threats to global health. Among the bacteria that often show resistance are methicillin-resistant *Staphylococcus* (MRS), whether they are *S. aureus* (MRSA) or *S. pseudintermedius* (MRSP). They are common bacteria resistant to multiple drugs (multi-resistant), and can be present in animals and humans causing infections that are difficult to treat. Furthermore, there is a possibility of transmission between humans and animals, due to close contact between them. Therefore, the aim of this study was to understand the antimicrobial resistance of *Staphylococcus* spp. isolated from dogs and cats in the Serra Gaúcha Region, Rio Grande do Sul, Brazil. For this, Swabians from different regions of the body of 90 animals (dogs and cats) were collected and analyzed. From bacterial isolation, 94 *Staphylococcus* sp. methicillin resistance. It is concluded that MRS and multiresistant bacteria are present in dogs and cats of Serra Gaúcha in a worrying frequency.

**Keywords:** resistant, *Staphylococcus pseudintermedius*, *Staphylococcus aureus*, methicillin.

## Introdução

A resistência antimicrobiana é considerada uma das dez principais ameaças globais a saúde mundial, segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS, 2019). A principal causa do aumento na resistência em bactérias patogênicas é o aumento do uso de antibióticos tanto em animais como em humanos (Fedesa, 2000). A transferência horizontal de genes de resistência pode ocorrer entre bactérias transmitidas de humanos a animais ou de animais a humanos (Guardabassi, 2004).

*Staphylococcus aureus* e *Staphylococcus pseudintermedius* estão recebendo atenção na medicina humana e veterinária devido ao aumento de relatos de resistência à meticilina. Os animais de estimação vêm sendo considerados reservatórios de *S. aureus* resistente à meticilina (MRSA) em casos de infecções humanas refratárias ou recorrentes (Loeffler & Lloyd, 2010). Além disso, também há relatos de seres humanos colonizados por *S. pseudintermedius* resistente à meticilina (MRSP) (Guardabassi *et al.*, 2004; Frank & Loeffler, 2012).

Os *Staphylococcus* resistentes à meticilina (MRS) possuem o gene *mecA*, que codifica uma proteína de ligação específica à penicilina (PBP2a) com baixa afinidade a todos os  $\beta$ -lactâmicos (penicilinas, cefalosporinas e carbapenemos) (Berger, 2002). Importaneamente, esta classe de antimicrobianos é opção de primeira escolha no tratamento de várias doenças infecciosas em medicina veterinária (Louis *et al.*, 2010).

O gene *mecA* e seu sistema regulatório são encontrados em um elemento genético móvel chamado cromossomo *Staphylococcal Cassette Mec* (SCCmec) que se integra no cromossomo (Ito *et al.*, 2001). SCCmec pode conter outros importantes genes de resistência (IWG-SCC, 2013), surgindo assim uma corresponsabilidade a outras classes de antibióticos comumente utilizadas.

Há vários estudos que mostraram uma maior frequência de cepas MRSP resistentes a muito mais classes de antibióticos que as cepas MRSA (Paul *et al.*, 2011; Couto *et al.*, 2011), tornando o tratamento das infecções provocadas por MRSP um importante desafio terapêutico. A transferência de genes de resistência pode envolver espécies patogênicas, bem como membros da microbiota normal originários dos dois hospedeiros (Guardabassi, 2004).

Diante disso nos preocupamos com transmissão dos genes de resistência entre bactérias de humanos e animais de companhia, visto que atualmente existe uma grande proximidade interespecies. Para obtermos mais conhecimento sobre a presença de bactérias resistentes em nossa região, este estudo avaliou a resistência antimicrobiana de *Staphylococcus* spp. isolados de cães e gatos da Região da Serra Gaúcha, Rio Grande do Sul, Brasil. Além de traçar o perfil epidemiológico de animais colonizados por *Staphylococcus* spp. resistentes e fatores de risco para a transmissão entre animais e humanos de genes de resistência.

## **Material e métodos**

### **Animais**

Amostras foram coletadas de 90 animais (66 caninos e 24 felinos) no período de novembro de 2018 a abril de 2019 na região da Serra Gaúcha (Rio Grande do Sul, Brasil). Os animais eram provenientes de um projeto de esterilização realizado pela Universidade de Caxias do Sul, portanto, eram todos, aparentemente, saudáveis. Animais atendidos em clínicas veterinárias também foram amostrados. As amostras foram coletadas após o consentimento e assinatura do termo de autorização pelos tutores dos animais. O estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética no Uso de Animais da Universidade de Caxias do Sul, de acordo com os



preceitos da Lei n. 11.794 de 08 de outubro de 2008 e do Decreto n. 6.899 de 15 de julho de 2009.

Foram coletados suabes de cinco pontos diferentes de cada animal, sendo eles: pele, ouvido, perianal, axila, nasal; totalizando 450 suabes. No procedimento, os suabes estéreis foram gentilmente passados em cada região e imediatamente armazenados em meio de conservação e transporte Stuart, devidamente identificados para cada animal. Após a coleta, as amostras foram mantidas sob refrigeração por um período máximo de 48 horas, até sua chegada ao laboratório para processamento.

A fim de obter-se maiores informações epidemiológicas um questionário foi aplicado aos tutores, com perguntas referentes ao convívio dos animais com seus tutores, uso de medicamentos, doenças anteriores, número de indivíduos residentes na casa, entre outras, que estão descritas na Tabela 2.

### **Isolamento e identificação bacteriana**

Os suabes foram semeados em placas contendo ágar sangue e incubados por 24 horas a temperatura de 37°C. As colônias com morfologia compatível com *Staphylococcus* foram repicadas em ágar manitol para isolamento por mais 24 horas de cultivo a 37°C. Após crescimento em ágar manitol, os isolados foram corados pela técnica de Gram para análise morfológica.

Os testes de coagulase foram realizados com plasma de coelho liofilizado (Newprov®), onde uma colônia de bactéria foi suspensa em meio BHI líquido e adicionada 10 µl da suspensão a um microtubo contendo 100 µl de plasma de coelho. Após 4 horas de incubação em estufa a 37°C foi realizada a primeira análise de coagulação e a última análise foi realizada em

24 horas de incubação. O teste de catalase foi realizado a partir da reação de uma colônia de bactéria com uma gota de peróxido de hidrogênio (10%) sob uma lâmina, as amostras que formavam borbulhamento foram consideradas catalase positivas.

Para diferenciar *S. aureus* de *S. pseudintermedius*, os isolados foram submetidos a teste de susceptibilidade a polimixina pelo método de difusão de discos (conforme descrito abaixo). *Staphylococcus* resistentes foram classificados como *S. aureus* e os sensíveis como *S. pseudintermedius*.

### **Testes de susceptibilidade a antibióticos**

Os testes de susceptibilidade aos antibióticos foram realizados pelo método de difusão de discos em ágar Muller-Hinton de acordo com o *Clinical and Laboratory Standard Institute* (CLSI, 2019). Após o isolamento, as amostras foram inoculadas em solução salina até obtenção de grau de turbidez de 0,5 na Escala de McFarland. Assim, por meio de haste de algodão estéril o material foi estriado em toda a extensão da placa de ágar Mueller-Hinton para a realização do antibiograma. Após foram distribuídos os discos de antimicrobianos, onde foi testado além da resistência à meticilina, suscetibilidade a mais cinco classes de antibióticos sendo elas: sulfonamidas, aminoglicosídeos, tetraciclina, quinolonas, macrolídeos, para isso foram utilizados os seguintes discos de antibióticos: polimixina (300UI), oxacilina (1µg), eritromicina (15µg), penicilina G (10UI), azitromicina (15µg), amoxicilina + ác. clavulânico (20/10µg), enrofloxacina (5µg), sulfadiazina+timetropin (1,25µg/23,75µg), ceftriaxona (30µg), neomicina (30mcg), tetraciclina (30µg) e gentamicina (10µg). Após incubação por 24 horas em estufa a 37°C, foi realizada a leitura em milímetros do diâmetro dos halos de inibição formados. A

classificação das bactérias em resistentes ou suscetíveis foi realizada conforme sugerido pela CLSI (2019).

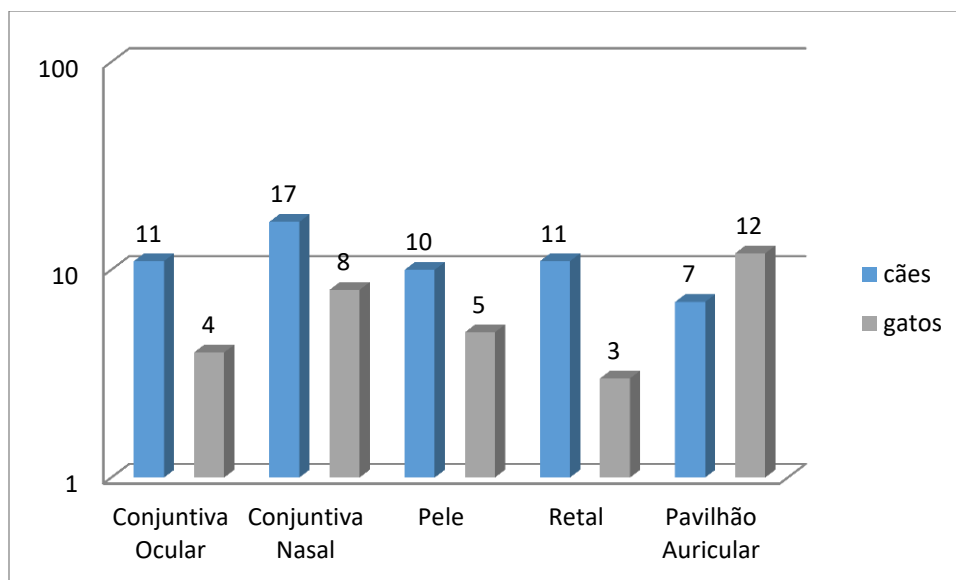
### **Análise estatística**

Os dados foram analisados usando a correlação de Pearson para avaliar diferenças entre animais e tutores com distintos históricos, hábitos e comportamentos. Todas as análises foram realizadas no pacote estatístico IBM SPSS Versão 20.

## **RESULTADOS**

Um total de 94 isolados (60 em cães e 34 em gatos) de *Staphylococcus* spp. foram identificados de 57,8% dos animais (52/90), sendo 38 de cães e 14 de gatos. Cerca de 86,2% (81/94) dos isolados consistiam em *Staphylococcus pseudintermedius* e 13,8% (13/94) em *Staphylococcus* spp. coagulase-negativas.

A região do corpo dos cães e gatos (Figura 1) que apresentou o maior número de isolados bacterianos foi a conjuntiva nasal 17,8% e o pavilhão auricular 14,2%, respectivamente. Entretanto, em cães o pavilhão auricular foi a região que apresentou a menor frequência de isolados (8,33%). Em gatos, as regiões com a menores frequências de isolados foram a região perianal e conjuntiva ocular, ambas com apenas 3,75%.



**Figura 1. Frequência de isolamento de *Staphylococcus* spp. por região do corpo em cães e gatos coletados.**

Dos 94 isolados de *Staphylococcus* sp. da população geral entre caninos e felinos, 38,2% foram classificados como multirresistentes e 22,4% como resistentes à metilina. Ao observar o perfil de resistência por espécie bacteriana, pode-se classificar 14,9% de isolados como *Staphylococcus pseudintermedius* resistente a metilina (MRSP), 7,5% *Staphylococcus* sp. coagulase-negativa resistentes à metilina (MRS) (Tabela 1). Das amostras resistentes à metilina, 57,1% foram multirresistentes, resistente a duas classes ou mais de antibióticos, enquanto os *Staphylococcus* spp. sensíveis a todos antimicrobianos compreenderam 52,2% dos isolados.

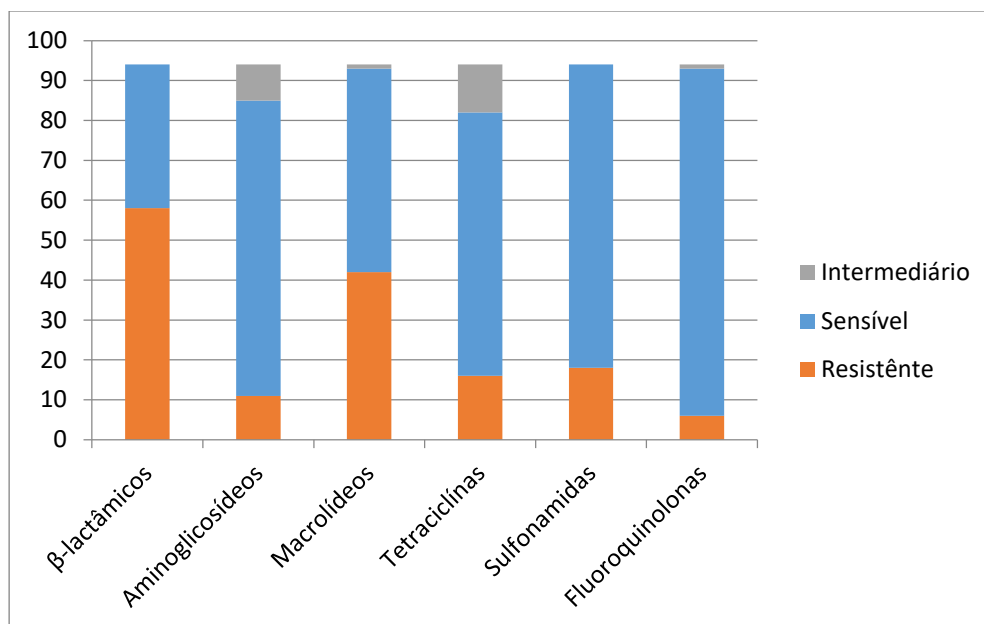
Tanto os *Staphylococcus* spp. que foram resistentes à metilina (n=20), quanto aqueles que foram multirresistentes (n=33), foram isolados principalmente da conjuntiva ocular (28,3%, 15/53) e conjuntiva nasal (26,4%, 14/20) de cães e gatos. A frequência da espécie de estafilococos e de tipo de resistência foram similares entre ambas espécies estudadas.

**Tabela 1. Bactérias isoladas em cães e gatos e classificação conforme espécie bacteriana e resistência aos antibióticos.**

<b>Espécie bacteriana, resistência e número de isolados</b>	<b>Total (n= 94)</b>	<b>Cães (n=60)</b>	<b>Gatos (n=34)</b>
<i>S.pseudintermedius</i>	<b>86,20%</b>	<b>88,30%</b>	<b>82,30%</b>
Sensível	47,90	48,30	47,10
MRSP	6,4	6,70	5,90
MRSP/multirresistente	8,50	8,30	8,80
Multirresistente	23,40	25,0	20,50
<i>Staphylococcus sp. coagulase-negativa</i>	<b>13,80%</b>	<b>11,70%</b>	<b>17,70%</b>
Sensível	4,30	3,30	5,90
MRS	3,20	1,80	5,90
MRS/multirresistentes	4,30	3,30	5,90
Multirresistente	2,00	3,30	0
<b>Total</b>	<b>100,00%</b>	<b>100,00%</b>	<b>100,00%</b>

Legenda: MRSP (*S. pseudintermedius* resistente à metilicina), MRS (*Staphylococcus sp.* resistente à metilicina) Multirresistentes (Resistentes a duas ou mais classes de antibióticos).

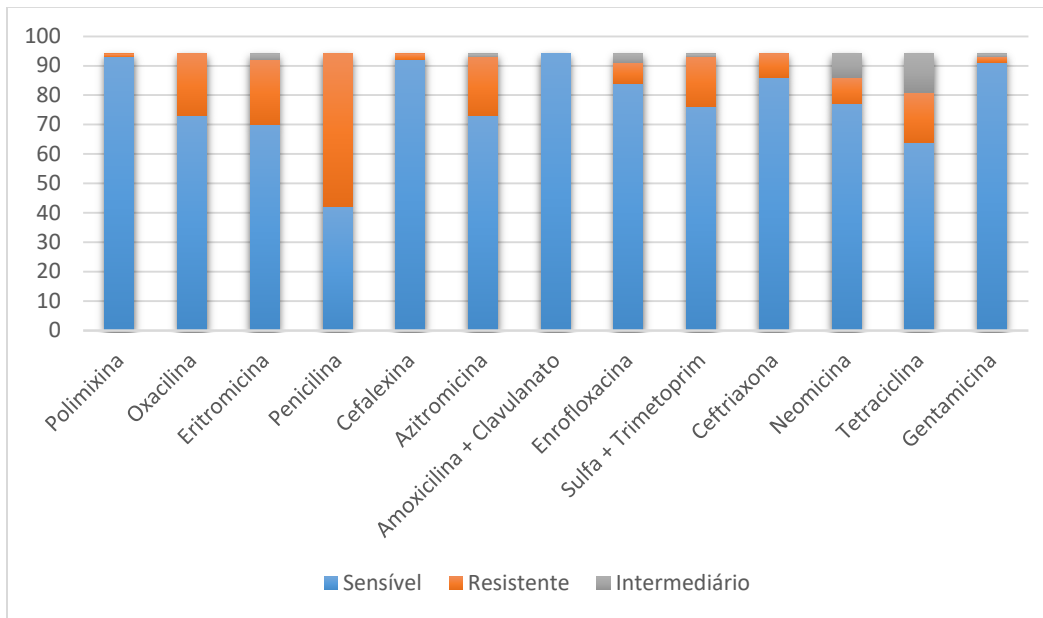
As classes de antibióticos testadas foram avaliadas conforme resistência demonstrada na Figura 2. Pode se observar que as maiores frequências de resistência foram contra os  $\beta$ -lactâmicos em 61,7% (58/94) dos isolados, seguido dos macrolídeos em 44,6% (42/94).



**Figura 2. Resistência bacteriana conforme as classes de antibióticos**

Classes de antimicrobianos:  $\beta$ -lactâmicos (penicilina, ceftriaxona, oxacilina), aminoglicosídeo (gentamicina, neomicina), macrolídeos (azitromicina, eritromicina), tetraciclínas (tetraciclina), quinolonas (ciprofloxacina), sulfonamidas (sulfametoxazol + trimetoprima) e fluoroquinolonas (enrofloxacina).

Quando avaliado a resistência a cada antibiótico, observou-se que resistência a seis antibióticos estava presente em pelo menos 18% dos isolados (Figura 3). Resistência à penicilina foi a mais frequente nos isolados (55,3%), seguido de resistência à eritromicina (23,4%) e à oxacilina (22,3%). No entanto, apenas o antibiótico amoxicilina + ác. clavulânico não apresentou nenhuma isolado resistente, contudo este antibiótico é um  $\beta$ -lactâmico que pode conferir resistência as amostras resistentes à oxacilina.



**Figura 3. Resistência bacteriana aos diferentes antibióticos testados no antibiograma das amostras isoladas.**

### Dados epidemiológicos

Com o questionário aplicado aos tutores (Tabela 2) foi possível observar que grande parte dos animais vivia dentro de casa, eram vacinados e vermifugados.

A maioria dos animais que tiveram isolados de *Staphylococcus* spp. resistentes à meticilina ou multirresistentes nunca foram tratados com antibióticos e conviviam com outros animais na casa. Dos animais que já tinham sido tratados com antibiótico, em apenas um foi escolhido o antibiótico com base em diagnóstico laboratorial.

**Tabela 2. Questionário para inquérito epidemiológico considerando o convívio dos animais com seus tutores e a presença de *Staphylococcus* spp. e resistência.**

	MRS	Multirresistentes	Sensíveis/sem crescimento	Total
Vive no patio	8	11	24	43
Vive dentro de casa	9	16	33	58
Vive na rua	2	1	12	15
NR/outro	3	1	4	8
<b>Dorme com tutores?</b>				
Não	8	11	39	58
Sim	2	6	13	21
Às vezes	6	5	9	20
NR	1	1	1	3
<b>Vacinado?</b>				
Não	9	12	22	43
Sim	7	9	30	46
NR/outro	1	2	10	13
<b>Vermifugado?</b>				
Não	6	8	10	24
Sim	9	14	45	68
NR/outro	2	1	7	10
<b>Tratamento com antibióticos?</b>				
Não	12	15	45	72
Sim	4	7	14	25
NR/outro	1	1	3	5
<b>Já selecionou o melhor antibiótico?</b>				
Não	14	19	55	88
Sim	1	1	3	5
NR/outro	2	3	4	9
<b>Perda de algum animal na residência no último ano?</b>				
Não	13	16	43	72
Sim	3	7	17	27
NR/outro	1	0	2	3
<b>Há recém-nascidos residência? (até 1 mês de idade)</b>				
Não	16	22	60	98
Sim	0	0	1	1
NR/outro	1	1	1	3
<b>Há bebês na residência? (1 a 17 meses de</b>				



<b>idade)</b>				
Não	15	21	60	96
Sim	1	1	1	3
NR/outro	1	1	1	3
<b>Há crianças na residência? (18 meses a 17 anos de idade)</b>				
Não	12	18	42	72
Sim	3	3	19	25
NR/outro	2	2	1	5
<b>Há idosos na residência? (60 ou mais anos de idade)</b>				
Não	12	17	49	78
Sim	3	5	12	20
NR/outro	2	1	1	4
<b>Há outros animais na residência?</b>				
Não	8	9	16	33
Sim	8	13	45	66
NR/outro	1	1	1	3
<b>Houve casos de infecção respiratória/conjuntivite/gastroenterite/e tc. no último ano em indivíduos na residência?</b>				
Não	16	22	49	87
Sim	0	0	12	12
NR/outro	1	1	1	3
<b>Houve hospitalização prolongada de indivíduos nos últimos três meses (mais de 7 dias)</b>				
Não	16	22	59	97
Sim	0	0	2	2
NR/outro	1	1	1	3
<b>Foram realizados procedimentos cirúrgicos nos últimos três meses? (no tutor)</b>				
Não	16	22	61	99
Sim	0	0	0	0
NR/outro	1	1	1	3
<b>Houve terapia com ATM nos últimos três meses (no tutor)</b>				
Não	15	17	16	48
Sim	1	5	45	51
NR/outro	1	1	1	3
<b>Evidenciou presença de alguma lesão dermatológica nos últimos três meses? (no tutor)</b>				

Não	16	2/2	57	95
Sim	0	0	4	4
NR/outro	1	1	1	3
<b>Há na família parente com doença imunossupressora?</b>				
Não	16	21	61	98
Sim	0	1	0	1
NR/outro	1	1	1	3

MRS: Resistentes a meticilina; Multirresistência: duas classes ou mais de antibióticos. NR/outro: não responderam, ou resposta não está nas alternativas. Nenhum dos dados foi estatisticamente significante ( $p < 0,005$ ).

## DISCUSSÃO

Das 94 amostras isoladas de *Staphylococcus* spp. 22,4% tinham resistência à meticilina, considerando o total de animais coletados tivemos uma média de 18,8% de animais positivos para *Staphylococcus* resistentes à meticilina (17/90). Tivemos 7,5% das amostras isoladas *Staphylococcus* coagulase-negativa resistentes à meticilina. Os *Staphylococcus* coagulase-negativa (CoNS) apesar de possuírem menos fatores de virulência comparativamente aos *Staphylococcus* coagulase-positiva (CoPS), possuem mais variantes genéticas resistentes à meticilina, principalmente *S. epidermidis* e *S. haemolyticus* (Becker *et al.*, 2014). Pouco tempo após a introdução da meticilina, cerca de 10% dos isolados de *S. epidermidis* apresentava resistência à mesma. Atualmente, a grande maioria das amostras clínicas de CoNS isolados possui SCCmec, tendo os CoNS um importante papel como reservatórios destes elementos genéticos para espécies de *Staphylococcus* clinicamente importantes (Becker *et al.*, 2014).

Embora vários estudos tenham examinado a prevalência de MRSA e MRSP entre os animais de companhia, estes estudos são em sua maioria realizados através de isolados de lesões de pele e outras infecções causadas por *Staphylococcus* spp. Já estudos focados na colonização de apenas

animais saudáveis (sem sinais clínicos) que mantêm contato próximo diário com seus donos ainda são escassos. Gingrich *et. al.* (2011), em um estudo em animais de abrigo no Colorado, EUA verificaram uma prevalência de 3% de MRSP e 0,5% de MRSA em cães. Na Eslovênia, Vengust *et.al.* (2006) observaram que 1,5% dos cães saudáveis estavam colonizados por MRSP e nenhum por MRSA foi encontrado. Estes estudos coincidem com o presente trabalho, onde não encontramos MRSA na população canina saudável, ainda que tenha sido identificado uma média de MRSP mais elevada.

Das amostras resistentes à meticilina 57,1% foram multirresistentes, ou seja, resistentes a pelo menos duas classes de antibióticos, concordando com estudos anteriores, que relatam que SCCmec pode conter outros importantes genes de resistência (IWG-SCC, 2013), surgindo assim uma corresponsabilidade a outras classes de antibióticos comumente utilizadas. Curiosamente, isolados mecA-positivos devem ser resistentes a todas as penicilinas, cefalosporinas, carbapenêmicos e cefalosporinas, independentemente dos resultados dos testes de suscetibilidade *in vitro* obtidos com esses agentes (CLSI, 2013). Neste, todas as amostras apresentaram sensibilidade *in vitro* ao antimicrobiano  $\beta$ -lactâmico amoxicilina + ácido clavulânico, até mesmo os *Staphylococcus* resistentes à meticilina. Acredita-se que isso pode ter ocorrido devido a uma fraca expressão de mecA na presença de  $\beta$ -lactamases distintas (oxacilina e ceftioxime).

O contato próximo entre animais domésticos e humanos oferece condições favoráveis para a transmissão de bactérias por contato direto ou através do ambiente doméstico (Mota *et al.*, 2005). Embora não tenha apresentado uma significância estatística, em nosso estudo evidenciamos que grande parte dos animais portadores de multirresistência vivem dentro das residências e possuem contato próximo com seus tutores. Apesar de não evidenciar confiança estatística, é preocupante o número de animais que foram positivos para *Staphylococcus* spp.

resistentes a meticilina que dormiam com seus tutores, na maioria destes casos também há outros animais na residência, o que pode ocasionar o transporte de genes de resistência de um animal para outro e entre humanos e animais (Guardabassi *et al.*, 2004). A transferência de genes de resistência pode envolver espécies patogênicas, bem como membros do microbiota dos dois hospedeiros.

Destaca-se que entre os 33 animais que já tiveram tratamento com antimicrobianos, apenas quatro realizaram exames para selecionar o melhor fármaco, evidenciando, assim, que o tratamento empírico vem sendo realizado na prática veterinária. Preocupantemente, esta prescrição baseada empiricamente em sinais e sintomas sem fundamentação em testes de suscetibilidade é um dos principais desencadeadores de patógenos resistentes em ambientes hospitalares (Menezes *et al.* 2017).

Por sua vez, as bactérias *Staphylococcus aureus* são colonizadoras conhecidas de felinos saudáveis, entretanto, sua incidência pode sofrer grandes variações conforme estudos. Abraham *et al.* tiveram em um estudo a colonização de *S. aureus* confirmada em 34% dos gatos clinicamente saudáveis, dados bastante diferentes de Bierowiec *et al.* (2016) em que a prevalência de MRSA foi de 7% dos gatos saudáveis. trabalho não obtivemos nenhuma amostra de MRSA. Entretanto uma conformação por métodos moleculares necessita ser realizada para ofertar maior especificidade.

Em conclusão, neste estudo foi identificado uma elevada incidência de cães e gatos saudáveis colonizados por MRSP e apresentando multirresistência na Região da Serra Gaúcha, o que pode ser decorrente do uso de antimicrobianos em animais domésticos. Destaca-se também que animais com contato mais próximo com tutores apresentam maior propensão à aquisição de

multirresistência. Assim, o contato próximo entre os animais de companhia e seus tutores pode desencadear a transmissão de genes de resistência entre humanos e animais.

## REFERÊNCIAS

Becker, K., Ballhausen, B., Köck, R. & Kriegeskorte, A. (2014). Methicillin resistance in *Staphylococcus* isolates: The “*mec* alphabet” with specific consideration of *mecC*, a *mec* homolog associated with zoonotic *S. aureus* lineages. *International Journal of Medical Microbiology*, 304, 794-804.

Berger-Bachi B.; Rohrer S.; (2002) Factors influencing methicillin resistance in staphylococci. *Arch Microbiol*; 178: 165–171.

Bierowiec, K.; Płoneczka-Janeczko, K.; & Rypuła, K. (2016). Prevalence and Risk Factors of Colonization with *Staphylococcus aureus* in Healthy Pet Cats Kept in the City Households. *BioMed Research International*, 1–10.

Clinical and Laboratory Standards Institute. (2013) Performance standards for antimicrobial disk and dilution susceptibility tests for bacteria isolated from animals; approved standards – fourth edition. CLSI VET01-A4. Wayne, PA: CLSI.

Clinical and Laboratory standards Institute (2019). Performance standards for antimicrobial susceptibility testing. *CLSI supplement M100*. 29, 58.

Couto, N., Pombo, C., Moodley, A. & Guardabassi, L. (2011). Prevalence of methicillin-resistant staphylococci among dogs and cats at a veterinary teaching hospital in Portugal. *Veterinary Record*, 169(3), 1-2.

The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. (2016). Breakpoint tables for interpretation of MICs and zone diameters. Version 6.0, Available at: [http://www.eucast.org/fileadmin/src/media/PDFs/EUCAST\\_files/Breakpoint\\_tables/v\\_6.0\\_Breakpoint\\_table.pdf](http://www.eucast.org/fileadmin/src/media/PDFs/EUCAST_files/Breakpoint_tables/v_6.0_Breakpoint_table.pdf)  
Accessed Jun 10, 2019.

FEDESA press release on the European Union Conference. The Microbial Threat, Copenhagen (1998) in Van Den Bogaard, A. E.; Stobberingh, E. E. Epidemiology of resistance to antibiotics. Link between animals and humans. *International Journal of Antimicrobial Agents*, Amsterdam, v. 14, n. 4, p. 327- 335, 2000.

Frank, L.A., Loeffler, A., (2012). Meticillin-resistant *Staphylococcus pseudintermedius*: clinical challenge and treatment options. *Vet. Dermatol.* 20, 496–501.

Guardabassi, L; Jansen, L. B., Kruse, H. (2010). Guia de Antimicrobianos em Veterinária. *Artmed.* 20.

Guardabassi, L.; Schwarz, S.; Lloyd, D. H. (2004) Pets animals as reservoirs of antimicrobial-resistant bacteria. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy, London*, v. 54, n. 2, p. 331-332

Gingrich EN, Kurt T, Hyatt DR, Lappin MR, Ruch-Gallie R (2011) Prevalence of methicillin-resistant staphylococci in northern Colorado shelter animals. *J Vet Diagn Invest* 23:947–950

Louis, S. & Papich, M. G. (2010) Clinical pharmacology for small animal clinical practice. *Greater St. Louis Veterinary Medical Association.*

Loeffler, A.; Linek, M.; Moodley, A.; *et al.* (2007) First report of multiresistant, *mecA*-positive *Staphylococcus intermedius* in Europe: 12 cases from a veterinary dermatology referral clinic in Germany. *Veterinary Dermatology*, 18: 412–21.

Mota, R. A., Silva, K. P. C. da, Freitas, M. F. L. de, Porto, W. J. N., & Silva, L. B. G. da. (2005). Utilização indiscriminada de antimicrobianos e sua contribuição a multirresistência bacteriana. *Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science*, 42(6), 465.

Ito, T., Katayama Y., Asada, K. Mori, N., Tsutsumimoto, K., Tiensasitorn, C., Hiramatsu, K. (2001) Structural comparison of three types of staphylococcal cassette chromosome *mec* integrated in the chromosome in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob Agents Chemother*; 45 (5), 1323-36

International Working Group on the Classification of Staphylococcal Cassette Chromosome Elements (IWG-SCC) (2013). Acedido em Outubro 4, 2014. Disponível em: [http://www.sccmec.org/Pages/SCC\\_HomeEN.html](http://www.sccmec.org/Pages/SCC_HomeEN.html)

Paul, N.C., Moodley, A., Ghibaud, G. & Guardabassi, L. (2011). Carriage of Methicillin-Resistant *Staphylococcus pseudintermedius* in Small Animal Veterinarians: Indirect Evidence of Zoonotic Transmission. *Zoonoses and Public Health*, 58(8), 533-539.

## 5 CONCLUSÕES FINAIS

Neste estudo observou-se uma elevada colonização por *Staphylococcus* resistentes à meticilina e multirresistentes em animais saudáveis na Região Serra Gaúcha. Aparentemente, a transmissão de genes de resistência entre animais e humanos e multirresistência está sendo favorecida pelo contato próximo entre os animais e os seus tutores. Os resultados presentes neste estudo indicam a presença de MRS em animais clinicamente saudáveis, e alertam para o uso prudente de antimicrobianos e a necessidade de programar medidas de prevenção para evitar a disseminação de genes de resistência.

Como perspectivas, pretende-se realizar a identificação molecular das espécies estafilocócicas e confirmação do gene de resistência *mecA* através de métodos moleculares. Destaca-se que a bacterioteca obtida neste estudo servirá de base para elaboração de testes de diagnóstico e prospecção de fármacos com atividade antimicrobiana.



## 6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Abraham, J.L.; Morris, D.O.; Griffeth, G.C.; Shofer, F. S. and Rankin S. C. (2007). “Surveillance of healthy cats and cats with inflammatory skin disease for colonization of the skin by methicillin resistant coagulase-positive staphylococci and *Staphylococcus schleiferi ssp.*,” *Vet. Dermatol.*, vol. 18, no. 4, pp. 252–259

Aschbacher, P.W. (1978). Distribution and fate of growth-promoting drugs. In: Hathcock, J. N.; Coon, J. (Ed.). Nutrition and drugs interrelations New York: *Academic Press*

Ayliffe, G.A.J. (1997). The progressive intercontinental spread of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Clin. Infect. Dis.* 24:S74–79

Bahr Arias, M.V.; Carrilho, Claudia Maria, D de M . (2012). Resistência antimicrobiana nos animais e no ser humano. Há motivo para preocupação. *Semina. Ciências Agrárias* (Impresso), 33, 775-790.

Barber, A.I. (1961). Methicillin resistant staphylococci. *J. Clin. Pathol.* 14:385-393.

Beck, K.M.; Waisglass, S.E.; Dick, H.L.; Weese, J.S. (2012). Prevalence of methicillin-resistant *Staphylococcus pseudintermedius* (MRSP) from skin and carriage sites of dogs after treatment of their methicillin resistant or methicillin-sensitive staphylococcal pyoderma. *Vet Dermatol*, 23:369–375, e66–7.

Berg, J.N.; Wendell, D.E. (1984) Vogelweid C et al. Identification of the major coagulase positive *Staphylococcus sp.* of dogs as *Staphylococcus intermedius*. *Am J Vet Res*; 45: 1,307–1,309.

Berger-Bachi B.; Rohrer S.; (2002) Factors influencing methicillin resistance in staphylococci. *Arch Microbiol*; 178: 165–171.

Bemis DA, Jones RD, Hiatt LE, et al. (2006) Comparison of tests to detect oxacillin resistance in *Staphylococcus intermedius*, *Staphylococcus schleiferi*, and *Staphylococcus aureus* isolates from canine hosts. *J Clin Microbiol.* 44:3374–6.

Becker, K., Ballhausen, B., Köck, R. & Kriegeskorte, A. (2014). Methicillin resistance in *Staphylococcus* isolates: The “*mec* alphabet” with specific consideration of *mecC*, a *mec* homolog associated with zoonotic *S. aureus* lineages. *Intern J of Medic Microbiol.*, 304, 794-804.

Bierowiec, K.; Płoneczka-Janeczko, K.; & Rypuła, K. (2016). Prevalence and Risk Factors of Colonization with *Staphylococcus aureus* in Healthy Pet Cats Kept in the City Households. *BioMed Research International*, 1–10.

Bondi, A.; Dietz, C.C. (1945). Penicillin resistant staphylococci. *Exp. Biol. Med.* 60:55–58.

Börjesson, S.; Gómez-Sanz, E.; Ekström, K.; Torres, C.; Grönlund, U. (2015). *Staphylococcus pseudintermedius* can be misdiagnosed as *Staphylococcus aureus* in humans with dog bite wounds. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 34, 839–844.

Buckland, E. L., O’Neill, D., Summers, J., Mateus, A., Church, D., Redmond, L., & Brodbelt, D. (2016). Characterisation of antimicrobial usage in cats and dogs attending UK primary care companion animal veterinary practices. *Veterinary Record*, 179(19), 489–489. doi:10.1136/vr.103830

Carrilho, C.M.D. de M.; Grion, C.M.C.; Bonametti, A.M.; Medeiros, E.A.S.; Matsuo, T. (2007) Multivariate analysis of the factors associated with the risk of pneumonia in intensive care units. *The Brazilian Journal of Infectious Diseases*, Salvador, 11-3, 339-344.

Chambers HF, DeLeo FR. (2009). Waves of resistance: *Staphylococcus aureus* in the antibiotic era. *Microbiology*, 7: 629–641.

Clinical and Laboratory standards Institute (2019). Performance standards for antimicrobial susceptibility testing. *CLSI supplement M100.* 29, 58.

Clinical and Laboratory Standards Institute. (2013) Performance standards for antimicrobial disk and dilution susceptibility tests for bacteria isolated from animals; approved standards – fourth edition. CLSI VET01-A4. Wayne, PA: CLSI

Couce A.; Blazquez, J. (2009). Side effects of antibiotics on genetic variability. *FEMS Microbiol Rev* 33:531.

Cohn LA, Middleton JR. A veterinary perspective on methicillin-resistant *Staphylococci*. *J Vet Emerg Crit Care*. 2010;20(1):31–45.

Cox, H.U.; (2006). Staphylococcal infections. In: Greene CE, ed. Infectious Diseases of the Dog and Cat, St Louis, MO: *Saunders Elsevier*, 316–320.

Dancer SJ. The effect of antibiotics on methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *J Antimicrob Chemother* 2008; 61: 246–53.

Descloux, S.; Rossano, A.; Perreten, V.; (2008) Characterization of new staphylococcal cassette chromosome mec (SCCmec) and topoisomerase genes in fluoroquinolone- and methicillin-resistant *Staphylococcus pseudintermedius*. *Journal of Clinical Microbiology*, 46: 1818–23.

Devriese, L.A., Van Damme, L.R. & Famaree, L. (1972). Methicillin (Cloxacillin)-Resistant *Staphylococcus aureus* strains Isolated from Bovine Mastitis Cases [Abstract]. *Zentralblatt für Veterinärmedizin Reihe B*, 19(7), 598–605.

Faires, M.C.; Tater, K.C.; Weese, J.S.; (2009) An investigation of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* colonization in people and pets in the same household with an infected person or infected pet. *J Am Vet Med Assoc*. 235(5):540–543.

Frank, L.A., Loeffler, A., (2012). Methicillin-resistant *Staphylococcus pseudintermedius*: clinical challenge and treatment options. *Vet. Dermatol*. 20, 496–501.

Faires M, Gard S, Aucoin D, et al. Inducible clindamycin-resistance in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and methicillin-resistant *Staphylococcus pseudintermedius* isolates from dogs and cats [letter to the editor]. *Vet Microbiol* 2009;139:419–20.

FEDESA press release on the European Union Conference. The Microbial Threat, Copenhagen (1998) in VAN DEN BOGAARD, A. E.; STOBBERINGH, E. E. Epidemiology of resistance to antibiotics. Link between animals and humans. *International Journal of Antimicrobial Agents*, Amsterdam, v. 14, n. 4, p. 327- 335, 2000.

García-Álvarez, L., Holden, M.T.G., Lindsay, H., Webb, C.R., Brown, D.F.J., Curran, M.D., Walpole, E., Brooks, K., Pickard, D.J., Teale, C., Parkhill, J., Bentley, S.D., Edwards, G.F., Girvan, E.K., Kearns, A.M., Pichon, B., Hill, R.L., Larsen, A.R., Skov, R.L., Peacock, S.J., Maskell, D.J. & Holmes, M.A. (2011). Meticillin-resistant *Staphylococcus aureus* with a novel *mecA* homologue in human and bovine populations in the UK and Denmark: a descriptive study. *Lancet Infectious Diseases*, 11(8), 595–603.

Giguère, F.; Prescott, J.F.; Dowling, P.M. (2013). Antimicrobial Therapy in Veterinary Medicine Fifth Edition, 21-22.

Grundmann, H.; Aires-de-Sousa, M.; Boyce, J.; Tiemersma, E. (2006). Emergence and resurgence of meticillin-resistant *Staphylococcus aureus* as a public-health threat. *Lancet* 368:874–85

Guardabassi, L; Jansen, L. B., Kruse, H. (2010) Guia de Antimicrobianos em Veterinária. *Artmrd*. 20

Guardabassi, L.; Schwarz, S.; Lloyd, D. H. (2004) Pets animals as reservoirs of antimicrobial-resistant bacteria. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, London, v. 54, n. 2, p. 331-332

Gibbons, S.; (2004). Anti-staphylococcal plant natural products. *Nat Prod Rep*. 21:263–277.

Gingrich EN, Kurt T, Hyatt DR, Lappin MR, Ruch-Gallie R (2011) Prevalence of methicillin-resistant staphylococci in northern Colorado shelter animals. *J Vet Diagn Invest* 23:947–950

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

Harbarth, S., & Samore, M. H. (2008). Interventions to control MRSA: high time for time-series analysis? *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 62(3), 431–433.

Intorre L, Vanni M, Di Bello D, et al. (2007) Antimicrobial susceptibility and mechanism of resistance to fluoroquinolones in *Staphylococcus intermedius* and *Staphylococcus schleiferi*. *J Vet Pharmacol. Ther*;30:464–9.

Ito, T., Hiramatsu, K., Oliveira, D.C., De Lencastre, H., Zhang, K., Westh, H., O'Brien, F., Giffard, P.M., Coleman, D., Tenover, F.C., Boyle-Vavra, S., Skov, R.L., Enright, M.C., Kreiswirth, B., Kwan, S.K., Grundmann, H., Laurent, F., Sollid, J.E., Kearns, A.M., Goering, R., John, J.F., Daum, R., Soderquist, B., 2009. Classification of staphylococcal cassette chromosome mec (SCCmec): Guidelines for reporting novel SCCmec elements. *Antimicrob. Agents Chemother.* 53 (12), 4961–4967.

Ito, T., Hiramatsu, K., Tomasz, A., de Lencastre, H., Perreten, V., Holden, M.T.G., Coleman, D.C., Goering, R., Giffard, P.M., Skov, R.L., Zhang, K., Westh, H., O'Brien, F., Tenover, F.C., Oliveira, D.C., Boyle-Vavra, S., Laurent, F., Kearns, A.M., Kreiswirth, B., Ko, K.S., Grundmann, H., Sollid, J.E., John Jr., J.F., Daum, R., Soderquist, B. & Buist, G. (2012). International Working Group on the Classification of Staphylococcal Cassette Chromosome Elements (IWG-SCC). Guidelines for reporting novel *mecA* gene homologues. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 56 (10), 4997–4999.

Iverson, S.A.; Brazil, A.M., (2015) Ferguson JM et al. Anatomical patterns of colonization of pets with staphylococcal species in homes of people with methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) skin or soft tissue infection (SSTI). *Vet Microbiol* 176: 202–208.

Jevons, M.P. (1961). “Celbenin”-resistant staphylococci. *BMJ* 1:124–25

Kadlec, K.; Schwarz, S.; Perreten, V.; Andersson, U.G.; Finn, M.; Greko, C.; Moodley, A.; Kania, S.A.; Frank, L.A.; Bemis, D.A.; Franco, A.; Iurescia, M.; Battisti, A.; Duim B, Wagenaar, J.A.; van Duijkeren, E.; Weese, J.S.; Fitzgerald, J.R.; Rossano, A.; Guardabassi, L. (2010). Molecular analysis of methicillin-resistant *Staphylococcus pseudintermedius* of feline origin from different European countries and North America. *J Antimicrob Chemother* 65(8):1826–1828

Kirby, W.M. (1944). Extraction of a highly potent penicillin inactivator from penicillin resistant staphylococci. *Science* 99:452–53

Kloos, W.E.; Schleifer, K.H. (1983). *Staphylococcus auricularis* sp nov.: an inhabitant of the human external ear. *Int J Syst Bacteriol.* 22:9–14

Kruse, H., Sorum, H. (1994). Transfer of multiple drug resistance plasmids between bacteria of diverse origins in natural microenvironments. *Appl. Environ. Microbiol.* 60: 4015–21.

Lin AE, Davies JE. Occurrence of highly fluoroquinolone-resistant and methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in domestic animals. *Can J Microbiol* 2007;53:925–9.

Loeffler, A.; Linek, M.; Moodley, A.; *et al.* (2007) First report of multiresistant, *mecA*-positive *Staphylococcus intermedius* in Europe: 12 cases from a veterinary dermatology referral clinic in Germany. *Veterinary Dermatology*, 18: 412–21.

Louis, S. & Papich, M. G. (2010) Clinical pharmacology for small animal clinical practice. *Greater St. Louis Veterinary Medical Association*.

Madigan, M. T.; Martinko, J. M.; Stahl, D.; Clark, D. P. (2012). Brock biology of microorganisms. San Francisco: *Person Education*. 13ed.

Miller, W.H.; Griffin, C. E.; Campbell, K. L. (2013) Muller and Kirk's Small. *Animal Dermatology*. *Elsevier*, 7:184-223.

Moellering, R.C. Jr. (2012). MRSA: the first half century. *J. Antimicrob. Chemother.* 67:4–11

Moellering, R. C. Jr.; *Clin. Infect. Dis.* 1998, 27, S135; Dzidic, S.; Suskovic, J.; Kos, B.; *Food Technol. Biotech.* 2008, 46, 11.

Mota, R. A., Silva, K. P. C. da, Freitas, M. F. L. de, Porto, W. J. N., & Silva, L. B. G. da. (2005). Utilização indiscriminada de antimicrobianos e sua contribuição a multirresistência bacteriana. *Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science*, 42(6), 465.

Musher, D. M; Mackenzie, S.O. (2013). Infections due to *Staphylococcus aureus*. *Medicine*, 56:383, 184-223.

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

Nicolaou, K. C.; Montagnon, T.; (2008). Molecules that Changed the World, Wiley-VCH: Weinheim, cap. 13

Onuma K, Tanabe T, Sato H. (2011) Antimicrobial resistance of *Staphylococcus pseudintermedius* isolates from healthy dogs and dogs affected with pyoderma in Japan. *Vet Dermatol.* 23:17–22.e5.

Otto, M. (2010) Staphylococcus colonization of the skin and antimicrobial peptides. *Expert Rev Dermatol*; 5: 183–195.

Paterson, G.K., Larsen, A.R., Robb, A., Edwards, G.E., Pennycott, T.W., Foster, G., Mot, D., Hermans, K., Baert, K., Peacock, S.J., Parkhill, J., Zadoks, R.N. & Holmes, M.A. (2012). The newly described *mecA* homologue, *mecALGA251*, is present in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates from a diverse range of host species. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 67, 2809-2813.

Peacock, S. J., & Paterson, G. K. (2015). Mechanisms of Methicillin Resistance in *Staphylococcus aureus*. *Annual Review of Biochemistry*, 84(1), 577–601.

Perreten, V.; Kadlec, K.; Schwarz, S.; Gronlund Andersson, U.; Finn, M.; Greko, C., Moodley, A.; Kania, S.A.; Frank, L.A.; Bemis, D.A.; Franco, A.; Iurescia, M.; Battisti, A.; Duim, B.; Wagenaar, J.A.; van Duijkeren, E.; Weese, J.S.; Fitzgerald, J.R.; Rossano, A.; Guardabassi, L. (2010). Clonal spread of methicillin-resistant *Staphylococcus pseudintermedius* in Europe and North America: an international multicentre study. *J Antimicrob Chemother* 65(6):1145–1154

Phillips, I.; Casewell, M.; Cox, T.; De Groot, B.; Friis, C.; Jones, R.; Nightingale, C.; Preston, R.; Waddell, J. (2004). Does the use of antibiotics in food animals pose a risk to human health? *Journal of Antimicrobial Chemotherapy, London*, 53:28- 52

Rammelkamp, C.H.; Maxon, T. (1942). Resistance of *Staphylococcus aureus* to the action of penicillin. *Exp.Biol. Med.* 51:386–89

Rich M, Deighton L, Roberts L. Clindamycin-resistance in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolated from animals. *Vet Microbiol.* 2005;111:237–40.

Rodriguez, J.A.G. *et al.* (2000). Procedimientos em microbiología clínica. Métodos básicos para el estudio de la sensibilidad a los antimicrobianos.

Rubin JE, Ball KR, Chirino-Trejo M. Antimicrobial susceptibility of *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus pseudintermedius* isolated from various animals. *Can Vet J* 2011;52:153–7.

Shore, A.C., Deasy, E.C., Slickers, P., Brennan, G., O’Connell, B., Monecke, S., Ehricht, R. & Coleman, D.C. (2011). Detection of staphylococcal cassette chromosome *mec* type XI carrying highly divergent *mecA*, *mecI*, *mecRI*, *blaZ*, and *ccr* genes in human clinical isolates of clonal

complex 130 methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 55(8), 3765–3773

Skinner, D.; Keefer, C.S. (1941). Significance of bacteremia caused by *Staphylococcus aureus*: a study of one hundred and twenty-two cases and a review of the literature concerned with experimental infection in animals. *Arch. Intern. Med.* 68:851–75

Schwarz S., Loeffler A., Kadlec K. (2017). Bacterial resistance to antimicrobial agents and its impact on veterinary and human medicine. *Vet dermatol*, 28(1): 82-119.

Schwarz, S., Kehrenberg, C. & Walsh, T. R. (2001) Use of antimicrobial agents in veterinary medicine and food animal production. *Int. J. Antimicrob. Agents* 17, 431–437

Swenson, J.M., Patel, J.B., Jorgensen, J.H., (2007). Special phenotypic methods for detecting antibacterial resistance. In: Murray, P.R., Baron, E.J., Jorgensen, J.H., Landry, M.L., Tenover, M.A. (Eds.), *Manual of Clinical Microbiology*. 9th edition. *ASM Press, Washington, DC*, pp. 1173–1192

Shore, A.C. & Coleman, D.C. (2013). Staphylococcal cassette chromosome *mec*: Recent advances and new insights. *International Journal of Medical Microbiology*, 303, 350-359.

The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. (2016) Breakpoint tables for interpretation of MICs and zone diameters. Version 6.0. Available at: [http://www.eucast.org/fileadmin/src/media/PDFs/EUCAST\\_files/Breakpoint\\_tables/v\\_6.0\\_Breakpoint\\_table.pdf](http://www.eucast.org/fileadmin/src/media/PDFs/EUCAST_files/Breakpoint_tables/v_6.0_Breakpoint_table.pdf) Accessed Jun 22, 2019

Trzcinski K, Cooper BS, Hryniewicz W, et al. (2000) Expression of resistance to tetracyclines in strains of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *J Antimicrob Chemother*;45:763–70.

Van Duijkeren, E.; Catry, B.; Greko, C.; Moreno, M.A.; Pomba, M.C.; Pyörälä, S.; Ruzauskas, M.; Sanders, P.; Threlfall, E.J.; Torren-Edo, J.; Törneke, K. (2011). Review on methicillin-resistant *Staphylococcus pseudintermedius*. *J. Antimicrob. Chemother.* 66, 2705–2714

Vengust M, Anderson ME, Rousseau J, Weese JS (2006) Methicillin-resistant staphylococcal colonization in clinically normal dogs and horses in the community. *Lett Appl Microbiol* 43:602–606



Watson, A. D. J. & Rosin, E. (2000). Antimicrobial drug use in dogs and cats. In *Antimicrobial Therapy in Veterinary Medicine*, 3rd edn (Prescott, J. F., Baggot, J. D. & Walker, R. D., Eds), pp. 537–75. *Iowa State University Press*, USA

Weese JS, van Duijkeren, E. (2010) Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus pseudintermedius* in veterinary medicine. *Vet Microbiol*; 140: 418–429.

Weese JS, Faires MC, Frank LA, et al. (2012). Factors associated with methicillin-resistant versus methicillin-susceptible *Staphylococcus pseudintermedius* infection in dogs. *J Am Vet Med Assoc*, 240:1450–1455.

Weese, J.S.; S. Giguere, L.; Guardabassi, P.S.; Morley, M.; Papich, D.R.; Ricciuto, and J.E. Sykes; (2015). ACVIM Consensus Statement on Therapeutic Antimicrobial Use in Animals and Antimicrobial Resistance.; *ACVIM Consensus Statement J Vet Intern Med*;29:487–498

World Health Organization—Advisory Group on Integrated Surveillance of Antimicrobial Resistance (2009).

Yilmaz, G., Aydin, K., Iskender, S., Caylan, R., Koksall, I., (2007). Detection and prevalence of inducible clindamycin resistance in staphylococci. *J. Med. Microbiol.* 56, 342–345.

Zhang, K.; McClure, J. A; Elsayed, S. *et al.* (2005). Novel multiplex PCR assay for characterization and concomitant subtyping of staphylococcal cassette chromosome mec types I to V in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *J. of Clin Microbiol.* n. 43. P. 5026–33.