

**UNIVERSIDADE ESTADUAL DO NORTE FLUMINENSE DARCY RIBEIRO**

**MARCELLA BRAGA DA SILVA**

**“IDENTIFICAÇÃO EPIDEMIOLÓGICO-MOLECULAR DE *Staphylococcus*  
ENVOLVIDOS EM INFECÇÕES PURULENTAS EM CÃES DO NORTE E  
NOROESTE FLUMINENSE”**

**CAMPOS DOS GOYTACAZES – RJ**

**AGOSTO - 2014**

**MARCELLA BRAGA DA SILVA**

**“IDENTIFICAÇÃO EPIDEMIOLÓGICO-MOLECULAR DE *Staphylococcus*  
ENVOLVIDOS EM INFECÇÕES PURULENTAS EM CÃES DO NORTE E  
NOROESTE FLUMINENSE”**

**Tese de doutorado apresentada  
ao Programa de Pós-graduação  
em Ciência Animal da  
Universidade Estadual do Norte  
Fluminense Darcy Ribeiro, como  
parte das exigências para  
obtenção do título de Doutor em  
Ciência Animal.**

Orientador: Prof. Olney Vieira da Motta

Co-orientadora: Agnes Marie Sá Figueiredo

CAMPOS DOS GOYTACAZES – RJ

AGOSTO - 2014

**MARCELLA BRAGA DA SILVA**

**“IDENTIFICAÇÃO EPIDEMIOLÓGICO-MOLECULAR DE *Staphylococcus*  
ENVOLVIDOS EM INFECÇÕES PURULENTAS EM CÃES DO NORTE E  
NOROESTE FLUMINENSE”**

**Tese de doutorado apresentada  
ao Programa de Pós-graduação  
em Ciência Animal da  
Universidade Estadual do Norte  
Fluminense Darcy Ribeiro, como  
parte das exigências para  
obtenção do título de Doutor em  
Ciência Animal.**

**BANCA EXAMINADORA**

---

Professora Regina Célia de S. C. Fernandes (PhD, Doenças infecciosas) - FMC

---

Prof. João Carlos de Aquino Almeida (Doutor, Biociências e Biotecnologia) – UENF

---

Professora Agnes Marie Sá Figueiredo (PhD, Microbiologia ) - UFRJ  
Co-orientadora

---

Prof. Olney Vieira da Motta (Doutor, Biociências e Biotecnologia) - UENF  
Orientador

*Aos meus pais, Tânia e José Luiz.*

## AGRADECIMENTOS

Sobretudo a Deus, pelo presente da vida, pois sem Ele eu não teria forças para essa longa jornada.

Aos meus queridos pais, Tânia e José Luiz, compartilhei com vocês todos os meus sonhos e acredito que os frutos que vingaram, foram nutridos, principalmente, pelo amor de vocês!

Ao meu namorado Francis Sereno, por ter permanecido ao meu lado, me incentivando a percorrer este caminho, por compartilhar angústias e dúvidas estendendo sua mão amiga em momentos difíceis.

Ao meu irmão, Marcus, a minha cunhada Mônica Braga e ao meu lindo sobrinho e afilhado Bernardo, pelos inúmeros momentos de felicidade e alegria ao lado deste pequeno.

Ao meu orientador Olney Vieira da Motta pela sua disponibilidade e pelo acompanhamento exercido durante a execução do trabalho, e por prestar toda a orientação e esclarecimentos necessários para o meu desempenho durante o doutorado.

A minha co-orientadora Prof<sup>a</sup> Agnes Marie Sá Figueiredo, pelas orientações conferidas ao longo do trabalho e a oportunidade do convívio e da aprendizagem, abrindo as portas do seu laboratório de uma forma tão receptível. Obrigada, meu muito obrigada, por direcionar toda a pesquisa com o seu vasto conhecimento. Serei eternamente grata a sua co-orientação.

À Dra. Fabienne Antunes Ferreira, Pós-doutoranda no Laboratório de Biologia Molecular de Bactérias (BMB) da UFRJ, pela colaboração indispensável no desenvolvimento desta pesquisa, principalmente, na finalização deste trabalho e na revisão da tese. Obrigada Fabi, por cada parte do seu tempo aqui dedicado.

À Maria Cícera de Carvalho, Bióloga do Laboratório de Biologia Molecular de Bactérias (BMB) da UFRJ, por toda a paciência e dedicação de sempre, principalmente nos incansáveis géis de PFGE.

A toda equipe do Laboratório de Biologia Molecular de Bactérias (BMB) da UFRJ, em especial às amigas, Cristiana Beltrame, Fabienne Ferreira e Mariana Severo, incluindo também todos que passaram por lá no período em que foi feito o presente estudo. Se hoje o trabalho está como está, foi também pela presença e ajuda de vocês.

Agradeço à família construída em torno da UENF. Às grandes companheiras de casa, Lara Lages, Patrícia Pereira e Mônica Brito, agradeço pelo lar acolhedor onde por vezes fui filha. Aos meus amigos de faculdade que estiveram presente no meu almejado sonho e me consolaram quando a saudade da família falava mais forte: Luíze Neli, Luciana Mathias, Fernanda Ribeiro e Maíra Esteves.

Agradeço a Alessandro Santos, meu querido “Geninho”, amigo desde sempre, que acreditou que eu chegaria até aqui mesmo antes de eu pensar em ir.

A toda a minha família, em especial a minha tia Fátima.

Aos meus eternos filhos de quatro patas, Paty (*in memoriam*), Pierre, Clarinha e Ninna. Cada momento da minha ausência na fase de doutoramento e que sempre estavam a me receber com uma alegria imensurável. Obrigada pela companhia nos momentos de escrita desta tese.

Aos órgãos financiadores: Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível superior (CAPES), Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro (FAPERJ) e Universidade Estadual do Norte Fluminense (UENF).

Finalmente, faço questão de agradecer de coração a todas as pessoas que torceram ou intercederam por mim, mesmo que de forma anônima ou discreta. É como disse

Vinícius de Moraes: “Você não faz amigos, você os reconhece”. A todos esses amigos e amigas, meu muito obrigada de coração.

"A ciência humana de maneira nenhuma  
nega a existência de Deus. Quando  
considero quantas e quão maravilhosas  
coisas o homem compreende, pesquisa e  
consegue realizar, então reconheço  
claramente que o espírito humano é obra de  
Deus, e a mais notável."

*Galileu Galilei*



## RESUMO

Infecções causadas por *Staphylococcus aureus* resistentes à metilina (MRSA) tem sido cada vez mais frequentes na medicina humana. Tal fato tem levado a uma maior preocupação frente a esta e outras espécies do gênero de importância na medicina veterinária. Desta forma, o objetivo principal do presente estudo foi avaliar a distribuição e prevalência de espécies de estafilococos resistentes à metilina isoladas de cães com infecções purulentas, além de caracterizar molecularmente tais amostras. Foram incluídas no estudo 124 amostras de estafilococos obtidas de cães com infecções purulentas, como piodermite (n=65), otite externa (n=36), tumor cutâneo (n=21) e infecção de sítio cirúrgico (n=2). Utilizando testes bioquímicos, confirmação pela reação em cadeia da polimerase (PCR), e espectrometria de massa por tempo de voo através de ionização e dessorção assistida por matriz (MALDI-TOF-MS), observamos que as espécies de *Staphylococcus coagulase positiva* (SCP) foram as mais frequentemente isoladas (n= 95; 76,6%), sendo em maior número as alocadas como *S. pseudintermedius* (n= 86; 69,4%), seguidas de *S. aureus* (n=6; 4,8%) e *S. schleiferi* (n=3; 2,4%). *Staphylococcus coagulase negativa* (SCN) foram isolados em 29 amostras clínicas (23,4%), sendo estes *Staphylococcus epidermidis* (n=17; 13,7%) e *Staphylococcus simulans* (n=12; 9,7%). No presente trabalho, a eficiência da plataforma MALDI-TOF-MS e dos testes bioquímicos foi avaliada para um total de 49 amostras de *S. pseudintermedius*, além de seis amostras de *S. aureus*, como controle. A partir das 49 amostras de *S. pseudintermedius* identificadas por PCR para o gene *nuc* (padrão ouro), apenas 12 (24,5%) puderam ser corretamente classificadas como *S. pseudintermedius*, e as outras 37 (75,5%) foram identificadas incorretamente na espécie *S. intermedius*. A identificação bioquímica foi também comparada com a PCR. Do total das 55 amostras testadas (incluindo as seis *S. aureus*), 21 (38,2%) foram identificados como *S. pseudintermedius*, 19 (32,7%) *S. intermedius* e 15 (27,3%) como *S. aureus*. Apontando, assim sérios problemas na especificação dessas amostras. A resistência aos antimicrobianos foi determinada através de antibiograma. As amostras testadas, entretanto, se mostraram, de modo geral, mais susceptíveis a antimicrobianos mais tóxicos, como cloranfenicol e rifampicina, ou de uso parenteral, como a gentamicina, ou ainda àqueles de uso restrito por motivos éticos, como a vancomicina e linezolida. A presença do gene

*mecA*, confirmada através de PCR, foi observada em 13,7% (17/124) das amostras testadas. Assim, foi detectada uma taxa de 15,1% (13/86) de *S. pseudintermedius* resistentes à meticilina (MRSA) e de 66,7% (4/6) de *S. aureus* resistentes à meticilina (MRSA). Através da tipagem de sequenciamento de multilocus (MLST) foi detectada a circulação em nosso meio da linhagem internacional multirresistente de MRSP, apresentando sequência tipo (ST) 71, em um cão com piodermite. Utilizando eletroforese em gel sob campos elétricos alternados (PFGE), e outros métodos de genotipagem, detectamos a presença dos clones pandêmicos de MRSA USA 400, OSPC e BEC. Este é o primeiro relato no Brasil da presença de uma amostra USA 400 (ST1-SCC*mecIV*) produtora da PVL. Nossos dados apontam para uma disseminação considerável do gene *mecA* nesses importantes patógenos animais e sugere que monitoramentos constantes devam ser realizados de forma a contribuir para o controle desses microrganismos resistentes e para um tratamento mais efetivo dessas infecções.

**Palavras-chave:** *Staphylococcus* resistente à meticilina, antimicrobianos, resistência, piodermite, otite, tumor cutâneo e infecção de sítio cirúrgico.

## ABSTRACT

Infections caused by methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) have been increasing in human medicine. This fact has led to increased concerns about this and other staphylococcal species of importance in veterinary medicine. Thus, the main aim of this study was to evaluate the prevalence and distribution of methicillin resistance among staphylococci isolated from dogs, with purulent infections, and molecularly characterize such isolates. One hundred and twenty-four staphylococcal isolates obtained from dogs with purulent infections, such as pyoderma (n=65), otitis externa (n=36), skin tumor n=21 and surgical site infection (n=2), were included in the study. Using biochemical tests, and PCR for *nuc* gene, for the coagulase-positive staphylococci (CPS), we found that most isolates were CPS (n=95; 76.6%), and the majority was allocated as *S. pseudintermedius* (n = 86; 69.4%), followed by *S. aureus* (n = 6, 4.8 %) and *S. schleiferi* (n = 3; 2.4%). Coagulase-negative staphylococci (CNS) were identified by biochemical tests in 29 clinical samples (23.4%), which was identified as *Staphylococcus epidermidis* (n = 17; 13.7%), and *Staphylococcus simulans* (n = 12; 9.7%). In this work, the efficiency of MALDI-TOF-MS platform and biochemical tests was assessed for a total of 49 isolates of *S. pseudintermedius*, and six of *S. aureus*, which were used as control. From the 49 isolates of *S. pseudintermedius* identified by PCR (gold standard), only 12 (24.5%) could be correctly classified as *S. pseudintermedius*, and the other 37 (75.5%) were identified incorrectly in the species *S. intermedius*. The biochemical identification was also compared with PCR. Of the total 55 isolates tested (including the six *S. aureus*), 21 (38.2%) were identified as *S. pseudintermedius*, 19 (32.7%) as *S. intermedius* and 15 (27.3%) as *S. aureus*. These data revealed serious problems in the speciation of these bacteria by both biochemical tests and MALDI-TOF-MS. Antimicrobial resistance was determined by disc diffusion test. The isolates, however, were generally more susceptible to more toxic antimicrobial agents, such as rifampicin and chloramphenicol, and to that of parenteral use, such as gentamicin, or of restricted use for ethical reasons, including vancomycin and linezolid. The presence of *mecA* was confirmed by PCR. This gene was observed in 13.7% (17/124) of the isolates tested. Thus, a rate of 15.1% (13/86) for *S. pseudintermedius* methicillin-resistant (MRSA) and 66.7% (4/6) for methicillin-resistant *S. aureus* (MRSA) was detected. By multilocus

sequence typing (MLST), the circulation of an international multiresistant strain of MRSP, belonging to sequence type (ST) 71, was detected in a dog with pyoderma. Using the pulsed-field gel electrophoresis (PFGE), and other genotyping methods, we detected the presence of the pandemic clones of MRSA USA400, OSPC and BEC. This is the first report of the presence in Brazil of a USA400 (ST1-SCC*mecIV*) that produces the Panton-Valentine leukocidin. Our data reveals a considerable spread of the *mecA* gene in important animal pathogens and suggests that regular monitoring should be performed in order to contribute for controlling these resistant bacteria, and for the design of more effective therapeutic scheme to treat the associated infections.

**Keywords:** *Staphylococcus aureus* resistant to methicillin, antimicrobial, resistance, pyoderma, otitis, skin tumor, and surgical site infection.

## LISTA DE FIGURAS

**Figura 1.** Esquema do funcionamento do MALDI-TOF-MS. (a) Colônias bacterianas são adicionadas à solução de matriz e o material é seco ao ar (b) submetido ao MALDI-TOF MS (c), um espectro de massa específica é obtido a partir dos componentes protéicos bacterianos (d), a identificação é realizada através da correspondência automática do espectro de massa gerados com os espectros presentes em uma base de dados (e)..

**Figura 2.** Espectro de massa de MALDI-TOF de *Enterococcus faecium*. Uma gama de determinações de 3.000 a 11.000 Da é apresentada. Os picos de massa característicos são predominantemente proteínas ribossomais. Posteriormente, o software integrado ao MALDI compara o padrão de entradas com padrões existentes no banco de dados.....

**Figura 3.** Detecção dos determinantes genéticos da leucocidina Panton-Valentine em amostras de MRSA isoladas de cães com infecções purulentas...

**Figura 4.** Detecção do SCC*meclII* e IV, através de PCR para a amostra de MRSA PA 66.1 e 60.1, isoladas de cães com infecção purulenta.....

**Figura 5.** Tipagem de SCC*meclIV* para amostras de MRSA PA 6.2 e 19.1, isoladas de cães com infecções purulentas.....

**Figura 6.** Detecção do teste RM, através de PCR para amostras de MRSA, isoladas de cães com infecções purulentas.....

**Figura 7.** Perfis de bandas do PFGE das amostras de MRSA isoladas de cães com infecções purulentas.....

## LISTA DE TABELAS

**Tabela 1:** Tipos de SCC*mec*, amostras de referência, ano do primeiro relato e país onde foi primeiramente descrita (adaptado de Turlej, Hryniewicz & Empel, 2011).....

**Tabela 2:** Complexo clonal (CC) e tamanho esperado dos produtos de amplificação (pb) no teste RM (adaptado de Cockfield e colaboradores, 2007)..

**Tabela 3:** Proteínas codificadas pelos genes utilizados na tipagem MLST (adaptado de Cockfield e colaboradores, 2000).....

**Tabela 4:** Sequência dos iniciadores (pse)para *S. pseudintermedius* e (au) para *S. aureus*, descritos por Sasaki *et al.* (2010),utilizados no multiplex PCR.....

**Tabela 5:** Sequência dos iniciadores utilizados no multiplex PCR, descrito por Boye e colaboradores, 2007.....

**Tabela 6:**Relação dos primers utilizados para a detecção dos genes de virulência *lukSF*.....

**Tabela 7:** Iniciadores diretos (*dir*) e reversos (*rev*) que foram utilizados no teste RM, segundo Cockfield e colaboradores (2007).....

**Tabela 8:** Distribuição de espécies de *Staphylococcus* isoladas de cães infectados em Campos dos Goytacazes, RJ, Brasil (2001-2013).....

**Tabela 9:** Identificação de *Staphylococcus spp.* a partir de infecções cutâneas de cães (origem biológica diferente) utilizando PCR, método bioquímico convencional e MALDI-TOF-MS.....

**Tabela 10**– Percentual de resistência a antimicrobianos, determinado através método de difusão a partir de discos, de amostras de *Staphylococcus* spp. isoladas de cães com infecções purulentas, do norte e noroeste fluminense, RJ, Brasil (2011-2013).....

**Tabela 11**– Percentual de resistência a antimicrobianos, determinado através método de difusão a partir de discos, de cada espécie de *Staphylococcus* isoladas de cães com infecções purulentas, do norte e noroeste fluminense, RJ, Brasil (2011-2013).....

**Tabela 12** – Perfis de resistência antimicrobiana, pelo método de difusão a partir de discos, das amostras de MRS isoladas de cães com infecções purulentas, do norte e noroeste fluminense, RJ, Brasil (2011-2013).....

## LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

Agr	Sistema sensor de densidade populacional dos <i>S. aureus</i> (do inglês: <i>accessory gene regulator</i> )
CA-MRSA	<i>Staphylococcus aureus</i> resistentes à metilina associados a infecções comunitárias (do inglês: <i>community-acquired methicillin-resistant Staphylococcus aureus</i> )
CC	Complexo clonal
DNA	Ácido desoxirribonucléico (do inglês: <i>deoxyribonucleic acid</i> )
DO	Densidade ótica
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético (do inglês: <i>ethylenediaminetetraacid</i> )
EUA	<i>Estados Unidos da América</i>
HA-MRSA	<i>Staphylococcus aureus</i> resistentes à metilina associados a infecções hospitalares (do inglês: <i>hospital-acquired methicillin-resistant Staphylococcus aureus</i> )
IACS	Infecções associadas aos cuidados à saúde
LA-MRSA	<i>Staphylococcus aureus</i> resistentes à metilina associados a animais de produção (do inglês: <i>livestock-associated methicillin-resistant Staphylococcus aureus</i> )
MLST	Tipagem por seqüenciamento de multilocus enzimáticos (do inglês: <i>multilocus sequence typing</i> ).
MRSA	<i>Staphylococcus aureus</i> resistentes à metilina (do inglês: <i>methicillin-resistant Staphylococcus aureus</i> )
pb	Pares de base
PBP2a	Proteína de ligação à penicilina 2a (do inglês: <i>penicillin binding protein 2a</i> )
PCR	Reação em cadeia da polimerase (do inglês: <i>polymerase chain reaction</i> )
PFGE	Eletroforese sob campos elétricos alternados (do inglês: <i>pulsed-field gel-electrophoresis</i> )



PVL	Leucocidina de Panton-Valantine (do inglês <i>Panton-Valantine Leukocidin</i> )
SCC <i>mec</i>	Elemento <i>mec</i> ou cassete cromossômico estafocócico <i>mec</i> (do inglês: <i>staphylococcal cassette chromosome mec</i> )
ST	Sequência tipo
TSA	Meio de cultura com ágar (do inglês: <i>trypticase soy agar</i> )
TSB	Meio de cultura em caldo (do inglês: <i>trypticase soy broth</i> )
TAE	Tris Acetato EDTA
TBE	Tris Borato ETDA

## SUMÁRIO

## 1. INTRODUÇÃO

Os *Staphylococcus aureus* resistentes à meticilina (MRSA) foram relatados pela primeira vez no Reino Unido (RU) em 1961, e em meados da década de 1990 emergiram como um importante problema mundial de saúde pública. Na Irlanda, durante o ano de 2002, 416 de 998 (42%) de *S. aureus* isolados de humanos com bacteremia foram resistentes à meticilina (ANON, 2003). No Brasil, em 2009, analisando 2.218 amostras de *S. aureus*, GALES *et al.* (2009) observaram que 31% dessas amostras eram MRSA. Porém, isolamento de MRSA em animais foi relatado pela primeira vez em 1972, após sua detecção no leite mastítico de vacas (DEVRIESE, 1990). Relatos ocasionais de infecções por tais microrganismos em outros animais já foram publicados, incluindo cães, gatos, ovinos, galinhas, coelhos, cavalos e animais exóticos. Porém, nos últimos anos, o número de casos parece estar aumentando (LEE, 2003; GONI *et al.*, 2004; RICOS; ROBERTS, 2004; WEESE, 2005; HANSELMAN *et al.*, 2008; WALTHER *et al.*, 2008; MORRIS *et al.*, 2010).

MRSA foram encontrados colonizando mucosa nasal de várias espécies animais (YASUDA *et al.*, 2000; LOEFFLER *et al.*, 2005; WEESE, 2005; VENGUST *et al.*, 2006; STROMMINGER *et al.*, 2006), levantando questões importantes à respeito da saúde pública e animal. Carreadores nasais representam um fator de risco reconhecido para infecção estafilocócica em humanos (WERTHEIM *et al.*, 2008), mas o impacto da colonização nasal de animais ainda não foi completamente elucidado.

Levantamentos epidemiológicos realizados nos Estados Unidos da América (EUA) sugerem que microrganismos pertencentes à espécie *S. aureus* subespécie *aureus*, que neste trabalho foram referidos apenas como *S. aureus*, representam, atualmente, os principais agentes etiológicos de infecções de pele e tecidos moles assistidas nos setores de emergência, naquele país; sendo que a maioria era portadora do gene *mecA* (MORAN *et al.*, 2006).

O conhecimento sobre a natureza e epidemiologia das infecções causadas por estes microrganismos, bem como sobre suas características de multirresistência constituem importantes dados para o planejamento em saúde pública, pois explicitam a necessidade urgente de políticas efetivas para a prevenção e controle deste patógeno, com o objetivo de minimizar sua ampla disseminação e propiciar a elaboração de esquemas terapêuticos mais eficazes.

Dentre as espécies de *Staphylococcus*, as amostras de *Staphylococcus pseudintermedius* são as mais isoladas de infecções purulentas (MOODLEY *et al.*, 2014). *S. pseudintermedius* resistentes à meticilina (MRSP) foram relatadas pela primeira vez na Europa em 2006 (MOODLEY *et al.*, 2013). O clone prevalente circulante naquele continente pertence à sequência tipo (ST; do inglês: *sequence-typing*) 71 e apresentava resistência a todos os antibióticos rotineiramente utilizados na prática de pequenos animais. Este tipo clonal foi também relatado no Canadá e nos Estados Unidos, embora com menos frequência (MOODLEY *et al.*, 2013). Estudos realizados no Brasil demonstraram que amostras de MRSP ST71 encontram-se circulando em cães na cidade do Rio de Janeiro (QUITOCO *et al.*, 2013). Foi demonstrado anteriormente que o MRSP ST71 pode ser transmitido para os veterinários e donos de cães, e um caso de infecção humana também foi relatado como resultado do contato prévio do paciente com um cão colonizado (MOODLEY *et al.*, 2013).

A resistência à meticilina é mediada pelo gene *mecA*, o qual confere resistência cruzada a todos os  $\beta$ -lactâmicos. Além disso, cepas de MRSA são frequentemente resistentes aos antimicrobianos não  $\beta$ -lactâmicos, limitando assim as opções terapêuticas e aumentando o risco de falha no tratamento, os custos com a internação, e o tempo de hospitalização. Casos de colonização e de infecção em animais domésticos têm sido relatados com maior frequência em cães e cavalos (GORTELL *et al.*, 1999; BAPTISTE *et al.*, 2005; LOEFFLER *et al.*, 2005; MAHONY *et al.*, 2005; BUSSCHER *et al.*, 2006). Estudos epidemiológicos revelaram a ocorrência indistinguível de clones de MRSA em animais e em pessoas expostas a animais, como veterinários e agricultores (LOEFFLER *et al.*, 2005; VOSS *et al.*, 2005; WEESE *et al.*, 2007). Da mesma forma, têm sido publicados na literatura científica relatos de cães afetados por pioderma compartilhando amostras idênticas de *S.pseudintermedius* com aquelas isoladas das fossas nasais de seus proprietários (GUARDABASSI *et al.*, 2004).

O conhecimento atual sobre a distribuição das espécies, a diversidade clonal e a resistência aos antimicrobianos de *Staphylococcus* isolados de animais são baseados, principalmente, em amostras clínicas e nas que colonizam a cavidade nasal. Estudos epidemiológico-moleculares de MRSA de origem humana e origem animal revelaram que, pelo menos para algumas cepas, infecções cruzadas entre

animais e humanos, ou vice-versa, podem ter ocorrido (STROMMENGER *et al.*, 2006; WEESE *et al.*, 2007).

Assim, este trabalho de tese teve como objetivo principal isolar e caracterizar cepas de *S. aureus* e *S. pseudintermedius* resistentes à meticilina, infectando ou colonizando cães atendidos no hospital veterinário da Universidade Estadual do Norte Fluminense (UENF), visando um estudo epidêmico-molecular e sobre o potencial de virulência dos microrganismos isolados. Deste modo, este estudo nos permitirá avaliar a circulação de clones epidêmicos e virulentos de MRSA e MRSP entre esses animais na comunidade estudada, localizada na região norte e noroeste do estado do Rio de Janeiro.

## 2. REVISÃO DA LITERATURA

### 2.1. Gênero *Staphylococcus*

Bactérias pertencentes ao gênero *Staphylococcus* foram descritas pela primeira vez por Robert Koch, em 1878, e logo no ano seguinte foram cultivadas em meio líquido por Louis Pasteur.

Esses microrganismos apresentam-se na forma de cocos Gram-positivos, que geralmente se dispõem em cachos irregulares, semelhantes a cachos de uva. Possuem metabolismo anaeróbio facultativo, sendo produtoras de catalase, com melhor crescimento em temperaturas entre 35 e 37°C e pH entre 6,0 e 7,0. Seu diâmetro varia entre 0,5 e 1,5 µm, sendo imóveis e não formadores de esporos (MORAN *et al.*, 2006).

O gênero *Staphylococcus* é constituído por trinta e nove espécies e várias subespécies ([HTTP://taxonomicom.taxonomy.nl](http://taxonomicom.taxonomy.nl), acessado em 19/06/2014). As três espécies de maior importância para o homem são: *S. aureus*, *Staphylococcus epidermidis* e *Staphylococcus saprophyticus*. Bactérias pertencentes à espécie *S. aureus* são coagulase-positivas, o que as diferencia de diversas outras espécies do gênero (BERGER-BACHI; ROHRER, 2002). Na medicina veterinária costumava-se ressaltar três espécies como as mais importantes sob o ponto de potencial patogênico: *S. aureus*, *Staphylococcus hyicus* e *S. intermedius* (DEVRIESE, 1990). Atualmente, esta afirmação permanece correta para os *S. aureus* e *S. hyicus*, mas, com a descrição de uma nova espécie denominada *S. pseudintermedius* (DEVRIESE *et al.*, 2005) tem sido sugerido que microrganismos antes classificados como *S. intermedius* devem ser reclassificados como membros desta nova espécie. Foi observado que todas as amostras de *S. intermedius* isoladas de cães, gatos e humanos eram na realidade *S. pseudintermedius* (SASAKI *et al.*, 2007). A maioria das amostras isoladas de pombos urbanos e equinos, anteriormente classificadas como *S. intermedius*, são hoje consideradas como *Staphylococcus delphini*. Na realidade amostras de *S. intermedius* parecem estar confinadas aos pombos selvagens e vison-americano. Como a diferenciação fenotípica entre *S. intermedius* e *S. delphini* é muito complexa, amostras não caninas são frequentemente consideradas como pertencentes a espécies do grupo *S. intermedius* (SIG; do inglês: *S. Intermedius group*). Assim como os *S. aureus*, os microrganismos pertencentes às espécies *S.*

*intermedius*, *S. pseudintermedius* e *S. delphini* são coagulase positivos, enquanto que os classificados como *S. hyicus* apresentam uma produção de coagulase variável, mas geralmente esta produção é fraca ou ausente. Outras espécies isoladas de animais podem também produzir coagulase, como por exemplo, *Staphylococcus schleiferi* subsp. *coagulans* que foi isolada de otite em cães (GRIFFETH *et al.*, 2008).

## **2.2. *Staphylococcus aureus***

Microorganismos pertencentes à espécie *S. aureus* subsp. *aureus* têm sido amplamente estudados por estar envolvidos em uma gama de processos infecciosos, representando uma das principais causas de infecções associadas aos cuidados à saúde (IACS). São importantes cocos Gram-positivos que podem ser encontrados como parte da microbiota anfibiótica da pele e de mucosas de humanos, de outros mamíferos e de alguns pássaros. Estima-se que em torno de 20-30% da população de humanos saudáveis seja carreadora de *S. aureus*. A cavidade anterior nasal é o principal sítio colonizado por esses microrganismos. Entre os carreadores nasais, aproximadamente metade dos indivíduos também apresentam a pele colonizada por esta bactéria (LUCET & REGNIER, 2010).

Virtualmente, esses microrganismos podem colonizar e infectar qualquer tecido ou órgão e apresentam elevada plasticidade para adaptação (SINHA; HERRMANN, 2005; STEFANI *et al.*, 2012). Além disso, essas bactérias podem estar associadas tanto a infecções hospitalares (HA-MRSA; do inglês: *hospital-acquired methicillin-resistant S. aureus*) quanto a infecções comunitárias (CA-MRSA; do inglês: *community-acquired methicillin-resistant S. aureus*) (STEFANI *et al.*, 2012). Essa versatilidade dos *S. aureus* tem sido atribuída aos numerosos fatores de virulência que são capazes de produzir, podendo estes estar ancorados à superfície celular ou secretados para o meio extracelular. Os fatores de virulência produzidos pelos *S. aureus* que estão ancorados à parede são importantes, principalmente, na interação do microrganismo com o hospedeiro, nos processos de colonização (adesão e invasão), de evasão (fuga) das defesas do hospedeiro e de modulação da resposta imune. Além disso, a ampla variedade de proteínas secretadas por esse microrganismo, conhecidas como exoproteínas, pode funcionar, por exemplo, como agressinas, evasinas ou modulinas. A produção de múltiplos fatores de virulência

caracteriza a patogênese das infecções associadas aos *S. aureus* como de natureza multifatorial (GARZONI *et al.*, 2007; GOULD *et al.*, 2012).

Outra característica importante desse patógeno é a facilidade de aquisição e transferência de genes tanto relacionados à virulência quanto àqueles que conferem multirresistência aos antimicrobianos normalmente prescritos no tratamento de infecções associadas a esses microrganismos, dificultando, desta forma, o tratamento do paciente (OTTO, 2010).

### **2.2.1. *Staphylococcus aureus* resistentes à meticilina (MRSA)**

A introdução da penicilina em 1940 resultou em uma redução drástica dos índices de morbidade/mortalidade das infecções por *S. aureus*. No entanto, em 1942, foram observadas cepas estafilocócicas resistentes a este fármaco, sendo este fenótipo resultante da aquisição de um plasmídeo que codificava uma enzima ( $\beta$ -lactamase ou penicilinase) capaz de hidrolisar o anel  $\beta$ -lactâmico das penicilinas naturais. Em 1960, 80% de todas as amostras de *S. aureus* haviam adquirido resistência à penicilina. A descoberta das penicilinas semi-sintéticas (como a meticilina e a oxacilina) representou, na época, uma perspectiva de controle das cepas resistentes à penicilina. Entretanto, já na década de 60, foram detectadas as primeiras cepas de *S. aureus* apresentando um novo mecanismo de resistência a essas novas penicilinas (JEVONS, 1961). Estas amostras são hoje conhecidas pela sigla MRSA, do inglês *methicillin-resistant Staphylococcus aureus*.

A resistência à meticilina em *S. aureus* ocorreu através da aquisição do gene *mecA*, que codifica uma nova proteína de ligação à penicilina (PBP2<sup>`</sup> ou PBP2a, do inglês: *Penicillin Binding Protein*), e confere resistência à meticilina e a outros  $\beta$ -lactâmicos. A PBP2a é uma transpeptidase alternativa, a qual possui baixa afinidade pelos antibióticos  $\beta$ -lactâmicos (BERGER-BACHI; ROHRER, 2002). É sabido que as transpeptidases são importantes na formação de pontes transversas da parede celular bacteriana. Assim, a síntese do peptídeoglicano pode ocorrer normalmente nas amostras resistentes (portadora do gene *mecA*), através da ação enzimática desta PBP modificada e, desta forma, as bactérias resistentes podem sobreviver mesmo na presença das penicilinas.

O gene *mecA* está localizado em um elemento genético móvel, designado como cassete cromossômico estafilocócico *mec* (SCC*mec*, do inglês: *staphylococcal*



*cassette chromosome mec*). O SCC*mec* está integrado ao cromossomo dos MRSA, em um sítio específico (*attB<sub>scc</sub>*), localizado próximo à origem de replicação e flanqueado por sequências diretas e repetidas. Este segmento de DNA, que pode variar de 21 a 67 Kb, carrega o chamado “complexo gene *mec*”, o qual corresponde às regiões do gene *mecA* e de seus reguladores, *mecRI* e *mecI*, e o “complexo *ccr*”. Neste complexo encontram-se os genes que codificam para recombinases (*genes ccr*), as quais são responsáveis pela mobilidade do SCC*mec* (KATAYAMA *et al.*, 2000; HIRAMATSU *et al.*, 2002; ITO, *et al.*, 2004). Os genes *mecI* e *mecRI* apresentam atividade repressora e anti-repressora, respectivamente, sobre o gene *mecA* (ARCHER; NIEMEYER, 1994). Até o momento, foram descritos 11 tipos de SCC*mec* (I ao IX) para *S. aureus* e a sua classificação depende da combinação de classes/tipos do complexo *mec* (classe A, B, C1, C2, D e E), do complexo *ccr* (tipo 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 e 8) e do) e das regiões J (J1, J2 e J3), sendo que estas últimas não são componentes essenciais do cassete, mas podem, eventualmente, carrear algum gene que confere resistência a antimicrobianos. A região J1 está *upstream* ao complexo *mec*; a região J2 está entre o complexo *ccr* e o complexo *mec* e por fim, a região J3, que está *downstream* ao complexo *mec* ([http://www.sccmec.org/Pages/SCC\\_TypesEN.html](http://www.sccmec.org/Pages/SCC_TypesEN.html)). No caso das amostras de ECN acredita-se que essa diversidade ainda seja muito maior, com novas variações acontecendo principalmente no complexo *ccr* (ZONG *et al.*, 2011). Os tipos SCC*mec* descritos até o momento e seus variantes estão demonstradas na tabela 1 (TURLEJ *et al.*, 2011). A identificação do tipo de SCC*mec* é utilizada em estudos epidemiológicos. Porém, além dos 11 tipos já identificados para *S. aureus*, outros tipos ainda não caracterizados completamente já foram detectados (ZONG *et al.*, 2011).

Cepas contendo SCC*mec* tipo I foram primeiramente isoladas no Reino Unido, em 1961, dois anos após a introdução da metilina na indústria farmacêutica. Os tipos II e III de SCC*mec* (53 Kb e 67Kb, respectivamente) foram associados a cepas predominantes na década de 1980. Esses três tipos de SCC*mec* têm sido predominantemente isolados em cepas de MRSA associadas a infecções nosocomiais (ITO *et al.*, 2001). Já o SCC*mec* tipo IV (21-24,3Kb) tem sido encontrado, principalmente, em cepas de MRSA que vem emergindo em infecções na comunidade (CA-MRSA) em diversos países, incluindo os EUA, França, Suíça, Portugal, Holanda, Austrália, Nova Zelândia, Brasil, Itália, dentre outros (ITO *et al.*,

2001; VANDENECH *et al.*, 2003; RIBEIRO *et al.*, 2005; DAUM *et al.*, 2010). O SCCmec tipo VII (35,9Kb) foi encontrado em amostras de MRSA associadas a infecções comunitárias em Taiwan e pertencentes ao ST59. Este novo tipo é homólogo ao SCCmec V, porém com certas modificações e inserções de elementos genéticos (HIGUCHI *et al.*, 2008). Variantes dos tipos principais de SCCmec têm sido descritas. As variações são baseadas principalmente na presença ou ausência de elementos genéticos móveis no cassete (OLIVEIRA; LENCASTRE, 2002; SHORE *et al.*, 2005; MILHEIRIÇO *et al.*, 2007).

**Tabela 1:** Tipo de SCCmec, país onde foi primeiramente descrito, ano do primeiro relato e referência bibliográfica.

<b>Tipo de SCC mec</b>	<b>País de origem</b>	<b>Ano de isolamento</b>	<b>Referência</b>
<b>I (1B)</b>	Reino Unido	1961	Ito <i>et al.</i> , 2001
<b>II</b>	Japão	1982	Ito <i>et al.</i> , 1999
<b>III</b>	Nova Zelândia	1985	Ito <i>et al.</i> , 2001
<b>IV a (2B)</b>	EUA	1999	Ma <i>et al.</i> , 2002
<b>IV b (2B)</b>	EUA	1996	Ma <i>et al.</i> , 2002
<b>IV c (2B)</b>	Japão	ND	Ito <i>et al.</i> , 2003
<b>IV d (2B)</b>	Japão	1982	Ma <i>et al.</i> , 2006
<b>IV g (2B)</b>	Coréia	2003	Kwon <i>et al.</i> , 2005
<b>IV h (2B)</b>	Finlândia	2002	Milheiriço, Oliveira e Lencastre 2007

<b>IV i (2B)</b>	Suécia	1999	Berglund <i>et al.</i> , 2009
<b>IV j (2B)</b>	Suécia	1990	Berglund <i>et al.</i> , 2009
<b>V (5C2)</b>	Austrália	1999	Ito <i>et al.</i> , 2004
<b>VI (4B)</b>	Portugal	1996	Oliveira, Milheiriço & Lencastre., 2006
<b>VII (5C1)</b>	Suécia	2002	Berglund <i>et al.</i> , 2008
<b>VIII (4A)</b>	Canadá	2003	Zhang <i>et al.</i> , 2009
<b>IX 1 (C2)</b>	Tailândia	2006	Li, Shov & Han, 2011
<b>X (7C1)</b>	Canadá	2006	Li, Shov & Han, 2011
<b>XI (8E)</b>	Reino Unido	ND	Shore <i>et al.</i> , 2011

---

Adaptada de Turlej e colaboradores (2011).

Quanto à origem do *SCCmec*, diversos estudos sustentam a teoria de ancestrais múltiplos, mas também foi sugerido que o elemento *SCCmec* pode ter se inserido em diferentes momentos em diversas linhagens de *S. aureus* (MUSSEY; KAPUR, 1992; FITZGERALD *et al.*, 2001; ENRIGHT *et al.*, 2002; QI *et al.*, 2005; GOMES *et al.*, 2006). As linhagens de MRSA são geralmente definidas pelo ST (identificado pela tipagem por sequenciamento de multilocus; MLST; do inglês: *Multilocus Sequence Typing*) e pelo tipo do *SCCmec* (DEURENBERG; STOBBERINGH, 2008). O clone epidêmico brasileiro (BEC, do inglês *Brazilian Epidemic clone*), amplamente distribuído em nosso país, por exemplo, pertence à linhagem ST239-*SCCmec*III (SILVA-CARVALHO *et al.*, 2010).

Uma das características epidemiológicas mais marcantes dos MRSA é causar, frequentemente, infecções pandêmicas de natureza clonal. Clones pandêmicos podem estar tanto associados a infecções hospitalares (HA-MRSA) quanto a infecções comunitárias (CA-MRSA; STEFANI *et al.*, 2012)

### **2.2.2. MRSA associados a infecções na comunidade (CA-MRSA)**

No final dos anos de 1980-90, amostras de MRSA emergiram causando infecções tipicamente comunitárias, primeiramente na Austrália e posteriormente em outros países. Essas infecções inicialmente ocorreram em indivíduos imunocompetentes que não apresentavam riscos clássicos para infecção por MRSA, como por exemplo, história prévia de exposição a serviços de saúde. Amostras de CA-MRSA divergem fenotipicamente e genotipicamente das amostras comumente conhecidas como HA-MRSA. Diferente das HA-MRSA, a maioria das amostras de CA-MRSA é frequentemente susceptível a muitos antibióticos não  $\beta$ -lactâmicos (VANDENESH *et al.*, 2003). Além disso, muitas dessas amostras produzem a leucocidina de Pantón-Valantine (PVL) e apresentam SCC*mec* tipo IV, V, VII e VIII (LABANDEIRA-REY *et al.*, 2007; DEURENBERG; NULENS, 2009; ZHANG *et al.*, 2009).

A primeira linhagem de CA-MRSA descrita foi identificada em amostras isoladas no final da década de 1980, no Oeste da Austrália, causando infecções em aborígenes. O clone em questão foi chamado WA-1 (do inglês: *Western Australia 1*; CC1-ST1-SCC*mec* IV e geralmente PVL negativo). Em seguida, dois outros clones de CA-MRSA emergiram na Austrália: o clone *Queensland* (ST93-SCC*mec* IV e geralmente positivo para PVL) e o clone OSPC (do inglês: *Oceania south west pacific clone*; CC30-ST30-SCC*mec* IV, e geralmente positivo para PVL) (UDO *et al.*, 1993; DAILEY *et al.*, 2005). Um caso marcante da emergência de amostras CA-MRSA chamou atenção da comunidade médico-científica no estado de Minnesota, EUA, em 1999. O Departamento de Saúde de Minnesota e o CDC notificaram o óbito de quatro crianças, associado ao desenvolvimento de infecções pulmonares caracterizadas como pneumonia necrotizante com septicemia, as quais foram associadas a um clone específico de CA-MRSA, conhecido como MW2 (do inglês: *Mid-western*), pertencente à linhagem ST1-SCC*mec*IV e produtor de PVL (CDC 2004). No início do ano 2000,

houve um crescimento acelerado da detecção de amostras CA-MRSA em todo o mundo e diversas linhagens/clones foram documentadas, inclusive no Brasil (RIBEIRO *et al.*, 2005; DAUM *et al.*, 2010; SKOV *et al.*, 2012). Já no ano de 2006, Klevens e colaboradores descreveram que nos EUA havia dois tipos clonais de CA-MRSA predominantes: os chamados USA300 e USA400, que apresentam padrões de PFGE (eletroforese em gel sob campos elétrico alternados; do inglês: *Pulsed-field Gel electrophoresis*) e MLST bastante distintos. Além disso, ambos foram associados a infecções estafilocócicas severas, como pneumonia e endocardite (KLEVENS *et al.*, 2006).

Amostras pertencentes ao USA300 (CC8-ST8-SCC*mec* IV e geralmente positivo para PVL) já foram descritas causando surtos em diversas localidades dos EUA (DAUM *et al.*, 2010). Um estudo realizado em 11 departamentos de emergência de 11 diferentes cidades dos EUA durante o ano de 2004 observou que 97% das amostras de MRSA comunitárias isoladas de infecções de pele e tecidos moles pertenciam ao clone USA300, apresentando sensibilidade à rifampicina, trimetoprim/sulfametoxazol, clindamicina e tetraciclina (MORAN *et al.*, 2006). Além disso, outro estudo realizado em São Francisco (CA, EUA) em 2004-2005 demonstrou que a incidência dos CA-MRSA em hospitais era 10 vezes maior que amostras de HA-MRSA (316 versus 31 por 100.000 indivíduos) e que o clone predominantemente encontrado era o USA300 (LIU *et al.*, 2008). Em 2008, foi detectada uma variante multirresistente, relacionada ao USA300, causando predominantemente infecções de pele e tecidos moles em homossexuais do sexo masculino (DIEP *et al.*, 2008). Atualmente, nos EUA, o USA300 continua sendo o MRSA mais isolado em serviços de emergência em todo o país (MILLER *et al.*, 2005).

Já o clone MW2 (isolado nos EUA; PVL positivo), foi posteriormente relacionado ao clone WA-1 (isolado na Austrália; PVL negativo) e ao clone USA400 (detectado nos EUA, PVL positivo), pertencentes à linhagem CC1-ST1-SCC*mec* IV (CDC 2004; DE LEO *et al.*, 2010; SCHLIEVERT *et al.*, 2010). Amostras pertencentes ao clone USA400 chegaram a ser os CA-MRSA predominantes nos EUA nos anos anteriores a 2001, porém, sua taxa de isolamento tem diminuído neste país (CDC 2004; DE LEO *et al.*, 2010). Este clone foi também responsável por uma série de infecções no Canadá, em índios americanos e por surtos ocorridos na maternidade de um hospital em Nova Iorque (ROMAN *et al.*, 1997; GROOM *et al.*, 2001; SAIMAN *et al.*, 2003). Apesar da queda em seu isolamento nos EUA, uma incidência elevada (57%) de

USA400 foi observada entre as amostras de MRSA obtidas de uma região rural no Oeste do Alasca (DAVID *et al.*, 2008). Além disso, amostras relacionadas ao clone USA400 continuam sendo detectadas em outros países, em taxas elevadas, como na Austrália, Canadá e Brasil (SCHLEBUSCH *et al.*, 2009; SILVA-CARVALHO *et al.*, 2009; GOLDING *et al.*, 2011).

No Brasil, além da detecção de amostras relacionadas ao USA400, também já foram detectadas outras linhagens relacionadas aos CA-MRSA. Em 2009, foi relatado o primeiro caso de infecção grave (osteomielite generalizada) causada por CA-MRSA no Brasil em uma menina de 10 anos de idade, imunocompetente, sem histórico de passagem por hospitais ou unidades de saúde. A amostra isolada da paciente foi relacionada ao clone USA1100 (ST30), que apresentava sensibilidade a todos os antibióticos não  $\beta$ -lactâmicos (ROZENBAUM *et al.*, 2009). Logo em seguida, outro caso grave e raro, de piomiosite associada à síndrome de compartimento causada por uma cepa pertencente ao USA1100 foi descrito no Rio de Janeiro, em uma criança anteriormente sadia (DE ARAÚJO *et al.*, 2010). Clones apresentando ST30 têm sido isolados em todo o mundo, incluindo países de todos os continentes (SKOV *et al.*, 2012).

Outras linhagens não menos importantes de CA-MRSA têm sido detectadas em diferentes regiões do mundo. Apesar do clone USA300 ter sido isolado em alguns países europeus, a linhagem CA-MRSA mais predominante atualmente na Europa é a CC80-ST80-SCC $_{medV}$  (clone europeu) (LAMY *et al.*, 2012). Já na Ásia e na região do Pacífico, incluindo Austrália e Taiwan, tem sido detectada, com frequência, a linhagem CC59-ST59. Em vários países, casos de infecções por CA-MRSA foram relacionados a apenas pequenos surtos ou série de casos, enquanto que nos EUA, Taiwan, Canadá e Austrália, os CA-MRSA tornaram-se endêmicos em certas populações (O'BRIEN *et al.*, 1999; DAUM *et al.*, 2010). Em Taiwan, por exemplo, a taxa de infecções por CA-MRSA em crianças aumentou significativamente de 9,8% em 1999-2000 para 56% em 2004-2005 (CHEN; HUANG, 2009). A maior prevalência de colonização por CA-MRSA encontrada em amostras isoladas de diversos sítios anatômicos foi de 46% (18/43 pacientes), em um vilarejo do Oeste da Austrália (O'BRIEN *et al.*, 1999). Infelizmente, poucos estudos sobre ocorrência de CA-MRSA são relatados no Brasil e, dessa forma, pouco também se sabe sobre as linhagens envolvidas e sua

prevalência em nosso meio (RIBEIRO *et al.*, 2007; SILVA-CARVALHO *et al.*, 2009; DE ARAÚJO *et al.*, 2010).

### 2.2.3. MRSA associados a infecções em cães

Devido à emergência de infecções comunitárias por MRSA, vários pesquisadores têm se interessado pela pesquisa da presença de MRSA colonizando animais domésticos. Dentre as várias espécies deste gênero, quatro delas merecem destaque na clínica de pequenos animais: *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus pseudintermedius*, *Staphylococcus epidermidis* e *Staphylococcus schleiferi* subsp. *coagulans*.

*S. aureus* estão frequentemente associados a infecções supurativas e são reconhecidos como membros da microbiota da pele de humanos e animais (HOEKSTRA; PAULTON, 2002; CASEY *et al.*, 2007). *S. pseudintermedius* é um residente normal da pele canina saudável (ROSSER, 2006), mas também é sabidamente o principal agente envolvido em infecções nesta espécie hospedeira (BIBERSTEIN *et al.*, 1984; DEVRIESE, 1990; ROSSER, 2006; GANIERE *et al.*, 2005; COX *et al.*, 2006). *S. epidermidis* é membro da microbiota normal de algumas superfícies corpóreas dos animais, mas é pouco relatado como agente causador de doenças em pequenos animais, embora seja identificado como responsável por diversas infecções profundas, em especial em animais imunocomprometidos (LILENBAUM *et al.*, 2000). A espécie coagulase positiva *S. schleiferi* subsp. *coagulans* e a espécie coagulase negativa *S. schleiferi* subsp. *schleiferi* já foram isoladas de pele de cães com piodermite e otite recorrentes (MAY *et al.*, 2005).

Os *S. aureus* são capazes de colonizar o revestimento capilar de caninos saudáveis, mas a frequência de isolamento desta bactéria, em cães e gatos, era geralmente baixa, sendo tipicamente observada em menos de 10% das amostras. No que diz respeito à colonização por MRSA, em um estudo recente com cães atendidos em hospitais veterinários de cuidados terciários, detectou-se colonização nasal por MRSA em 1% dos 203 cães (HANSELMAN *et al.*, 2008).

A utilização de dispositivos médicos, tais como cateter endovenoso central, próteses ortopédicas, etc., estão associados a infecções persistentes por MRSA. Acredita-se que corpos estranhos com grande área superficial aumentam o potencial

para aderência bacteriana e sua perpetuação, devido ao trauma tecidual e à desvitalização causada durante a implantação de dispositivos, aos biofilmes que se formam nos implantes após contaminação bacteriana, com consequente formação de uma barreira mecânica para o sistema imunológico e dificuldade de penetração da droga antimicrobiana (LEONARD; MARKEY, 2008).

### **2.3. Infecções bacterianas em cães**

As infecções de pele podem ser classificadas como primárias ou secundárias, sendo essas últimas muito mais comuns e mais fáceis de serem reconhecidas pela tendência à recidiva (ROSSER, 2006). Diferentes estudos têm demonstrado que espécies de *Staphylococcus* são comumente isoladas da pele de cães saudáveis ou doentes (LILENBAUM *et al.*, 2000; NAGASE *et al.*, 2002; HAUSCHILD; WOJCIK, 2007), sendo *S. pseudintermedius* (anteriormente classificado como *Staphylococcus intermedius*) a principal espécie bacteriana responsável por casos de infecções cutâneas nos cães (SCOTT *et al.*, 2001; ROSSER, 2006). Segundo Scott e colaboradores (2001), as principais infecções bacterianas de pele podem se dividir em três tipos: as infecções bacterianas da superfície, as piodermites superficiais e as piodermites profundas.

Já na etiologia da otite bacteriana incluem membros do gênero *Staphylococcus*, principalmente *S. pseudintermedius*, e bastonetes Gram negativos como *Pseudomonas aeruginosa*, *Proteus mirabilis*, *Klebsiella pneumoniae* e *Escherichia coli* (SCOTT *et al.*, 2001; ROUGIER *et al.*, 2005). Dentre as espécies do gênero *Staphylococcus*, as coagulase-positivas são as mais frequentemente isoladas (PRESCOTT *et al.*, 2002; GARNIERE *et al.*, 2005). *S. pseudintermedius* é comumente encontrado em baixas quantidades em ouvidos normais, e, na presença de fatores predisponentes, multiplicam-se de forma exacerbada (ROUGIER *et al.*, 2005). Esta espécie coagulase-positiva é a mais frequentemente isolada em cães, mas outras espécies de *Staphylococcus* já foram relatadas, tais como *S. aureus*, *S. coagulans*, *S. epidermidis*, *S. simulans*, *S. schleiferi* e *S. saprophyticus* (HOEKSTRA; PAULTON, 2002; NAGASE *et al.*, 2002; MAY *et al.*, 2005).



## 2.4. Caráter zoonótico

A própria definição de zoonoses, como “doenças ou infecções que se transmitem naturalmente, entre os animais vertebrados e o homem, ou vice-versa”, já denota a possível e importante participação dos animais na manutenção destas doenças (ZUBIER *et al.*, 2007).

Amostras de *S. aureus* resistentes à meticilina (MRSA) foram primeiramente relatadas em animais em 1972 (DEVRIESE, 1990) e durante os anos subsequentes houve um número limitado de outros relatos. Nos últimos anos têm ocorrido mais relatos, envolvendo estas cepas resistentes em animais em vários países (FAIRES *et al.*, 2010; QUITOCO *et al.*, 2013; VINCZE *et al.*, 2014).

A literatura científica ainda sugere que os seres humanos podem ter sido a fonte das cepas MRSA encontradas em animais colonizados ou infectados (VAN DUIJKEREN, 2010).

MRSA tem sido isolado a partir de animais de companhia, principalmente gatos e cães, mas também a partir de cavalos e coelhos. Foi observado, em um estudo realizado no Reino Unido, que os MRSA isolados de animais de companhia e seres humanos, que mantinham contato com eles, foram indistinguíveis, através das técnicas de genotipagem utilizadas, sugerindo que estes representantes eram de um mesmo clone. Entretanto, os autores desconheciam a prevalência de MRSA nos animais de companhia, no Reino Unido, e até que ponto os animais poderiam se constituir em um reservatório deste patógeno, e representar um risco para o homem ou para outros animais (MAY *et al.*, 2005).

A transferência de bactérias provenientes dos animais de produção aos criadores e manipuladores destes animais já foi demonstrada, quando comparou-se a carga bacteriana entre suinocultores e indivíduos não associados com criação animal (controle). Neste estudo citado, a taxa de *S. aureus* em cavidades nasais foi significativamente maior nos suinocultores, quando comparados a pessoas que não lidam com os suínos (ARMAND-LEFEVRE *et al.*, 2005). A transmissão de MRSA entre seres humanos e animais tem sido corroborada por vários estudos de genotipagem que têm demonstrado, por exemplo, que cepas isoladas de cães e gatos são, muitas vezes, idênticas àquelas associadas a linhagens humanas de origem comunitária (CA-MRSA). Entretanto, amostras de HA-MRSA também têm sido

isoladas de animais (VAN DUIJKEREN *et al.*, 2004; ZUBIER *et al.*, 2007; WEESE; VAN DUIJKEREN, 2010).

Até o momento, a caracterização molecular das amostras de MRSA, associada à análise epidemiológica, tem sido considerada como o melhor critério para diferenciação das linhagens de MRSA de origem tipicamente hospitalar ou comunitária. A definição do perfil no PFGE, MLST, presença de genes para PVL e tipo *SCCmec* são algumas das análises mais importantes, sob o ponto de vista molecular (DAUM *et al.*, 2010).

## **2.5. Tipagem molecular de MRSA**

Como citado anteriormente, uma característica evolucionária importante de populações de MRSA é a sua distribuição em uma estrutura altamente clonal (FENG *et al.*, 2008). Com base nessa informação, para melhor se estudar a epidemiologia local ou global dos MRSA, diversos métodos de tipagem molecular vem sendo utilizados, como PFGE, e as tipagens baseadas no *SCCmec*, no polimorfismo *spa* (gene que codifica para a proteína A). O PFGE tem sido muito utilizado para analisar surtos e outras situações epidemiológicas, principalmente, em associação com o MLST.

### **2.5.1. Tipagem do *SCCmec***

Um dos primeiros métodos descritos para tipagem do *SCCmec* foi realizado em 2002, por Oliveira e de Lencastre. Este método baseia-se na amplificação de seis *loci* específicos dentro do complexo *mec* (*loci* A, B, C, D, E F) (OLIVEIRA *et al.*, 2002). O *locus* A é específico para o *SCCmec* tipo I, o *locus* B específico para o tipo II; o *locus* C encontrado nos tipos II e III; o *locus* D presente nos tipos I, II e IV; o *locus* E encontrado no tipo III e, por fim, o *locus* F, também específico para o tipo III. Esta estratégia é bastante útil para classificação dos *SCCmec* do tipo I ao IV. Uma atualização desta técnica foi realizada em 2007, por Milheiriço e colaboradores para melhor caracterizar o *SCCmec* tipo IV, além dos tipos V e VI, que foram identificados posteriormente. Além da amplificação de *loci* específicos do complexo *mec*, as regiões J e o complexo *ccr* também são amplificados, aumentando, desta forma, a

especificidade de identificação do SCC*mec*IV, V e VI (MILHEIREÇO *et al.*, 2007). Em seguida, Chen e colaboradores descreveram um novo PCR multiplex para tipagem rápida dos SCC*mec*, de forma a incluir a detecção dos SCC*mec*VII e SCC*mec*VIII (CHEN; HUANG, 2009). Como já ressaltamos, anteriormente, outros tipos SCC*mec* já foram detectados, existindo um total de 11 tipos bem caracterizados para *S. aureus*. Com relação aos demais *Staphylococcus*, não existe uma padronização específica, e o sistema de tipagem do SCC*mec* utilizado para os *S. aureus* é ainda hoje utilizado para as demais espécies do gênero (TURLEJ *et al.*; 2011).

### **2.5.2. Detecção de linhagens internacionais de MRSA baseada em amplificações por multiplex PCR de genes do sistema de restrição e modificação de *S. aureus* (testes RM)**

Recentemente, um teste rápido e menos dispendioso foi desenvolvido por Cockfield e colaboradores (2007) visando alocar os MRSA em complexos clonais (de acordo com o MLST). Este método foi chamado de testes RM (do inglês: *restriction modification tests*) e baseia-se na amplificação de dois genes de *S. aureus* da família *hsdS*: os genes *sau1hsdS1* e *sau1hsdS2* (COCKFIELD *et al.*, 2007). Foi observado que esses genes são bastante conservados entre linhagens de *S. aureus* e que codificam para o sistema de restrição tipo I, desempenhando, portanto, um papel fundamental no controle de trocas genéticas entre esses microrganismos (WALDRON; LINDSAY, 2006). Assim, *sau1hsdS1* e *sau1hsdS2* são marcadores moleculares estáveis e qualquer variação no polimorfismo desses marcadores pode ser um indicativo de uma possível linhagem emergente. Cada gene contém uma região conservada 5' e uma região central e uma extremidade 3' com duas regiões polimórficas entre linhagens diferentes (COCKFIELD *et al.*, 2007). Três ensaios de PCR (testes RM1, 2 e 3) foram desenvolvidos, sendo que cada um contém um iniciador direto e dois reversos. Portanto, cada reação poderá levar a três possíveis resultados (ausência de amplificação ou um dos produtos amplificados). Assim, uma correlação pode ser feita entre o produto obtido nessas reações de PCR e o complexo clonal (CC) no qual cada amostra analisada encontra-se inserido (Tabela 2). Estes CC são referentes aos clones de MRSA mais frequentes em hospitais no mundo todo (CC1, CC5, CC8, CC22, CC30 e CC45).

**Tabela 2.** Complexo clonal (CC) e tamanho esperado dos produtos de amplificação (pb) no teste RM.

Complexo clonal (CC)/ ST (Sequence Typing)	Teste RM 1	Teste RM 2	Teste RM 3	posição dos iniciadores	
	iniciadores <i>fwd</i> : AF, <i>rev</i> : AR22, AR30	iniciadores <i>fwd</i> : AF, <i>rev</i> : AR1, AR45	iniciadores <i>fwd</i> : BF, <i>rev</i> : BR5, BR8	<i>sau1/hsdS1</i>	<i>sau1/hsdS2</i>
CC30 / ST36	203 pb	-	-		
CC22	990 pb	-	-		
CC45	-	722 pb	-		
CC1	-	1037 pb	680 pb		
CC8/239	-	-	680 pb		
CC5	-	-	1071 pb		

Adaptada de Cockfield e colaboradores, 2007.

Como demonstrado na tabela 2, amostras CC30 e CC22 devem apresentar um fragmento amplificado, no teste RM1, de 203 e 990 pares de base, respectivamente. Amostras CC45 apresentarão um produto amplificado de 722 pb no teste RM 2. Cepas que apresentarem fragmentos amplificados em dois testes (RM 2 e RM 3) de 1037 pb e 680 pb, respectivamente, foram classificadas como CC1. Amostras CC8 e CC5 deverão apresentar segmentos amplificados pelo teste RM 3 de 680 pb e 1071 pb, respectivamente.

Estes testes apresentam como vantagens a rapidez com que são realizados, já que a identificação do complexo clonal das amostras é feita através de PCR, que é uma técnica mais rápida quando comparada a um PFGE ou MLST, por exemplo. No entanto, estes testes, assim como o MLST, são incapazes de diferenciar linhagens de um mesmo complexo clonal. Como exemplo, podemos citar os clones USA800 e USA100 que são ST5 e CC5. Para diferenciá-los, é necessária a adição de outro método molecular, como por exemplo, a tipagem *SCCmec*. O USA100 carrega o tipo II enquanto que o clone USA800 carrega o tipo IV. Diferentemente do MLST, esta é uma técnica menos laboriosa e de custo mais acessível.

Assim, o teste RM apresenta claras vantagens no sentido de permitir uma triagem rápida de MRSA, principalmente quando um número elevado de amostras necessita ser testado. A validação de técnicas como estas é de extrema importância dada à relevância do MRSA como um patógeno hospitalar de disseminação global.

### **2.5.3. PFGE**

O PFGE é uma das metodologias mais discriminativas (TENOVER, 1995; MCDOUGAL *et al.*, 2003) e consiste na digestão do cromossomo bacteriano por uma endonuclease de restrição de corte pouco frequente (geralmente a *Sma*I). O DNA fragmentado é depositado em um gel e separado em um aparato de eletroforese de campos elétricos alternados. Os perfis de fragmentação do DNA são geralmente analisados, visualmente, segundo Tenover e colaboradores (1995), tomando-se como base o perfil da amostra mais frequente no surto (amostra epidêmica). Análises de PFGE podem ser também realizadas com o auxílio de softwares de bioinformática, principalmente se um grande número de amostras for analisado (MCDOUGAL *et al.*, 2003). Apesar de esta técnica ser bastante discriminativa e muito utilizada em estudos de surtos e clonalidade, a mesma apresenta algumas desvantagens, como a dificuldade de correlacionar, de forma precisa, os diferentes perfis de fragmentação genômica obtidos em diferentes laboratórios, e o fato de ser laboriosa e de custo elevado.

### **2.5.4. MLST**

O MLST é atualmente um método de tipagem molecular muito utilizado para *S. aureus* e outras espécies bacterianas. Este método fundamenta-se no sequenciamento de regiões internas de 7 genes metabólicos, constitutivamente expressos pela bactéria (*arcC*, *aroE*, *glpF*, *gmk*, *pta*, *tpi* e *yqiL*, no caso dos *S. aureus*). As proteínas codificadas por estes genes estão listadas na tabela 3. Para cada um desses genes, sequências diferentes (com pequenas variações de nucleotídeos) são referidas como alelos. O conjunto formado pelos diferentes alelos, de cada um dos 7 *loci*, fornece o perfil alélico que define, por sua vez, a sequência-tipo (ST) da amostra analisada. Amostras que apresentem o mesmo perfil alélico para 5 dos 7 *loci* são ditas como pertencentes ao mesmo complexo clonal (ENRIGHT *et al.*,

2000). A partir dessa nova abordagem, clones epidêmicos de MRSA, anteriormente nomeados de acordo com a região onde foram primeiramente detectados (como exemplo, o clone USA100) ou de acordo com o grupo de pacientes dos quais foram isolados (como exemplo, o clone pediátrico) passaram a ser designados por sua ST, CC e também pelo seu tipo de SCC*mec* (ENRIGHT *et al.*, 2002; BOYE *et al.*, 2007).

Uma importante vantagem desta técnica é o fato de estar acoplada a um robusto banco de dados, com sequências submetidas de inúmeras instituições do mundo inteiro. No caso de obtermos um perfil de PFGE nunca observado para uma determinada amostra, o MLST pode definir com precisão se o mesmo é referente a algum clone já genotipado por esta técnica ou se representa um novo complexo clonal. No entanto, esta metodologia apresenta algumas desvantagens, primeiramente em relação ao fato de possuir custo elevado, já que envolve o sequenciamento automático de parte de 7 *loci* do genoma de *S.aureus*. Além disso, esta técnica, por si só, não pode diferenciar dois clones que pertençam ao mesmo ST e CC, como os clones USA100 e USA800, que fazem parte do ST5 e CC5. Portanto, é necessária, nestes casos, a adição de uma ou mais metodologias de genotipagem, de forma que clones de MRSA diferentes, tanto sob o ponto de vista epidemiológico como genético, possam ser corretamente discriminados.

**Tabela 3.** Proteínas codificadas pelos genes utilizados na tipagem MLST.

Gene	Proteína
<i>arcC</i>	Carbonato quinase
<i>aroE</i>	Shiquimato desidrogenase
<i>glpF</i>	Glycerol quinase
<i>Gmk</i>	Qualinato quinase
<i>Pta</i>	Acetiltransferase fosfato
<i>Tpi</i>	Triosefosfato isomerase
<i>ygiL</i>	Acetil coenzima A acetiltransferase

Adaptada de Cockfield e colaboradores, 2007.

## 2.6. Espectrometria de massa por tempo de voo através de ionização/desorção a laser assistida por matriz (MALDI-TOF-MS)

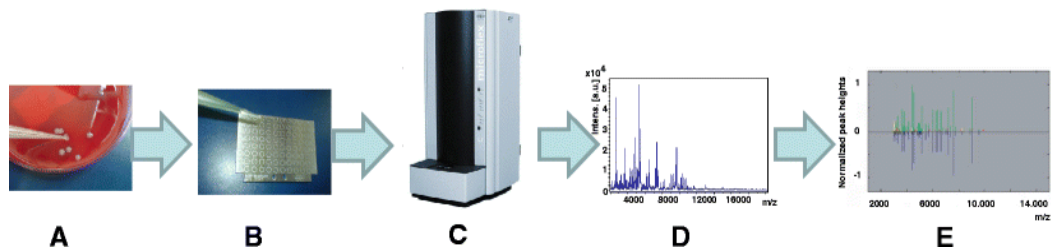
As culturas são métodos extremamente poderosos para identificação de patógenos: um único patógeno viável, em condições adequadas de nutrientes, se multiplica em escala logarítmica amplificando, assim, o número de células, a partir de amostras com pouquíssimas quantidades do agente infeccioso. Entretanto, dependendo do patógeno, culturas podem ser precocemente positivas, dentro de 4 a 6 horas, ou muito demoradas, levando semanas. Além disso, os testes fenotípicos podem demorar mais 24 ou 48 horas. O tempo de hospitalização e os custos de uma internação igualmente diminuem com a identificação precoce da etiologia de uma sepse, por exemplo, (BEEKMANN *et al.*; 2003).

Novos métodos diagnósticos, que não dependam do cultivobacteriano, e que inclusive sejam efetivos para patógenos não viáveis, têm sido desenvolvidos. Um grande progresso é o uso da proteômica para diagnóstico rápido - 5 a 15 minutos - da etiologia de infecções.

A espectrometria de massa é uma técnica utilizada para analisar a razão massa por carga de vários compostos. As primeiras tentativas para identificar microrganismos usando espectrometria de massa foram realizadas na década de 1970. Desde então, diferentes técnicas foram desenvolvidas baseadas em vários sistemas de ionização e detecção. O método de espectrometria de massa mais amplamente utilizado no momento para a análise de biomoléculas se fundamenta em análises de espectros do tempo de voo através de ionização/dessorção a laser assistida por matriz (MALDI-TOF-MS; do inglês: *matrix assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry*) Apenas com a descoberta do MALDI-TOF-MS em 1980, a análise de biomoléculas relativamente grandes, incluindo proteínas ribossomais, se tornou possível (DECRISTOPHORISA *et al.*, 2011).

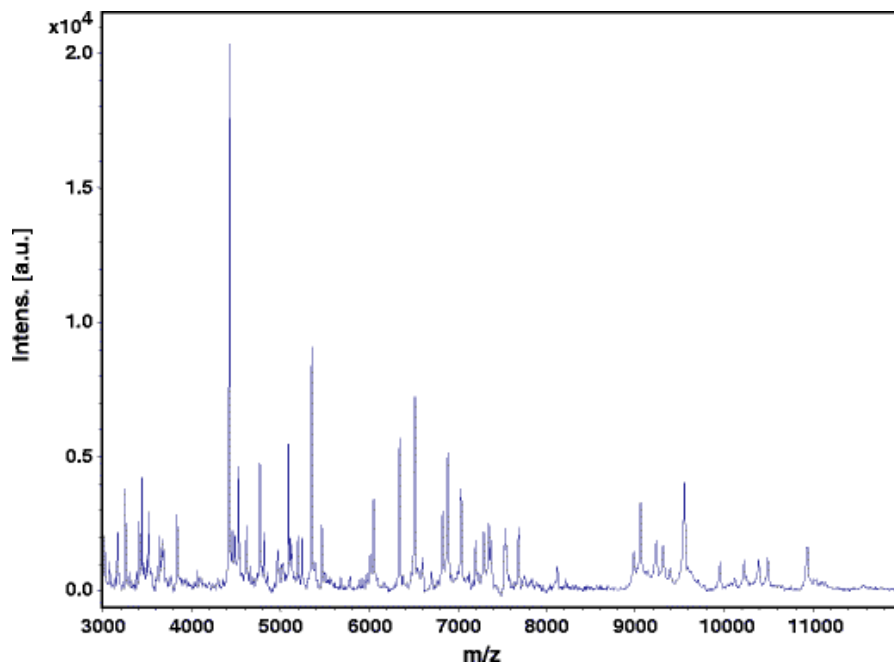
MALDI-TOF-MS tem sido utilizado com sucesso em diversos estudos para identificação de microrganismos através da determinação da massa de proteínas e peptídeos, além de identificar proteínas anteriormente desconhecidas. A técnica de MALDI-TOF-MS (figura 1) consiste num sistema no qual o material biológico (uma colônia ou um concentrado de hemocultura) é colocado em uma placa com uma matriz polimérica. O material é irradiado com laser, levando à vaporização de

proteínas ou peptídeos contidos na amostra, devido à ionização dessas moléculas, as quais são aspiradas em um tubo à vácuo e levadas a um detector; no qual, de acordo com o tamanho da molécula e suas características, o tempo de chegada ao detector (tempo de voo) é diferente. O sinal detectado é representado sob a forma de um gráfico, originando vários picos (espectro) e, para cada espécie bacteriana ou fúngica, obtém-se um espectro específico. Uma base de dados computadorizada interpreta o perfil e fornece o resultado com muita rapidez (figura 2). Trata-se, portanto, de uma nova aplicação da técnica de espectrometria de massa (BENAGLI *et al.*; 2011).



**Figura 1.** Esquema do funcionamento do MALDI-TOF-MS. (a) Colônias bacterianas são adicionadas à solução de matriz e o material é seco ao ar e (b) submetidas ao MALDI-TOF-MS; (c) um espectro de massa específico é obtido a partir dos componentes protéicos bacterianos e (d) a identificação é realizada através da correspondência automática dos espectros de massa gerados (e) com os espectros presentes em um banco de dados





**Figura 2.** Espectro de massa de MALDI-TOF de *Enterococcus faecium*. A gama de medida de 3.000 a 11.000 Da é apresentada. Os picos de massa característicos são predominantemente proteínas ribossomais. Posteriormente, o software integrado ao MALDI compara o padrão de entradas com padrões existentes no banco de dados (Benagli e colaboradores, 2011).

### 3. JUSTIFICATIVA

A possibilidade de cães e gatos atuarem como fonte zoonótica de infecções estafilocócicas em humanos já havia sido sugerida a muito anos. Estudos recentes indicam um aumento do risco de colonização nasal em humanos por *S. aureus*, incluindo indivíduos que trabalham com animais de produção e domésticos (VOSS *et al.*, 2005).

Pelo fato de diversos estudos terem detectado em animais de estimação o predomínio de clones de MRSA que são comuns em humanos, é possível que esses animais tenham se tornado colonizados ou infectados através do contato com humanos; podendo vir a servir como fonte de re-infecção ou re-colonização. Através de uma pesquisa no *site* Pubmed ([www.pubmed.com](http://www.pubmed.com)) não observamos, no Brasil, nenhum estudo envolvendo análises de epidemiologia molecular de amostras de MRSA e MRSP isoladas de cães infectados. Portanto, nenhuma investigação epidemiológica parece ter sido realizada em nosso país sobre a emergência e incidência de clones internacionais de MRSA e MRSP em infecções envolvendo esses animais.

Assim, justifica-se, portanto, a realização de uma pesquisa com a finalidade de determinar, principalmente, a incidência de cepas de MRSA e MRSP em cães, da região norte e noroeste fluminense, e posterior caracterização molecular dessas amostras, visando-se comparar os clones isolados com aqueles obtidos de infecções em humanos, uma vez que esses animais têm sido apontados, em outros países, como possíveis reservatórios de MRSA, podendo assim participar da cadeia epidemiológica de infecções por esse patógeno na comunidade.

## 4. OBJETIVOS

### 4.1. Objetivo geral

Realizar um estudo prospectivo e consecutivo sobre a incidência das principais espécies de *Staphylococcus* em cães suspeitos de infecções estafilocócicas, atendidos no setor de clínica médica de pequenos animais, da Universidade Estadual do Norte Fluminense (UENF), no período de abril de 2011 a maio de 2013 e caracterizar molecularmente as amostras de MRSA e MRSP isoladas, visando-se contribuir para a compreensão dos mecanismos envolvidos na disseminação de clones internacionais nesta comunidade.

### 4.2. Objetivos Específicos

- Identificar em nível de espécie e determinar os padrões de susceptibilidade à antimicrobianos de amostras de *Staphylococcus* sp. isoladas de lesões de pele e de otite de cães atendidos no hospital veterinário da UENF, Campos dos Goytacazes, RJ.
- Detectar a presença do gene *mecA* entre as amostras de *Staphylococcus* sp. Isoladas.
- Realizar a tipagem *SCCmec* para todas as amostras de *Staphylococcus* resistentes à meticilina (MRS) detectadas através de PCR.
- Determinar o perfil de PFGE de amostras de MRSA, visando comparar os pulsotipos obtidos com os padrões de clones internacionais.
- Realizar o MLST para amostras representantes de MRSA e de MRSP.
- Detectar a presença do gene *lukSF* (codificante da PVL) através de PCR em amostras de MRSA.

## **5. MATERIAL E MÉTODOS**

### **5.1. Coleta das amostras**

As amostras de *Staphylococcus* foram isoladas de 124 cães com infecções tópicas (65 com piodermite, 36 com otite, 21 de tumor cutâneo e 2 de feridas cirúrgicas). Os animais incluídos no estudo foram atendidos no setor de clínica médica de pequenos animais do Hospital Veterinário da UENF, na cidade de Campos dos Goytacazes, RJ, no período de abril de 2011 a maio de 2013.

Dos animais com diagnóstico de piodermite, o espécime clínico coletado foi o conteúdo de pústulas íntegras, puncionadas com auxílio de seringas estéreis e agulha fina. Entretanto, em alguns casos em que não havia pústula íntegra, foi coletado o material presente sob as crostas com auxílio de *swabs*, assim como nos casos de tumor cutâneo e ferida cirúrgica. Nos casos de animais com otite, o espécime clínico (secreção auricular) foi coletado com auxílio de *swab* estéril após anti-sepsia no entorno do local da coleta com álcool 70%.

Este estudo foi aprovado (número de protocolo 0033.0.413.000-11) pelo Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos do Instituto Superiores de Ensino (Censa), Campos dos Goytacazes, RJ, Brasil e pela Comissão de Ética para uso e tratamento animal da Universidade Estadual do Norte Fluminense (número de protocolo 145/2011).

### **5.2. Isolamento e identificação de amostras bacterianas**

Após a coleta, os *swabs* foram imediatamente inoculados em meio ágar manitol salgado (Himedia, Mumbai, Índia) e incubados a 37°C por 48h e posteriormente reisolados em ágar sangue desfibrinado de carneiro a 5%, para testes bioquímicos subseqüentes.

A identificação em nível de espécie dos estafilococos foi realizada fenotipicamente de acordo com métodos bioquímicos convencionais, através da análise da morfologia colonial (coloração de Gram), capacidade de fermentação de carboidratos, produção de catalase, coagulase em tubo, e dos testes de desoxirribonuclease, conforme recomendados pela *American Society of Microbiology* (BECKER; VON EIFF, 2011).

### **5.3. Teste da reação em cadeia da polimerase (PCR) para a identificação de *S. pseudintermedius* e *S. aureus***

A identificação das bactérias SIG é de certa forma, problemática devido ao fato de que este grupo de bactérias partilha muitas características fenotípicas com *Staphylococcus aureus* e, entre si (BARON *et al.*, 2004; SASAKI *et al.*, 2010). Além disso, os métodos bioquímicos convencionais podem levar até 48h e estão associados a taxas consideráveis de identificação incorreta (CARROLL *et al.*, 2006). Métodos de reação em cadeia da polimerase (PCR) para a identificação de *Staphylococcus* encontram-se publicados e podem ser utilizados como uma forma rápida, sensível e específica para confirmação das espécies. (SASAKI *et al.*, 2007). Assim, decidimos confirmar, utilizando a técnica de PCR, as amostras SIG e *S. aureus* identificadas através dos testes bioquímicos,

#### **5.3.1. Extração do DNA**

A obtenção de DNA total foi realizada através da técnica de lise térmica descrita por (PACHECO *et al.*, 1997). As amostras foram semeadas, através da técnica de esgotamento, sobre a superfície de uma placa de Petri contendo TSA e após incubação (24 h a 37°C), aproximadamente 1/3 de uma alçada do cultivo foi diluída em 3 mL de tampão TE (Tris-HCl 10 mM, EDTA 1 mM [pH 8,0]). Para a determinação do volume da suspensão de células (V) a ser utilizado na lise térmica, à densidade ótica a 600nm (DO<sub>600</sub>) da suspensão (diluída a 1:10) foi determinada e aplicada à seguinte fórmula:  $V = 80/DO_{600}$ . Posteriormente, o volume calculado foi transferido para um tubo do tipo Eppendorf, o sedimento bacteriano, obtido por microcentrifugação a 2500 x g por 2min, foi diluído com 200µL de TE. Esta suspensão foi fervida por 10min e, posteriormente, centrifugada por 1min sob microcentrifugação a 2500 x g por 2min. O sobrenadante foi então transferido para um novo tubo e estocado a - 20°C, até o momento de uso.

#### **5.3.2. PCR**

As reações de PCR multiplex foram realizadas de acordo com o método de Sasaki e colaboradores (2010). Os primers utilizados para amplificar essas regiões

foram anteriormente descritos pelos mesmos autores e encontram-se na tabela 4. DNA das amostras de MRSA BMB9393 (AMARAL *et al.*, 2005) e da amostra de *S. pseudintermedius* BMBSP02 (QUITOCO *et al.*, 2013), ambas da coleção de nosso laboratório, foram utilizadas como controle positivo na reação da PCR.

**Tabela 4.** Sequência dos iniciadores (pse) para *S. pseudintermedius* e (au) para *S. aureus*, descritos por Sasaki *et al.* (2010), utilizados no multiplex PCR

Iniciador	Seqüência	Tamanho do fragmento (pb)
pse-F2	5' TRGGCAGTAGGATTCGTTAA 3'	926
pse-R5	5' CTTTTGTGCTYCMTTTTGG 3'	
au-F3	5'TCGCTTGCTATGATTGTGG 3'	359
au-nucR	5'GCCAATGTTCTACCATAGC 3'	

#### 5.4. Espectrometria de massa por tempo de vôo através de ionização/desorção a laser assistida por matriz (MALDI-TOF-MS)

Até recentemente, a identificação de cocos gram-positivos era baseada, principalmente, em testes fenotípicos convencionais e demorados. A metodologia de espectrometria de massa por tempo de voo através de ionização/desorção a laser assistida por matriz (MALDI-TOF-MS) tem emergido como uma alternativa rápida e precisa para a identificação de diversas espécies bacteriana. Desta forma, decidimos analisar a eficiência do MALDI-TOF-MS para a identificação de *S. pseudintermedius*, utilizando a sonda de DNA como referência (padrão ouro). Neste estudo, a preparação da amostra para espectrometria de massa foi feita utilizando-se uma

lâmina de aço que continha três grupos de aquisição, e cada grupo de aquisição possuíam 16 poços, possibilitando a análise de 48 isolados diferentes.

MALDI-TOF-MS análises foram realizadas utilizando um espectrômetro de massa Bruker Daltonics Microflex LT operado pelo MALDI FlexControl 3.4 e os MALDI-Biotyper 3.1 softwares. Conforme recomendado pelo fabricante (Bruker Daltonik, Bremen, Alemanha). As amostras foram preparadas por transferência direta estendida (EDT) ou por extração com ácido fórmico (FAE). Resumidamente, para o EDT, com o auxílio de um palito estéril foi realizado um esfregaço (em duplicata) com uma única colônia fresca, de modo a formar uma película fina no alvo de aço polido (MSP 96 target plate; Daltonik, Bremen, Alemanha). Em seguida, um volume (1µL) de ácido fórmico a 70% foi aplicada sobre a amostra e o material seco à temperatura ambiente. Posteriormente, um volume (1µL) da solução matriz (HCCA; alfa-ciano-4-hidroxicinâmico) foi aplicada, o material foi deixado secar, novamente à temperatura ambiente, e analisado por espectrometria de massa, utilizando as configurações recomendadas fabricante (Bruker Daltonik). Resumidamente, para a FAE, a massa bacteriana (retirada com palito estéril) foi suspensa em água destilada (300µL), misturada com etanol absoluto (900µL), e centrifugada a 15.000 g durante 2 min. O sedimento resultante foi ressuspensão em 20µL de uma solução de 70% de ácido fórmico e acetonitrilo  $\geq 99,9\%$  [1:1 (v / v)]. O material foi incubado à temperatura ambiente durante 5 min, e centrifugado a 15.000 g durante 2 min. O sobrenadante (1µL) foi aplicado (em duplicata) no alvo de aço polido, seco à temperatura ambiente, e um volume (1µL) da solução matriz HCCA (ácido alfa-ciano-4-hidroxicinâmico) depositado. Após secagem do material à temperatura ambiente, este foi analisado utilizando as configurações recomendadas pelo fabricante. A identificação em nível de espécie foi assumida, quando o escore logarítmico de identificação (expressando o grau de concordância com o melhor espectro correspondente do banco de dados de referência) atingisse ou ultrapassasse o limiar proposto pelo fabricante de 2.0 (Bruker Daltonik). A cepa DH5α de *Escherichia coli* foi utilizada como um padrão para calibração e espectro de referência para controle de qualidade. Os dados foram obtidos a partir de pelo menos três experimentos independentes, com duas réplicas cada. O teste *t* de Student (dados não pareados) foi utilizado para calcular a significância estatística das diferenças entre os escores médios obtidos utilizando a transferência direta estendida e extração de ácido fórmico.

Adicionalmente, 6 amostras de *S. aureus* deste estudo, identificadas através de testes bioquímicos e moleculares, foram incluídas como controle de qualidade desses experimentos, uma vez que MALDI-TOF-MS tem sido considerado um método preciso para a identificação de *S. aureus* (SCHMIDT *et al.*, 2014).

## **5.5. Testes de susceptibilidade aos antimicrobianos**

### **5.5.1. Método de difusão de disco**

Todas as amostras bacterianas de *Staphylococcus* spp. foram analisadas quanto à resistência aos agentes antimicrobianos pelo método de difusão de disco, segundo as recomendações do *Clinical and Laboratory Standards Institute* para amostras isoladas de animais (CLSI, 2008) e de humanos (CLSI, 2011).

Suspensões bacterianas em solução salina estéril (0,85%), ajustadas em turvação equivalente ao grau 0,5 da escala de McFarland, foram preparadas a partir do crescimento em ágar tripticase soja (Himedia) à 37°C por 24 horas. Posteriormente, as suspensões foram semeadas em placas contendo o meio ágar Mueller Hinton (Difco, New Jersey, EUA) e discos de antimicrobianos (Cefar, São Paulo, Brasil) foram depositados com o auxílio de uma pinça. As placas foram incubadas a 35°C por 24 horas em aerobiose.

Foram utilizados os discos contendo os seguintes antibióticos: trimetropin (1,25 µg) + sulfametoxazol (23,75 µg), gentamicina (10 µg), tetraciclina (30 µg), eritromicina (15 µg), clindamicina (2 µg) e clorafenicol (30 µg), ciprofloxacina (5 µg), penicilina G (10UI), rifampicina (5 µg), teicoplanina (30 µg), vancomicina (30µg), oxacilina (1µg), linezolidina (30µg) e sinercide (15µg) (Cecon Ltda, São Paulo, SP, Brasil). A amostra de *S. aureus*ATCC29213 foi utilizada como controle dos halos dos discos.

## **5.6. Teste de triagem para a detecção de resistência à meticilina (Teste do Met-25)**

Este teste foi realizado de acordo com a metodologia proposta por De Lencastre *et al.* (1994). Uma placa contendo ágar Mueller-Hinton, acrescido de 25 µg/mL de meticilina, foi semeada com 100 µL de um cultivo prévio da amostra em



caldo TSB (contendo  $10^8$ - $10^9$  UFC/mL). Após homogenização do inóculo, com auxílio de uma alça de Drigalski, a placa foi incubada a 35°C por 24-48h. As amostras de *S. aureus* foram classificadas como resistentes à meticilina quando observado qualquer crescimento, em até 48 horas de incubação. Os seguintes microrganismos padrões foram utilizados para controle da acuracidade dos testes: *S. aureus* ATCC 25923 (susceptível à meticilina) e BMB 9393 (resistente à meticilina). A confirmação da resistência à meticilina foi feita através de reação da PCR, conforme descrita a seguir.

## **5.7. Detecção do gene *mecA***

### **5.7.1. Amplificação do DNA**

O DNA obtido por lise térmica, conforme item 5.3.1 foi amplificado pela PCR utilizando iniciadores específicos para um fragmento do DNA, correspondente a regiões internas dos genes de interesse. Foram utilizados os seguintes reagentes, para um volume final de 25µL: 2,0µL da mistura de dNTPs mix (250mM, concentração final de cada dNTP); 1µL de cada iniciador direto e reverso (concentração final de 0.2-0.4µM cada), 0,6µL de Taq DNA polimerase (concentração final de 1,25U; Gibco); 5µL de DNA molde; 2,5µL do tampão da enzima 10x concentrado, 0,4µL de MgCl<sub>2</sub> (concentração final de 50µM) e 12,5 µL de H<sub>2</sub>O bidestilada estéril. As amplificações foram realizadas no termociclador Veriti 96 Well Thermal Cycler (Applied Biosystems, Foster City, CA/USA). Como controle positivo deste experimento foi utilizado DNA da amostra de MRSA BMB9292.

### **5.7.2. Eletroforese convencional de DNA**

Após a amplificação, uma alíquota de 2 µl do marcador de “123 ladder” (Invitrogen, Carlsbad, Califórnia) foi adicionado do corante de corrida contendo glicerol [azul do bromofenol a 0,25% (p/v); xileno-cianol FF a 0,25% (p/v); glicerol a 30% (p/v) em água] e o volume total aplicado em uma canaleta do gel. Uma alíquota de 10 µl do produto da reação do PCR foi também acrescida do corante de corrida. As diluições foram então aplicadas em diferentes canaletas e submetidas à eletroforese, em gel de agarose a 1,5% (p/v) em tampão TAE 1x (Tris-acetato, 40mM; EDTA 1mM,

pH 8,0) a 110v por 90 minutos (SAMBROOK *et al.*, 1989). O gel foi, posteriormente, tratado com brometo de etídio a 0,5µg/ml e os produtos da amplificação foram observados através do sistema de capturação de imagem LumiBis Gel Imager (DNR Bio-Imaging System, Jerusalém, Israel).

## 5.8. Caracterização molecular dos *Staphylococcus* resistentes à metilina

### 5.8.1. Tipagem do SCCmec através de PCR

A tipagem do SCCmec foi realizada somente para as amostras de MRSA. As reações de PCR multiplex foram realizadas de acordo com o método de Boye e colaboradores (2007). DNA foi obtido como no item 5.3.1. Os primers utilizados para amplificar essas regiões foram anteriormente descritos pelos mesmos autores e encontram-se na tabela 5. Os produtos da amplificação foram analisados em gel de agarose, conforme descrito no item 5.7.2. As seguintes cepas de *S. aureus* foram utilizadas como controle-positivo da PCR: USA500 (SCCmec tipo I), USA100 (SCCmec II), BMB9393 (SCCmec IV), USA1100 (SCCmec IV).

**Tabela 5.** Sequência dos iniciadores utilizados no multiplex PCR, descrito por Boye e colaboradores, 2007.

Iniciador	Seqüência	Tamanho do fragmento (pb) <sup>a</sup>
B	5' ATTGCCTTGATAATAGCCYTCT 3'	937
α3	5' TAAAGGCATCAATGCACAAACACT 3'	
ccrCF	5' CGTCTATTACAAGATGTTAAGGATAAT 3'	518
ccrCR	5' CCTTTATAGACTGGATTATTCAAATAT 3'	
1271F1	5' GCCACTCATAACATATGGAA 3'	415

1272R1	5' CATCCGAGTGAAACCCAAA 3'	
5R <i>mecA</i>	5' TATACCAAACCCACAACACTAC 3'	359
5R431	5' CGGCTACAGTGATAACATCC 3'	

<sup>a</sup>Amplificação do DNA das amostras pertencentes ao SCC*mecI* deverão resultar em um produto de 415 pb; das amostras SCC*mecII*, de 937 pb; das amostras do tipo III, de 518 pb; das amostras tipo IV, deverão resultar em dois produtos de 937 pb e de 415 pb, e amostras tipo V deverão também apresentar dois produtos, porém de 518 pb e de 359 pb.

### 5.8.2. Detecção do *loci lukSF-pv* através de PCR

Este teste foi realizado utilizando iniciadores específicos para as duas subunidades da PVL (*lukS-pv* e *lukF-pv*) segundo método descrito por Jarraud e colaboradores (2000). A sequência nucleotídica do iniciador (PVL-1) direto e reverso encontram-se na tabela 6. O DNA foi extraído conforme item 5.3.1. A concentração utilizada de cada iniciador foi de 10µM e as condições de amplificação foram: uma desnaturação inicial de 94°C por 4 min, seguida de 30 ciclos de desnaturação por 30 s à 94°C, anelamento por 60 s à 55°C e extensão por 60 s à 72°C. Ao término dos ciclos, foi realizada uma extensão final de 72°C por 4 min. Os produtos da amplificação foram visualizados conforme descrito no item 5.7.2. O DNA da amostra WB69 foi utilizado como controle positivo.

**Tabela 6.** Relação dos *primers* utilizados para a detecção dos genes de virulência *lukSF*, segundo Jarraud e colaboradores (2000).

Gene	Primer	Sequência 5'-3' (forward / reverse)	Temp (°C)	Amplicon (pb)	Referência
<i>lukS-pv</i>	NewPVL-1	atcattaggtaaaatgtctggacatgatcca	55	406	Vandenesch <i>et al.</i> , 2003
<i>lukF-pv</i>	NewPVL-2	gcatcaagtgtattggatagcaaaagc			

### 5.8.3. Genotipagem das amostras de MRSA através do teste de restrição e modificação (teste RM)

O DNA utilizado nas reações de multiplex PCR para o teste RM foi obtido de acordo com o item 4.2. Três ensaios de multiplex PCR foram utilizados, cada um contendo um iniciador direto e dois diferentes iniciadores reversos. Foram utilizados 0,5 mM de cada iniciador (Tabela 7). As condições para a amplificação foram de uma desnaturação inicial de 94°C por 5 min, seguido de 35 ciclos de 30s a 94°C, 30s a 55°C e 2 min a 72°C (COCKFIELD *et al.*, 2007). Os amplicons obtidos foram visualizados conforme descrito no item 4.4. As amostras BEC e WB69 serviram como controles-positivo dos CC8 e CC30, respectivamente. Já as amostras USA 400 e USA 800 foram utilizadas como controles para os CC1 e CC5, respectivamente. Em relação ao controle positivo do CC45, utilizamos como referência a amostra 08-23.

**Tabela 7.** Iniciadores diretos (*dir*) e reversos (*rev*) que foram utilizados no teste RM, segundo Cockfield e colaboradores (2007).

Iniciador	Tipo	Seqüência
AF	( <i>dir</i> )	5´ AGGGTTTGAAGGCGAATGGG 3´
AR30	( <i>rev</i> )	5´ CAAACAGAATAATTTTTTAGTTC 3´
AR22	( <i>rev</i> )	5´ TACGAGCTCAACAATGATGC 3´
AR45	( <i>rev</i> )	5´ GGAGCATTATCTGGTGTTC 3´
AR1	( <i>rev</i> )	5´ GGGTTGCTCCTTGCATCATA 3´
BF	( <i>dir</i> )	5´ CCCAAAGGTGGAAGTGAAAA 3´
BR8	( <i>rev</i> )	5´ CCAGTTGCACCATAGTAAGGGGTA 3´
BR5	( <i>rev</i> )	5´ TCGTCCGACTTTTGAAGATTG 3´

#### **5.8.4. Eletroforese em gel sob campo pulsado (pulsed-field gel electrophoresis; PFGE)**

O método utilizado neste estudo foi previamente descrito (SOARES *et al.*, 2001) e foi utilizado para a análise da clonalidade das amostras de MRSA isoladas. Resumidamente, bactérias cultivadas em TSB foram emblocadas em agarose de baixo ponto de geleificação (Seakem LE; FMC Bioproducts). Após lise com lisostafina (Sigma) e tratamentos com RNase (Sigma) e proteínase K (Sigma), os blocos foram lavados em tampão TE, e o DNA digerido com a endonuclease de restrição *Sma*I. Ao término da digestão enzimática do DNA, um bloco de cada amostra foi posicionado nas canaletas do gel de agarose preparado a 1% (p/v) em tampão TBE 0,5X. Nos orifícios localizados nas extremidades do gel foram aplicados discos contendo os marcadores de peso molecular "*lambda ladder*" (New England; Biolabs). Após aplicação, as canaletas foram seladas com agarose de baixo ponto de geleificação 0,75% (g/v), em tampão TBE 0,5X. O gel foi submetido à eletroforese em um aparelho CHEF-DR III<sup>®</sup> (BioRad) conforme instruções do fabricante.

Finalizada a separação dos fragmentos de DNA, o gel foi tratado com uma solução de brometo de etídio a 1% (p/v; Sigma) e os fragmentos visualizados em um transiluminador de luz ultravioleta. O registro das bandas separadas pela eletroforese foi realizado utilizando um sistema de captação de imagens. O perfil de PFGE das amostras de MRSA isoladas foram comparados com amostras internacionais de CA-MRSA, circulantes em nosso país: USA 300, USA1100 e USA 400.

#### **5.8.5. Tipagem através do seqüenciamento de multilocus enzimáticos.**

O MLST para os *S. aureus* foi desenvolvido por Enright e colaboradores (2000) e se baseia no seqüenciamento de uma região de cerca de 500 pares de base de sete genes que codificam enzimas conservadas dos *S.aureus* (*housing keeping genes*) e posterior comparação dos alelos com um banco de dados composto de seqüências de cerca de 155 cepas. Todas as etapas dessa metodologia de tipagem foi realizada como descrita na página da Internet <http://saureus.mlst.net/misc/info.asp>.

DNA das amostras foram obtidos de acordo com a metodologia descrita no item 4.2 para amplificação dos fragmentos internos dos genes *arcC*, *aroE*, *glpF*, *gmk*, *pta*, *tpi* e *yqiL* (ENRIGHT *et al.*, 2000) e posterior sequenciamento. Todas as etapas da metodologia do MLST foram realizadas como descrita na página do MLST: <http://saureus.mlst.net/misc/info.asp>. O programa utilizado nas reações de amplificação foi o seguinte: desnaturação de 94°C por 4 minutos, seguido de 30 ciclos de uma desnaturação de 94°C por 30s, anelamento a 55°C por 30 s e uma extensão de 72°C por 90 s. Após o término dos ciclos, foi realizada uma extensão final de 72°C por 4 min. Os iniciadores utilizados foram aqueles descritos no site do MLST, e foram utilizados nas concentrações indicadas.

#### **5.8.5.1. Purificação dos produtos de PCR**

A purificação do produto de PCR foi realizada, utilizando o kit GFX<sup>tm</sup> PCR DNA and Gel Band Purificatin (Amershan Biosciences/ GE Healthcare, Little Chalfont, Reino Unido), de acordo com a recomendações do fabricante. O produto purificado foi visualizado por eletroforese em gel, como descrito no item 4.4. O DNA purificado foi quantificado visualmente, comparando-se a intensidade das bandas do marcador de tamanho *low mass* (Invitrogen, Carlsbad, Califórnia) com as intensidades das bandas obtidas com as diluições realizadas com o DNA amplificado e purificado.

#### **5.8.5.2. Seqüenciamento de DNA**

O seqüenciamento das duas fitas, direta e reversa, foi realizado no seqüenciador automático MegaBACE 1000 (Amersham Biosciences/ GE) utilizando o kit ABI PRISM BigDye Terminator Cycle Sequence Ready Reaction (PE Applied Biosystem). As seqüência obtidas foram editadas utilizando o software Chromas Lite versão 2.0 ([http://www.technelysium.com.au/chromas\\_lite.html](http://www.technelysium.com.au/chromas_lite.html)) e, posteriormente, alinhadas com o lócus ST correspondente, utilizando o programa de bioinformática ClustalW (<http://aling.genome.ip/>) para alinhamentos múltiplos e, estas foram novamente editadas para se aparar a seqüência obtida com o fragmento correspondente utilizado na tipagem ST do gene específico. Posteriormente, as seqüência editadas dos sete *loci* foram submetidas ao site MLST para análise (<http://saureus.mlst/misc/info.asp>).

## 6. RESULTADOS

### 6.1. Distribuição de espécies de *Staphylococcus* de acordo com os testes bioquímicos

A identificação fenotípica, realizada através de métodos bioquímicos convencionais, foi feita para as 124 amostras de *Staphylococcus* de origem canina. De acordo com essa metodologia, dentre as 65 amostras de piodermite, as espécies de *Staphylococcus* coagulase positiva (SCP) foram as mais frequentemente detectadas (n=51; 78,5%), sendo em maior número as alocadas como SIG (n=39; 60%), seguidas de *S. schleiferi* (n=3; 4,6%) e *S. aureus* (n=9; 13,8%). *Staphylococcus* coagulase negativa (SCN) foram isolados em 14 amostras clínicas (21,5%), sendo estes *S. simulans* (n = 4; 6,1%) e *S. epidermidis* (n = 10; 15,5%).

Das 36 amostras de *Staphylococcus* isoladas de otite, os SCP foram os mais frequentemente isolados (n = 25; 69,4%). As amostras SCP isoladas foram SIG (n = 23; 63,9%) e *S. aureus* (n = 2; 5,5%). Já as espécies de SCN (n = 11; 30,6%) foram *S. epidermidis* (n = 7; 19,4%) e *S. simulans* (n = 4; 11,1%).

Entre as 21 amostras de *Staphylococcus* isoladas de tumor cutâneo, os SCP também foram os mais frequentemente isolados (n = 17; 81%). As espécies de SCP identificadas foram SIG (n = 14; 66,7%) e *S. aureus* (n = 3; 14,3%). Em relação aos SCN, a única espécie identificada neste caso foi *S. simulans* (n = 4; 19%).

Finalmente, entre as 2 amostras de *Staphylococcus* isoladas de animais com infecção de sítio cirúrgico, os SCP identificados foram SGI (n=1, 50%) e *S. aureus* (n=1; 50%). Não houve isolamento de SCN neste sítio de infecção. A distribuição de todas as espécies de *Staphylococcus* isoladas está apresentada na tabela 8.

**Tabela 8** – Distribuição das espécies de *Staphylococcus* em amostras isoladas de cães com infecções purulentas, do norte e noroeste fluminense, de acordo com a identificação bioquímica.

Microrganismo	Número de amostras (%)			
	Piodermite	Otite	Tumor cutâneo	Lesão cirúrgica
SCP <sup>1</sup>	51 (78,5%)	25 (69,4%)	17 (81%)	2 (100%)
SIG <sup>2</sup>	39 (60%)	23 (63,9%)	14(66,7%)	1 (50%)
<i>S. schleiferi</i>	3 (4,6%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)
<i>S. aureus</i> <sup>3</sup>	9 (13,8%)	2 (5,5%)	3 (14,3%)	1 (50%)
SCN <sup>4</sup>	14 (21,5%)	11 (30,6%)	4 (19%)	0 (0%)
<i>S. simulans</i>	4 (6,1%)	4 (11,1%)	4 (19%)	0 (0%)
<i>S. epidermidis</i>	10 (15,5%)	7 (19,5)	0 (0%)	0 (0%)
TOTAL	65 (100%)	36 (100%)	21 (100%)	2 (100%)

SCP<sup>1</sup>: *Staphylococcus* coagulase positivos. SIG<sup>2</sup>: todas as amostras SIG foram confirmadas como *S. pseudintermedius* através do PCR para o gene *nuc*. <sup>3</sup> Apenas seis das 14 amostras foram confirmadas como *S. aureus* através do PCR para o gene *nuc*. SCN<sup>4</sup>: *Staphylococcus* coagulase negativos.

## 6.2. Eficiência do MALDI-TOF-MS e do teste bioquímico para a identificação das espécies de *S. pseudintermedius*

No presente trabalho, a eficiência da plataforma MALDI-TOF-MS e dos testes bioquímicos foi avaliada para um total de 49 amostras de *S. pseudintermedius*, utilizando a identificação por PCR como referência (padrão ouro). Utilizando a metodologia TDE na plataforma de MALDI-TOF-MS, apenas poucas amostras alcançaram escore acima de 2,0. Assim, consideramos para as nossas análises apenas os resultados do método FAE. O escore médio de identificação foi de 2,25 ( $\pm$  0,11) e 2,03 ( $\pm$  0,17) para as metodologias TDE e FAE respectivamente. Esta diferença foi estatisticamente significativa ( $p < 0,0001$ ). Assim, utilizando a metodologia FAE, o escore recomendado pelo fabricante de 2,0 (no mínimo), para identificação em nível de espécie, foi alcançado por 54 dos 55 amostras (98,2%). O



maior escore alcançado pela amostra PA 85.1, mesmo depois de três experimentos independentes, foi de 1.974 (Tabela 9).

Portanto, considerando o escore máximo alcançado neste sistema MALDI-TOF-MS, a partir de 49 amostras de *S. pseudintermedius* identificados por PCR, apenas 12 (24,5%) puderam ser corretamente identificados como *S. pseudintermedius*. As outras 37 (75,5%) foram identificadas incorretamente como *S. intermedius*. Todas as 6 amostras de *S. aureus* foram corretamente identificadas, como esperado (Tabela 9).

A identificação bioquímica foi também analisada por comparação com os resultados da PCR. Do total das 55 amostras testadas (incluindo seis *S. aureus*), 21 (38,2%) foram identificadas como *S. pseudintermedius*, 19 (34,5%) como *S. intermedius* e 15 (27,3%) como *S. aureus*. Portanto, a partir destas 49 amostras de *S. pseudintermedius* detectadas pelo método de PCR, apenas 21 puderam ser corretamente alocadas nesta espécie pela abordagem bioquímica, e apenas 12 quando MALDI-TOF-MS foi utilizado, correspondendo a 42,9% e 24,5% das amostras testadas; respectivamente. Além disso, não mais do que 10 dessas 49 amostras (20,4%) puderam ser simultaneamente identificadas como *S. pseudintermedius* pelas três metodologias de identificação.

Entre as seis amostras de *S. aureus* testadas, todas puderam ser identificadas corretamente pelas três técnicas. No entanto, no teste bioquímico, nove amostras identificadas por PCR como *S. pseudintermedius* foram erroneamente classificadas como *S. aureus*, indicando uma especificidade reduzida em relação ao sistema de MALDI-TOF-MS para alocar microorganismos na espécie *S. aureus* (Tabela 9).

Além das 44 amostras de *S. pseudintermedius* utilizadas neste estudo comparativo, às demais amostras classificadas como SIG, nos testes bioquímicos, foram também confirmadas como *S. pseudintermedius* utilizando-se a PCR para o gene *nuc*. Adicionalmente, as três amostras classificadas como *S. scheiliferi* subsp. *coagulans* foram confirmadas através do MALDI-TOF-MS, além de não apresentar amplificação na PCR com primers específicos para *S. aureus* ou *S. pseudintermedius* e produzirem urease. Portanto, de acordo com os testes moleculares, os resultados da classificação das 95 amostras de SCP analisadas corresponderiam a uma percentagem de 90,5% (n=86) para *S. pseudintermedius*, 6,3% (n=6) para *S. aureus* e 3,2% (n=3) para *S. scheiliferi*.

**Tabela 9:** Identificação de *Staphylococcus pseudintermedius*, a partir de infecções caninas purulentas utilizando PCR, método bioquímico convencional e MALDI-TOF-MS.

Isolado	Origem biológica	PCR	Teste bioquímico	MALDI-TOF-MS	MALDI-TOF-MS MSEscore
PA 1.2	Otite	<i>S. pseudintermedius</i>	<i>S. intermedius</i>	<i>S. intermedius</i>	2.055
PA 1.3	Piodermite	<i>S. pseudintermedius</i>	<i>S. pseudintermedius</i>	<i>S. pseudintermedius</i>	2.311
PA 2.1	Otite	<i>S. pseudintermedius</i>	<i>S. pseudintermedius</i>	<i>S. pseudintermedius</i>	2.054
PA 4.1	Otite	<i>S. pseudintermedius</i>	<i>S. intermedius</i>	<i>S. intermedius</i>	2.173
PA 4.2	Otite	<i>S. pseudintermedius</i>	<i>S. intermedius</i>	<i>S. intermedius</i>	2.334
PA 6.2	Otite	<i>S. aureus</i> *	<i>S. aureus</i>	<i>S. aureus</i>	2.469
PA 8.1	Tumor cutâneo**	<i>S. pseudintermedius</i>	<i>S. pseudintermedius</i>	<i>S. pseudintermedius</i>	2.154
PA11.1	Otite	<i>S. pseudintermedius</i>	<i>S. pseudintermedius</i>	<i>S. pseudintermedius</i>	2.013
PA14.2	Otite	<i>S. pseudintermedius</i>	<i>S. intermedius</i>	<i>S. intermedius</i>	2.311
PA15.1	Tumor cutâneo	<i>S. pseudintermedius</i>	<i>S. intermedius</i>	<i>S. intermedius</i>	2.313
PA16.1	Piodermite	<i>S. pseudintermedius</i>	<i>S. pseudintermedius</i>	<i>S. intermedius</i>	2.209
PA19.1	Tumor cutâneo	<i>S. aureus</i>	<i>S. aureus</i>	<i>S. aureus</i>	2.374
PA21.1	Otite	<i>S. pseudintermedius</i>	<i>S. intermedius</i>	<i>S. intermedius</i>	2.239
PA23.1	Tumor cutâneo	<i>S. pseudintermedius</i>	<i>S. intermedius</i>	<i>S. intermedius</i>	2.216
PA28.1	Piodermite	<i>S. pseudintermedius</i>	<i>S. aureus</i>	<i>S. intermedius</i>	2.146
PA31.1	Otite	<i>S. pseudintermedius</i>	<i>S. pseudintermedius</i>	<i>S. pseudintermedius</i>	2.136
PA36.1	Tumor cutâneo	<i>S. pseudintermedius</i>	<i>S. intermedius</i>	<i>S. intermedius</i>	2.322
PA37.1	Piodermite	<i>S. pseudintermedius</i>	<i>S. aureus</i>	<i>S. pseudintermedius</i>	2.097
PA38.1	Tumor cutâneo	<i>S. pseudintermedius</i>	<i>S. intermedius</i>	<i>S. intermedius</i>	2.223
PA39.1	Tumor cutâneo	<i>S. pseudintermedius</i>	<i>S. intermedius</i>	<i>S. intermedius</i>	2.22
PA41.1	Tumor cutâneo	<i>S. pseudintermedius</i>	<i>S. aureus</i>	<i>S. intermedius</i>	2.391
PA43.1	Piodermite	<i>S. pseudintermedius</i>	<i>S. aureus</i>	<i>S. intermedius</i>	2.384
PA46.1	Otite	<i>S. pseudintermedius</i>	<i>S. aureus</i>	<i>S. intermedius</i>	2.265
PA46.2	Otite	<i>S. pseudintermedius</i>	<i>S. aureus</i>	<i>S. intermedius</i>	2.219
PA47.1	Piodermite	<i>S. pseudintermedius</i>	<i>S. pseudintermedius</i>	<i>S. pseudintermedius</i>	2.005
PA48.2	Otite	<i>S. aureus</i>	<i>S. aureus</i>	<i>S. aureus</i>	2.339
PA49.1	Tumor cutâneo	<i>S. pseudintermedius</i>	<i>S. aureus</i>	<i>S. intermedius</i>	2.172
PA50.1	Piodermite	<i>S. aureus</i>	<i>S. aureus</i>	<i>S. aureus</i>	2.386
PA51.1	Tumor cutâneo	<i>S. pseudintermedius</i>	<i>S. pseudintermedius</i>	<i>S. pseudintermedius</i>	2.219
PA52.1	Piodermite	<i>S. pseudintermedius</i>	<i>S. pseudintermedius</i>	<i>S. intermedius</i>	2.205
PA56.1	Piodermite	<i>S. pseudintermedius</i>	<i>S. intermedius</i>	<i>S. intermedius</i>	2.339
PA57.1	Piodermite	<i>S. pseudintermedius</i>	<i>S. intermedius</i>	<i>S. intermedius</i>	2.099
PA60.1	Lesão cirúrgica***	<i>S. aureus</i>	<i>S. aureus</i>	<i>S. aureus</i>	2.386
PA61.1	Tumor cutâneo	<i>S. pseudintermedius</i>	<i>S. pseudintermedius</i>	<i>S. intermedius</i>	2.263
PA62.1	Lesão cirúrgica	<i>S. pseudintermedius</i>	<i>S. intermedius</i>	<i>S. intermedius</i>	2.382
PA66.1	Piodermite	<i>S. aureus</i>	<i>S. aureus</i>	<i>S. aureus</i>	2.379
PA67.2	Tumor cutâneo	<i>S. pseudintermedius</i>	<i>S. intermedius</i>	<i>S. intermedius</i>	2.223
PA70.1	Piodermite	<i>S. pseudintermedius</i>	<i>S. pseudintermedius</i>	<i>S. intermedius</i>	2.278
PA71.1	Piodermite	<i>S. pseudintermedius</i>	<i>S. pseudintermedius</i>	<i>S. pseudintermedius</i>	2.343
PA72.1	Piodermite	<i>S. pseudintermedius</i>	<i>S. pseudintermedius</i>	<i>S. intermedius</i>	2.322
PA76.1	Piodermite	<i>S. pseudintermedius</i>	<i>S. intermedius</i>	<i>S. intermedius</i>	2.403
PA78.0	Otite	<i>S. pseudintermedius</i>	<i>S. intermedius</i>	<i>S. intermedius</i>	2.186
PA77.1	Otite	<i>S. pseudintermedius</i>	<i>S. pseudintermedius</i>	<i>S. pseudintermedius</i>	2.387
PA82.1	Tumor cutâneo	<i>S. pseudintermedius</i>	<i>S. pseudintermedius</i>	<i>S. intermedius</i>	2.353
PA85.1	Piodermite	<i>S. pseudintermedius</i>	<i>S. pseudintermedius</i>	<i>S. intermedius</i>	1.974
PA86.1	Otite	<i>S. pseudintermedius</i>	<i>S. pseudintermedius</i>	<i>S. intermedius</i>	2.243
PA91.1	Piodermite	<i>S. pseudintermedius</i>	<i>S. intermedius</i>	<i>S. intermedius</i>	2.332
PA91.2	Otite	<i>S. pseudintermedius</i>	<i>S. aureus</i>	<i>S. intermedius</i>	2.312

PA91.3	Otite	<i>S. pseudintermedius</i>	<i>S. aureus</i>	<i>S. intermedius</i>	2.21
PA92.1	Piodermite	<i>S. pseudintermedius</i>	<i>S. pseudintermedius</i>	<i>S. intermedius</i>	2.353
PA96.1	Piodermite	<i>S. pseudintermedius</i>	<i>S. intermedius</i>	<i>S. pseudintermedius</i>	2.132
PA97.2	Piodermite	<i>S. pseudintermedius</i>	<i>S. intermedius</i>	<i>S. intermedius</i>	2.307
PA101.1	Otite	<i>S. pseudintermedius</i>	<i>S. pseudintermedius</i>	<i>S. intermedius</i>	2.301
PA121.1	Tumor cutâneo	<i>S. pseudintermedius</i>	<i>S. pseudintermedius</i>	<i>S. intermedius</i>	2.324
PA124	Piodermite	<i>S. pseudintermedius</i>	<i>S. pseudintermedius</i>	<i>S. pseudintermedius</i>	2.118

\**S. aureus* foram adicionados como controle do teste. \*\*Tumor cutâneo: Infecção em tumor cutâneo; \*\*\*Lesão cirúrgica: Infecção de sítio cirúrgico.

### 6.3. Determinação de resistência aos agentes antimicrobianos

Quando a resistência aos diversos agentes antimicrobianos foi investigada para as 124 amostras do estudo, nenhuma delas apresentou resistência a todas as drogas testadas. Os resultados para cada antimicrobiano utilizado estão descritos nas tabelas 10 e 11.

Considerando-se todas as amostras de *Staphylococcus* sp. taxas superiores a 40% de resistência foram observadas para a eritromicina (48,3%), penicilina (45,9%), clindamicina (42,7%) e tetraciclina (37,9%). Taxas de resistência também importantes, entre 20 e 40%, foram observadas para sulfametoxazol-trimetoprima e tetraciclina. Já as menores taxas de resistência foram observadas para a oxacilina, gentamicina, ciprofloxacina, cloranfenicol, rifampicina e teicoplanina, sendo estas menores que 15% (Tabela 10).

Ao analisarmos a suscetibilidade aos antimicrobianos para cada espécie isolada, verificou-se que dentre as amostras de *S. pseudintermedius*, da mesma forma, resistências à penicilina (52,3%) e à eritromicina (51,1%) foram observadas em um maior número de amostras, seguidas da resistência à clindamicina (40,6%). As menores taxas de resistência (inferiores a 10%) também foram observadas para a gentamicina, cloranfenicol, rifampicina e teicoplanina. Além disso, nenhuma amostra apresentou resistência à vancomicina e à linezolida (Tabela 11).

**Tabela 10**– Percentual de resistência a antimicrobianos, determinado através método de difusão a partir de discos, de amostras de *Staphylococcus* spp. isoladas de cães com infecções purulentas, do norte e noroeste fluminense, RJ, Brasil (2011-2013).

Agente antimicrobiano	Número de amostras resistentes (%)				
	Piodermite (n=65)	Otite (n=36)	Tumor cutâneo (n=21)	Lesão cirúrgica (n=2)	Total
Eritromicina	38 (58,4%)	17 (47,2%)	5 (23,8%)	0 (0%)	60 (48,3%)
Penicilina	32 (49,2%)	19 (52,7%)	5 (23,8%)	1 (50%)	57 (45,9%)
Clindamicina	23 (35,3%)	18 (50%)	11 (52,3%)	1 (50%)	53 (42,7%)
Tetraciclina	21 (32,3%)	13 (36,1%)	12 (57,1%)	1 (50%)	47 (37,9%)
Sulfametoxazol/ Trimetoprima	21 (32,3%)	15 (41,6%)	5 (23,8%)	0 (0%)	41 (33%)
Oxacilina	6 (9,2%)	4 (11,1%)	6 (28,5%)	1 (50%)	17 (13,7%)
Ciprofloxacina	6 (9,2%)	4 (11,1%)	3 (14,2%)	0 (0%)	13 (10,4%)
Cloranfenicol	4 (6,15%)	3 (8,3%)	0 (0%)	1 (50%)	8 (6,4%)
Teicoplanina	4 (6,15%)	0 (0%)	0 (0%)	1 (50%)	5 (4%)
Gentamicina	2 (3%)	2 (5,5%)	1 (4,7%)	0 (0%)	5 (4%)
Rifampicina	1 (1,5%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	1 (0,8%)
Vancomicina	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)
Linezolida	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)



#### 6.4. Determinação da resistência à metilina

Em relação à detecção de cepas MRS, 17/124 amostras foram identificadas como resistentes à metilina pelos métodos fenotípicos, sendo 6 entre os cães com piodermite, 4 entre os animais com otite, 6 com tumor cutâneo e 1 com infecção de sítio cirúrgico. Adicionalmente, todas as amostras foram submetidas à PCR para detecção do gene *mecA* e confirmação da resistência à metilina. Das 17 amostras MRS isoladas, a maioria (n=13) pertencia ao SIG e foram identificadas pelo PCR como *S. pseudintermedius*. As amostras remanescentes foram identificadas por PCR como *S. aureus* (n = 4).

Definindo multirresistência como a resistência a 3 ou mais classes de antimicrobianos, entre as amostras de MRSA isoladas, 75% (3/4) apresentaram multirresistência (Tabela 12). Com relação às amostras de MRSP, um elevado índice de multirresistência também foi observado (12/13; 92%).

**Tabela 12** – Perfis de resistência antimicrobiana, pelo método de difusão a partir de discos, das amostras de MRS isoladas de cães com infecções purulentas, do norte e noroeste fluminense, RJ, Brasil (2011-2013).

Espécie	Amostra	Origem	Perfil de resistência <sup>a</sup>
<b>MRSA</b>	PA 6.2	Otite	cli-oxa-clo
	PA 19.1	Tumor	cli-tet-sut-oxa
	PA 60.1	Lesão cirúrgica	cli-tec-pen-oxa-cip
	PA 66.1	Piodermite	cli-tet-sut-oxa-clo
<b>MRSP</b>			
	PA 1.3	Piodermite	eri-tet-oxa

PA 52.1	Piodermite	cli-eri-tet-tec-pen-oxa
PA 56.1	Piodermite	pen-sut-cli-eri-oxa
PA 91.1	Piodermite	tet-cip-pen-oxa
PA 124	Piodermite	cli-eri-tec-pen-oxa
PA 1.2	Otite	cli-eri-tet-oxa
PA 14.2	Otite	tet-sut-pen-oxa
PA 21.1	Otite	sut-cli-eri-pen-oxa
PA 15.1	Tumor	pen-sut-cli-eri-oxa
PA 36.1	Tumor	eri-cip-sut-oxa
PA 39.1	Tumor	tet-oxa
PA 61.1	Tumor	cli-eri-cip-pen-oxa
PA 67.2	Tumor	cli-pen-sut-oxa

---

<sup>a</sup>cip: ciprofloxacina; cli: clindamicina; clo: cloranfenicol; eri: eritromicina; gen: gentamicina; oxa: oxacilina; pen: penicilina; rif: rifampicina; sut: sulfametoxazole/trimetoprim; tei: teicoplanina; tet: tetraciclina. MRSA: do inglês: *methicillin-resistant S. aureus*. MRSP: do inglês: *methicillin-resistant S. pseudintermedius*

## **6.5. Caracterização molecular das amostras de MRSA**

### **6.5.1. Detecção da leucocidina de Panton-Valentine (PVL)**

A presença/ausência dos determinantes genéticos da leucocidina de Panton-Valentine (genes *lukSF*) foi avaliada nas quatro amostras de MRSA isoladas de cães apresentando otite, tumor cutâneo, lesão cirúrgica e piodermite (PA 6.2, PA 19.1, PA 60.1 e PA 66.1, respectivamente). As amostras PA 6.2 e PA 19.1 foram PVL positivas, enquanto as amostras PA 60.1 e PA 66.1 foram PVL negativas (Figura 3).

### **6.5.2. Tipagem do cassete cromossômico estafilocócico**

A tipagem do SCC*mec* identificou o tipo III em duas amostras de MRSA isoladas de lesão cirúrgica e piodermite (PA 60.1 e PA 66.1) e o tipo IV nas outras duas amostras de MRSA PVL positivas isoladas de cães com otite e tumor cutâneo (PA 6.2 e PA 19.1; respectivamente) (Figura 4 e 5).

### **6.5.3. Genotipagem das amostras através do teste RM**

O teste RM foi realizado para cada amostra clínica de MRSA, conforme descrito no item 5.8.3. Através deste teste, todas as amostras de MRSA (4/4, 100%) puderam ser alocadas em complexos clonais (CC) epidêmicos, sendo 1 amostra (PA 6.2) alocada no CC1, 1 amostra alocada no CC30 (PA 19.1) e 2 amostras no CC8 (PA 60.1 e PA 66.1) (Figura 6).

### **6.5.4. Análise dos perfis de fragmentação do DNA genômico pela eletroforese em gel de campo pulsado (PFGE).**

Das seis amostras confirmadas como *S. aureus*, quatro apresentaram o gene *mecA*, e foram analisadas através da técnica de PFGE. Para estas 4 amostras foram identificados três perfis distintos de banda (Figura 7). A amostra isolada de otite (PA 6.2) apresentou perfil semelhante ao clone USA400 (CC1–ST1–SCC*mec*IV–PVL



positiva), com cerca de 4 bandas de diferenças em relação ao protótipo do USA400. Já a amostra isolada de tumor cutâneo (PA 19.1) apresentou perfil idêntico ao clone USA1100 ou OSPC (Oceania Southwest Pacific Clone; CC30–ST30–SCC*meclV*–PVL positiva). Além disso, as amostras isoladas de lesão cirúrgica e piodermite (PA 60.1 e PA 66.1, respectivamente) apresentaram um perfil semelhante ao protótipo do clone BEC (Clone epidêmico brasileiro; CC8–ST239–SCC*meclIII*–PVL negativa), apresentando cerca de 2 diferenças no padrão de bandas.

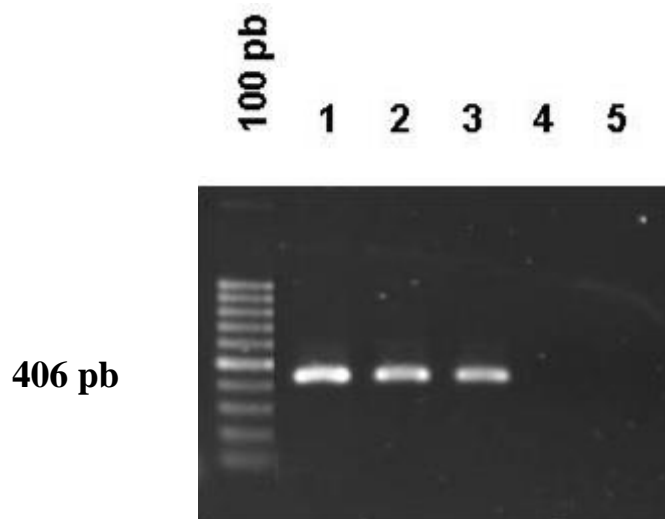
#### **6.5.5. MLST**

Com objetivo de validar os resultados obtidos no teste RM e nas análises de PFGE, as amostras MRSA foram também tipadas através da técnica de MLST. Todos os perfis alélicos obtidos no MLST confirmaram as tipagens moleculares anteriormente utilizadas para todas as amostras de MRSA. Assim, o perfil alélico (2-3-1-1-4-4-3) obtido para as amostras PA 60.1 e PA 66.1 (PFGE semelhante ao BEC, SCC*meclIII* e RM = CC8) correspondeu ao ST239 (CC8). Para a amostra PA 19.1 (PFGE idêntico ao USA 1100, SCC*meclV* e RM = CC30), o padrão alélico obtido no MLST (2-2-2-2-6-3-2) correspondeu ao ST30 (CC30). Por fim, a amostra PA 6.2 (PFGE idêntico ao clone USA400, SCC*meclV* e RM = CC1) apresentou um perfil alélico de MLST (1-1-1-1-1-1-1) correspondente ao ST1 (CC1).

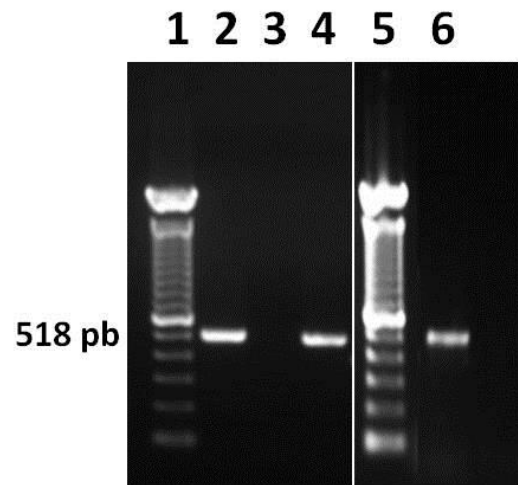
#### **6.6. Caracterização molecular das amostras de MRSP**

Em relação as amostras de MRSP foram selecionadas para a realização do MLST quatro amostras que, além de serem resistentes à oxacilina, também apresentavam resistência a mais de três antibióticos. O perfil alélico (8-24-2-1-7-1-2) obtido para as amostras PA 1.2 e PA 1.3 não correspondeu a nenhum ST presente no banco de dados, por isso um novo ST teve que ser adicionado especialmente para as nossas amostras, que foi então denominado como ST330. Para a amostra PA 96.1, o padrão alélico obtido no MLST foi 5-57-4-1-32-1-2, que também não correspondeu a nenhum ST presente no banco de dados, sendo então classificado como novo ST denominado

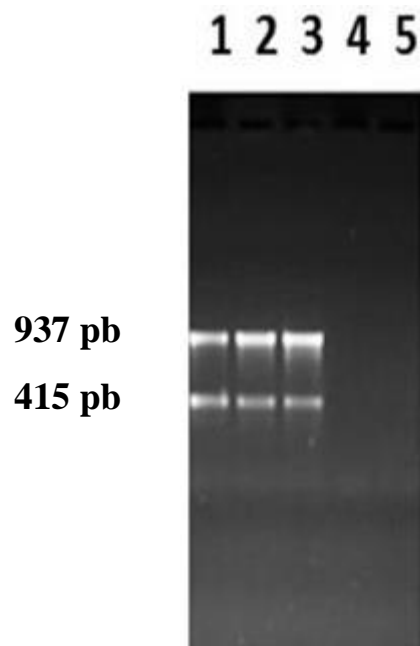
ST355. A amostra PA 124 apresentou um perfil alélico de MLST (3-9-1-2-1-2-1) correspondente ao ST71.



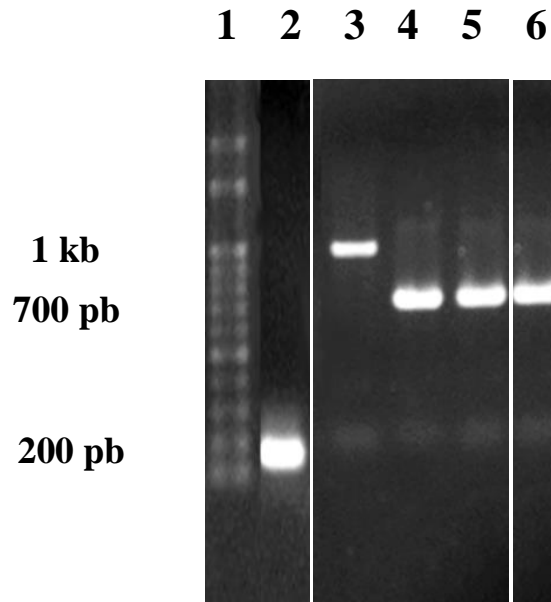
**Figura 3.** Detecção dos determinantes genéticos da leucocidina Panton-Valentine (genes *lukSF*) em amostras de MRSA isoladas de cães com infecções purulentas. **1:** Amostra WB69 (controle positivo para os genes *lukSF*), **2:** Amostra PA 6.2 e **3:** Amostra PA 19.1 (positivas para *lukSF*). **4:** Amostra PA 60.1 e **5:** Amostra PA 66.1 (negativas *lukSF*). 100 bp: Padrão de tamanho molecular 100pb.



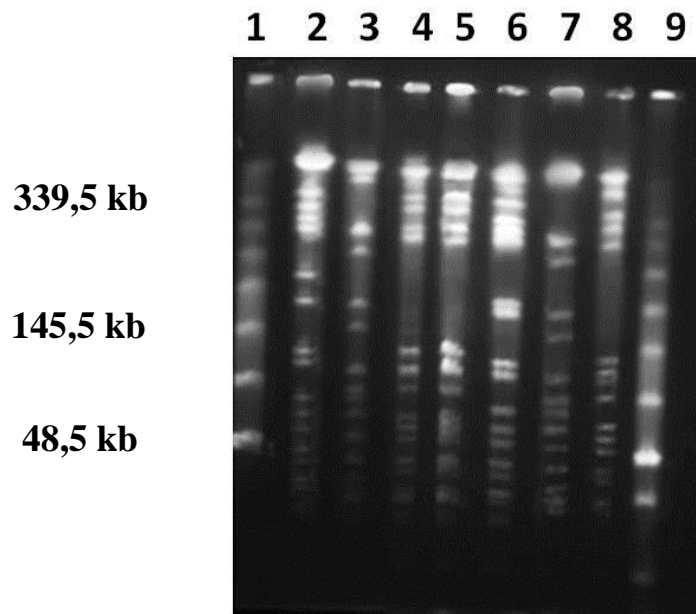
**Figura 4.** Detecção do *SCCmecIII*, através de PCR, para as amostras de MRSA PA 66.1 e 60.1, isoladas de cães com infecções purulentas. **1:** padrão de tamanho de DNA 100pb. **2:** Amostra BMB9393 (controle positivo para *SCCmecIII*, apresentando a banda de 518 pb com os primers específicos para *SCCmecIII*). **3:** Canaleta vazia. **4:** Amostra PA 66. **5:** padrão de tamanho de DNA 100pb. **6:** Amostra PA 60.



**Figura 5.** Tipagem de *SCCmecIV* para amostras de MRSA PA 6.2 e 19.1, isoladas de cães com infecções purulentas. **1:** Amostra WB69 (controle positivo para o *SCCmecIV*, apresentando as bandas esperadas de 937 pb e de 415 pb para o *SCCmecIV*. **2:** Amostra PA 6.2 e **3:** Amostra PA 19.1 (positivas o *SCCmecIV*). **4:** Amostra PA 60.1(negativa para *SCCmecIV*) e **5:** Amostra PA 66.1 (negativa para *SCCmecIV*).



**Figura 6.** Detecção do teste RM, através de PCR para amostras de MRSA isoladas de cães com infecções purulentas. **1:** Padrão de tamanho molecular 100 pb. **2:** Amostra PA 19.1 alocada no CC30 (fragmento amplificado no teste RM1, de 203pb). **3 e 4:** Amostra PA 6.2 alocada no CC1 [fragmentos amplificados em dois testes (RM 2 e RM 3) de 1037 pb e 680 pb, respectivamente]. **5 e 6:** Amostras PA 60.1 e 66.1, respectivamente, alocadas no CC8 (apresentando fragmento amplificado pelo teste RM 3 de 680 pb).



**Figura 7.** Perfis de bandas do PFGE das amostras de MRSA isoladas de cães com infecções purulentas. **1 e 9:** Padrão de tamanho de bandas de DNA *lambda ladder*. **2:** Amostra PA 6.2 (semelhante ao padrão do clone USA400). **3:** Amostra PA 19.1 (idêntica ao padrão do clone USA1100). **4:** Amostra 60.1 (semelhante ao padrão do clone BEC). **5:** Amostra 66.1 (semelhante ao padrão do clone BEC). **6:** Amostra protótipo do clone de CA-MRSA USA400. **7:** Amostra WB69, protótipo do clone de CA-MRSA USA1100. **8:** Amostra BMB 9393, protótipo do clone de HA-MRSA BEC.

## 7. DISCUSSÃO

No presente estudo, a distribuição de espécies de *Staphylococcus* foi analisada em cães apresentando piодermite, otite, lesão cirúrgica e tumor cutâneo.

SCP foi o grupo de microrganismos mais freqüentemente isolados, correspondendo a 95 de 124 (76,6%) das amostras, e SCN foi isolado em 29 amostras clínicas (23,4%). Outros estudos têm relatado da mesma forma, taxas elevadas de SCP em infecções caninas. Por exemplo, Ravens e colaboradores (2014), na Austrália, estudando 27 cães com infecções bacterianas na pele isolaram SCP de 100% dos animais analisados. No Brasil, Penna *et al.* (2013) observaram que das 254 amostras de estafilococos obtidas de piодermite caninas, 113 (57,9%) eram SCP e 82 (42,1%) SCN. Resultados bastante semelhantes foram obtidos por Hariharan e colaboradores (2014), que avaliaram 66 casos de piодermite canina, no período de 2 anos, em Granada, Índias Ocidentais, no total de 116 amostras, 62 (53,5%) eram Gram-positivas, e 54 (46,5%) eram Gram-negativas.

Neste trabalho, as 95 amostras de SCP foram classificadas como *Staphylococcus pseudintermedius* (86; 90,5%), *S. aureus* (6; 6,3%) e *S. schleiferi* (3 3,2%). Observamos também, em nosso estudo, baixas taxas de isolamento da espécie *S. aureus*. Apesar de não ser a principal espécie isolada de cães, taxas mais elevadas têm sido observadas em diversos estudos em outros países e no Brasil (FAIRES *et al.*, 2010; LOEFFLER; LLOYD, 2010; PENNA *et al.*, 2009). Porém, infecções por *S. aureus* não foram observadas nos 27 cães com piодermite estudados, recentemente, na Austrália (RAVENS *et al.*, 2014).

No documento aqui apresentado, a acuracidade de uma plataforma de MALDI-TOF-MS foi avaliada, utilizando como o método de referência a detecção do gene *nuc* por PCR. A metodologia MALDI-TOF-MS permitiu a identificação precisa das seis amostras controle de *S. aureus* utilizadas, com sensibilidade e especificidade de 1,00. Embora a especificidade estimada do MALDI-TOF-MS para classificar as amostras de *S. pseudintermedius* também tenha sido de 1,00, uma menor sensibilidade de 0,24 foi observada (IC 95%: 0,13-0,39); correspondente a uma precisão (acurácia) de apenas 0,33% (IC 95%: 0,21-0,47).

Utilizando o mesmo equipamento, Bruker Biotyper, e método FAE, Schmidt e colaboradores (2014) através de MALDI-TOF-MS identificaram 69 de 91 (76%) dos *S.*



*pseudintermedius* testados. Embora longe de ser a ideal, esta taxa foi significativamente maior do que a observada em nosso estudo. No entanto, uma vez que aqueles autores não relataram a detecção de nenhuma amostra de *S. intermedius* no estudo citado (mesmo que não tenhamos como confirmar tal premissa), é possível que todas as amostras de *S. intermedius* identificadas pelo MALDI-TOF-MS tenham sido consideradas pelos autores, do citado estudo, como sendo *S. pseudintermedius*. Apesar das constantes novas descobertas taxonômicas, permanece o consenso de que o *S. pseudintermedius* é o principal agente etiológico das piодermites superficiais em cães (BANNOEHR; GUARDABASSI, 2012; BOND; LOEFFLER, 2012; DUIJKEREN *et al.*, 2011; FITZGERALD, 2009).

A recomendação de que todas as amostras de *S. intermedius* isoladas de infecções cutâneas caninas sejam renomeadas como *S. pseudintermedius* é relativamente recente, o que poderia explicar, pelo menos em parte, as limitações apresentadas pelo banco de dados do MALDI-TOF-MS para diferenciar essas duas espécies. As instruções do fabricante (Bruker, Alemanha) recomendam que se deva considerar apenas a identificação em nível de espécie (como altamente provável) quando o resultado de MALDI-TOF-MS alcançar uma pontuação acima de 2,3 [nossa média foi de 2,25 ( $\pm$  0,11) e somente 20 (40,8%) entre as amostras de *S. pseudintermedius* testadas alcançaram uma pontuação superior ao escore de 2,3]. Portanto, mesmo quando três ou mais experimentos independentes foram realizados, utilizando o FAE, as pontuações não atingiram 2,3 para muitas das amostras testadas.

Além disso, também foram comparados os dados de MALDI-TOF-MS com aqueles obtidos para os testes bioquímicos. No entanto, em nível de espécie, a concordância entre MALDI-TOF-MS e o método bioquímico convencional foi de 61,8% (34/55 amostras). De fato, quando estes resultados foram comparados com os dados da PCR para o gene *nuc*, apenas 16 (29,1%) a partir das 55 amostras (incluindo *S. pseudintermedius* e *S. aureus*) puderam ser identificadas concomitantemente pelos três métodos em uma mesma espécie. A identificação bioquímica apresentou uma sensibilidade de 1,00 para amostras de *S. aureus*, mas uma menor especificidade de 0,82 (IC 95%: 0,68-0,91). Na realidade, no caso de *S. aureus*, dois estudos (SZABADOS *et al.*, 2010; SZABADOS *et al.*, 2011) já haviam observado a superioridade da identificação pelo MALDI-TOF-MS em relação aos sistemas

bioquímicos tradicionais. No que se refere à discriminação de *S. pseudintermedius*, o método bioquímico apresentou uma especificidade de 1,00. No entanto, a sensibilidade foi muito baixa, 0,43 (IC 95%: 0,29-0,58), com uma precisão de apenas 0,49 (IC 95%: 0,35-0,63).

Um trabalho recente utilizando a plataforma Bruker Biotyper relatou uma discriminação eficiente de 95,4% para amostras coagulase-negativa, sendo 103 amostras de infecções estafilocócicas intramamárias de bovinos. No entanto, a maioria das amostras testadas (80 amostras) pertencia à mesma espécie, *Staphylococcus chromogenes* (TOMAZI *et al.*, 2014). Utilizando um sistema diferente de MALDI-TOF-MS, Decristophoris e colaboradores (2011) conseguiram uma sensibilidade, especificidade e eficácia consideravelmente superiores para *S. pseudintermedius* de 0,78 (95% CI: 0,60-0,90), de 0,97 (95% CI: 0,86-0,99) e de 0,88 (95% CI: 0,78-0,95); respectivamente. Em seu trabalho, a eficiência global do sistema de identificação proteômica utilizado foi bastante elevada, variando entre 0,88 e 0,99 para *S. pseudintermedius*, *S. delphini* e *S. intermedius*, respectivamente. No entanto, estes resultados só foram conseguidos quando os autores criaram novos espectros de referência (SuperSpectra) com base nos picos mais significantes para uma determinada espécie. Na verdade, na plataforma por eles utilizada, o SuperSpectra previamente presente na base de dados levava, quando utilizado, a identificações errôneas dessas espécies.

De fato, no presente trabalho, a plataforma de MALDI-TOF-MS testada permitiu a identificação rápida e precisa do grupo *S. intermedius* e *S. aureus* no prazo de um dia, mas mostrou uma limitação importante para classificar corretamente as amostras SIG na espécie *S. pseudintermedius*, uma vez que a identificação por PCR confirmou que todas as amostras obtidas dos cães infectados classificadas pelo MALDI-TOF-MS, ou mesmo nos testes bioquímicos, como *S. intermedius* eram de fato *S. pseudintermedius*, como sugerido anteriormente (BARDIAU *et al.*, 2013; KANG *et al.*, 2014).

Com relação à resistência a antimicrobianos, estudos de monitoramento entre amostras de *Staphylococcus* spp. têm sido realizados, principalmente para amostras isoladas de humanos. Nos últimos anos, porém, estes estudos têm se intensificado também com relação à resistência para amostras isoladas de animais, devido à sua crescente importância na clínica e à possibilidade de transferência destas bactérias, para humanos e vice-versa (MIDDLETON, 2009). O sucesso do tratamento da

piodermite canina pode, portanto, ficar comprometido, devido ao desenvolvimento de resistência antimicrobiana.

Os dados aqui apresentados apontam como a maior taxa de resistência para a eritromicina (48,3%). Índices elevados de resistência a essa droga foi também observados em estudos realizados por Penna *et al.* (2009; 2010) no Rio de Janeiro, onde 80% ou mais dos *Staphylococcus* sp. isolados de otite externa ou piodermites eram resistentes a esta droga. Tais dados impossibilitam o uso empírico dessa droga para o tratamento de tais infecções em nosso meio. Porém, taxas mais baixas de resistência à eritromicina têm sido observada em estudos recentes com *S. pseudintermedius* e *S. aureus*, em outros países, como Austrália e Zâmbia (RAVENS *et al.*, 2014; YOUN *et al.*, 2014).

Taxas elevadas de resistência à penicilina sensível à ação de beta-lactamases (45,9%), clindamicina (42,7%) e tetraciclina (37,9%) foram detectadas neste estudo. A resistência antimicrobiana de *S. pseudintermedius* às tetraciclinas tem sido documentada na literatura entre as mais prevalentes. Em virtude disso, tais compostos tornaram-se, praticamente, sem valor terapêutico nas piodermites, desde há alguns anos (SCOTT *et al.*, 2001). Lima e colaboradores (2012) detectaram 46,4% de resistência à tetraciclina, a qual, juntamente com as penicilinas, foi apontada entre as maiores taxas de resistência. Yoon e colaboradores (2010) relataram taxas elevadíssimas para resistência à penicilina (95,9%), seguida da tetraciclina (91,9%), em 74 amostras de *S. pseudintermedius* de casos clínicos de piodermite canina e otite externa no Hospital veterinário da Universidade de Konkuk, Coreia. Por sua vez, índices elevados de resistência às penicilinas têm sido também relatados em diversas pesquisas em diferentes países, inclusive Brasil (GANIERE *et al.*, 2005; PEDERSEN *et al.*, 2007; PENNA *et al.*, 2010; ONUMA *et al.*, 2012; PROIETTI *et al.*, 2012). Este resultado era esperado devido à produção de  $\beta$ -lactamases por grande parte dos *Staphylococcus* spp., as quais hidrolisam o núcleo ativo desses fármacos.

Quanto à associação sulfametoxazol e trimetoprim, neste trabalho, a taxa de resistência global foi de 33% (41/124). Pesquisas conduzidas na Coreia (YOUN *et al.*, 2011) e na Itália (PROIETTI *et al.*, 2012) apontaram 62,6% e 97,1% de *Staphylococcus* sp. resistentes, respectivamente, a essa combinação; enquanto que estudos recentes realizados na África relataram uma percentagem de 18,8% de amostras resistentes a sulfametoxazol-trimetoprima, sendo também no citado relato a maioria das amostras testadas *S. pseudintermedius* (YOUN *et al.*, 2014). Porém,

estudos realizados no Rio de Janeiro, com amostras de *S. pseudintermedius* e *S. aureus*, registraram uma taxa de resistência de 56,4% para esta droga (PENNA *et al.*, 2009). Tais resultados divergentes se justificam, provavelmente, pelos diferentes níveis de exposição da população canina aos antimicrobianos, dependendo da região onde se encontram. O emprego habitual desse fármaco no tratamento de cães acometidos por infecções de pele vem, certamente, induzindo ao surgimento de bactérias resistentes às sulfonamidas ao longo desses anos (GANIERE *et al.*, 2005).

Ao contrário do observado neste estudo, onde os níveis de resistência à gentamicina foram baixos, mais recentemente, alguns poucos estudos têm relatado elevados níveis de resistência à gentamicina, amicacina e enrofloxacina entre amostras de *S. pseudintermedius* (MOODLEY *et al.*, 2014), inclusive no Brasil, onde 68% das amostras de *S. pseudintermedius* isoladas de pioderma e 54.3% de otite externa foram resistentes à gentamicina (PENNA *et al.*, 2009; PENNA *et al.*, 2010). Porém, de forma semelhante aos dados aqui apresentados, Ravens e colaboradores (2014) relataram uma taxa igualmente baixa (3,1%) de amostras de estafilococos resistentes à gentamicina isoladas de infecções superficiais na pele, na Austrália (RAVENS *et al.*, 2014). Ainda que em nosso estudo a susceptibilidade para gentamicina, cloranfenicol e rifampicina tenha se revelado bem mais elevada, o uso dessas drogas é limitado pelo elevado potencial de sérios efeitos adversos e no caso da gentamicina, pela necessidade de administração parenteral (FRANK; LOEFFLER, 2012).

A vancomicina e a linezolida são fármacos de importância terapêutica na medicina humana, especialmente em infecções por estafilococos multirresistentes e resistentes à meticilina. Porém, em medicina veterinária, seu uso, além de não ser comum, deve ser fortemente desencorajado devido a considerações éticas (FRANK; LOEFFLER, 2012). No presente trabalho, nenhuma das 124 amostras apresentou resistência a essas duas drogas. Resultados semelhantes têm sido observados por outros autores, em diversos países, para amostras de estafilococos de origem canina (PENNA *et al.*, 2009; CHAH *et al.*, 2014; PATCHANEE *et al.*, 2014).

O controle de infecções por *Staphylococcus* é muitas vezes difícil, devido aos fenótipos de resistência a antimicrobianos expandidos observados entre certas cepas envolvidas. Neste contexto, ressaltamos a resistência à meticilina, especialmente entre os *S. aureus* (devido sua importância também na medicina humana) e os *S. pseudintermedius* (principal patógeno estafilocócico em infecções caninas), a qual

tem aumentado nos últimos anos tanto na Europa, como América do Norte (VAN DUIJKEREN, 2010; MOODLEY *et al.*, 2014). O que parece alarmante é que certas linhagens de *S. pseudintermedius* resistentes à meticilina (MRSP), principalmente aquelas que apresentam ST71, podem exibir resistência a quase todas as classes de agentes antimicrobianos utilizados em medicina veterinária (RUSCHER *et al.*, 2009; KADLEC *et al.*, 2010; PERRETEN *et al.*, 2010; QUITOCO *et al.*, 2013; MOODLEY *et al.*, 2014).

Desta forma, a emissão de alertas aos veterinários, a pesquisa continuada da susceptibilidade e uma prática terapêutica racional das infecções veterinárias são necessárias, não somente para auxiliar de forma efetiva no tratamento dos animais infectados, como também para evitar o estabelecimento de elevados índices de resistência a drogas entre os patógenos zoonóticos, tanto nos serviços veterinários como na comunidade (FRANK; LOEFFLER, 2012).

É importante observar que os MRS foram somente caracterizados neste trabalho nas espécies de *S. aureus* e *S. pseudintermedius*, representando uma taxa de 3,2% (4/124) e de 10,4% (13/124) respectivamente, corroborando dados encontrados em outros trabalhos, nos quais essas taxas variavam entre 5-10% entre o total de amostras de *Staphylococcus* spp. (GRIFFETH *et al.*, 2008; HANSELMAN *et al.*, 2008; KAWAKAMI *et al.*, 2010; NIENHOFF *et al.*, 2011; YOON *et al.*, 2010). Porém, os dados aqui apresentados chamam atenção pela elevada taxa de MRSA em relação ao número de *S. aureus* isolados. No total, 66,7% (4 das 6 amostras) de *S. aureus* apresentaram resistência à meticilina. Entretanto, esta elevada taxa pode ser reflexo do número reduzido de *S. aureus* isolados em nosso estudo ou, ainda, pelo fato de termos incluído, no estudo, apenas amostras isoladas de animais infectados, e não de animais sadios (colonização). Faires e colaboradores (2010), em um estudo em três hospitais veterinários de referência nos EUA e Canadá, durante os anos de 2001-2007, observaram um total de 40 cães com infecções por MRSA, correspondendo a uma taxa de 33.3% de MRSA em relação a *S. aureus*. Dados bem mais alarmantes sobre a ocorrência de amostras de MRSA isoladas de feridas animais foram relatados por Vincze e colaboradores (2014), em um amplo estudo realizado, recentemente, na Alemanha, incluindo 5.229 amostras clínicas de um total de 1.170 práticas veterinárias. Naquele estudo, amostras de *S. aureus* foram identificadas em 201 swabs (5,8%) caninos, 140 (12,2%) felinos e 138 (22,8%) eqüinos, proveniente de um total de 3.479 feridas em caninos, 1.146 felinos e 604 equinos, respectivamente. As

taxas de MRSA, entre os *S. aureus* analisados, foram de 62,7%, 46,4% e 41,3% para amostras de origem canina, felina e equina, respectivamente. Na Alemanha, foi observado que das 869 amostras provenientes de pequenos animais de uma faculdade de medicina veterinária, amostras de MRSA foram detectadas em 18 cães, quatro gatos, uma cobaia, um coelho, uma tartaruga aquática, um morcego e um periquito, totalizando 3% dos animais; e dos 61 *S. aureus* isolados, 27 (44,3%) eram MRSA (WALTHER *et al.*, 2008). É interessante citar que, em um estudo realizado em um hospital veterinário em Londres, foi observado que 17,9% dos seus funcionários e 9% dos cães internados estavam colonizados por MRSA, cujas cepas eram relacionadas com aquelas isoladas de humanos (LOEFFLER *et al.*, 2005).

*S. pseudintermedius* é o agente etiológico principal de pioderma e outras infecções de tecidos moles em cães e gatos. Nos últimos anos, tem sido relatado um aumento da prevalência de *S. pseudintermedius* resistente à meticilina (MRSP) na medicina veterinária (MOODLEY *et al.*, 2014). No presente trabalho, foram detectadas 13 amostras de MRSP no total de 86 amostras de *S. pseudintermedius* identificadas (15,1%); correspondendo a um total de 10,5% (13/124) cães infectados estudados. Uma percentagem menor foi encontrada por Maluping e colaboradores (2014) em um estudo recente, realizado no Reino Unido, onde se investigou a ocorrência de MRSP a partir de um total de 7.183 amostras clínicas, obtidas de casos de pioderma, otite, infecções de feridas, infecção do trato urinário e mastite em cães, e enviadas ao laboratório ao longo de um período de 15 meses. Naquele estudo, *S. pseudintermedius* foi isolado a partir de 391 (5%) amostras, sendo 20 (5,7%) confirmadas como MRSP. Entretanto, percentagem semelhante à observada neste estudo (10,8%; 21/113 amostras de MRSP) foi obtida por Penna *et al.* (2013), os quais analisaram a presença do *mecA* em amostras de *S. pseudintermedius* isoladas de infecções na pele e otite caninas no Rio de Janeiro.

Estudos já indicaram o potencial de transmissão de amostras MRSA entre cães e seus donos (VAN DUIJKEREN *et al.*, 2004; NIENHOFF *et al.*, 2009) e, mais recentemente, a semelhante capacidade de transmissão zoonótica foi relatada também para amostras MRSP (STEGMANN *et al.*, 2010; PAUL *et al.*, 2011); sendo este últimos microrganismos, cada vez, mais motivo de investigação na medicina veterinária. Recentemente, um trabalho realizado em diferentes países da Europa concluiu que MRSP é um patógeno hospitalar em ambientes veterinários, se comportando de forma similar às linhagens hospitalares de MRSA na medicina

humana (PERRETEEN *et al.*, 2010). Amostras de MRSP têm sido isoladas em diversos países (HANSELMAN *et al.*, 2008; NIENHOFF *et al.*, 2011; MOODLEY *et al.*, 2014) e, devido ao elevado potencial dessas amostras adquirirem multirresistência, monitoramentos constantes devem ser realizados.

Neste estudo detectamos uma amostra multirresistente de MRSP da linhagem pandêmica ST71, a partir de um cão apresentando piодermite. Os recentes relatos sobre a disseminação internacional de amostras multirresistentes de *S. pseudintermedius* dessa linhagem, em diferentes países da Europa, nos Estados Unidos (BARDIAU *et al.*, 2013; GÓMEZ-SANZ *et al.*, 2013; WANG *et al.*, 2012) e, mais recentemente, no Brasil (QUITOCO *et al.*, 2013), levantam importantes preocupações sobre a correta identificação dessa espécie de estafilococos a partir de infecções caninas, uma vez que tanto o teste bioquímico como o MALDI-TOF-MS podem fornecer resultados incorretos.

Em relação à genotipagem das amostras de MRSA, foram detectados, neste estudo, perfis de fragmentação do DNA genômico semelhantes aos dos clones USA400 e OSPC (CA-MRSA), e ao clone BEC (HA-MRSA), através da eletroforese em gel sob campos elétrico alternados (PFGE); resultados estes que foram confirmados pela tipagem do *SCCmec*, testes RM e MLST. Este é o primeiro relato no Brasil da presença de uma amostra USA400 (ST1-*SCCmecIV*) produtora da PVL, uma vez que as amostras relacionadas ao clone USA 400 detectadas anteriormente de infecções humanas, no Brasil, não apresentam esta leucocidina (SILVA-CARVALHO *et al.*, 2009). O clone USA400 é reconhecido como um importante agente associado às infecções comunitárias em humanos. Este clone, anteriormente denominado MW2, foi identificado, inicialmente, como o responsável pelo óbito de quatro crianças, de localidades diferentes dos Estados Unidos, em 1999 (MC DOUGAL *et al.*, 2003), tendo sido também responsável por uma série de infecções no Canadá, em índios norte-americanos, e por surtos ocorridos em uma maternidade de um hospital em Nova Iorque (ROMAN *et al.*, 1997; GROOM *et al.*, 2001; SAIMAN *et al.*, 2003). Atualmente, amostras desse clone continuam circulando nos EUA e no Canadá (WEIR *et al.*, 2012; LI *et al.*, 2014). Adicionalmente, amostras USA 400 vêm sendo detectadas, esporadicamente, em todo o mundo, incluindo variantes PVL-negativas, multirresistentes e tipicamente envolvidas em infecções hospitalares (GROOM *et al.*, 2001; SAIMAN *et al.*, 2003; DEURENBERG; STOBBERINGH, 2008; SILVA-CARVALHO *et al.*, 2009; GENG *et al.*, 2010; FERREIRA *et al.*, 2012). Cabe

aqui observar que, através de análises dos dados epidemiológicos coletados neste trabalho, pudemos inferir que o clone USA400 isolado do cão foi, mais provavelmente, importado dos EUA, uma vez que no histórico do animal constava viagem recente àquele país, em período anterior e próximo à coleta do material clínico. Demonstrando, assim, o potencial papel do animal de estimação na disseminação de linhagens virulentas e pandêmicas de MRSA, através de amplas regiões geográficas.

Outro clone de MRSA isolado de cão, neste trabalho, conhecido como USA 1100 ou OSPC, também está associado às infecções comunitárias em humanos, e vem sendo igualmente detectado em diversas regiões do mundo, com relativa frequência, sendo reconhecido como um clone tipicamente comunitário, apesar de não raramente poder estar associado a infecções relacionadas à assistência à saúde (SILVA-CARVALHO *et al.*, 2009). Amostras USA 1100 geralmente são mais susceptíveis aos antibióticos não beta-lactâmicos, possuem os genes para PVL, SCC*mec* do tipo IV, além de pertencer ao ST30 (RIBEIRO *et al.*, 2007). CA-MRSA USA 1100 já foi relatado causando infecções humanas (de moderadas a graves) em hospitais no Rio de Janeiro e em Porto Alegre (RIBEIRO *et al.*, 2007; SCRIBEL *et al.*, 2009).

Finalmente, as duas outras amostras de MRSA isoladas neste estudo são relacionadas ao clone BEC, o qual tem sido relatado como predominante nos hospitais de nosso país (SOUSA-JÚNIOR *et al.*, 2009; SILVA-CARVALHO *et al.*, 2009). Amostras desse clone não produzem PVL e são consideradas tipicamente amostras hospitalares (HA-MRSA) (ROZENBAUM *et al.*, 2009). Nenhum dos casos de isolamento de MRSA nos cães pôde ser associado a internações hospitalares prévias, tratamentos ambulatoriais prolongados, pacientes sob sistema de home care, ou contato íntimo com profissionais de saúde, considerando os proprietários ou demais moradores da residência.

Estudos como este, aqui apresentado, utilizando abordagens epidemiológica-moleculares, visando analisar a diversidade e relacionamento genético em populações de MRSA de seres humanos e animais, são importantes para se avaliar o papel dos pequenos animais como reservatórios e na disseminação de clones mais resistentes e virulentos de MRSA. A realização de monitoramentos constantes, envolvendo a caracterização molecular de clones resistentes e mais virulentos, permitiria uma avaliação de risco e criação de estratégias de intervenção mais racionais para limitar a propagação, em nosso meio, não somente dos MRSA, mas



também dos MRSP; além de permitir o desenho de protocolos para uma terapia empírica mais eficiente.

## 8. CONCLUSÃO

.Este estudo aponta que microrganismos da espécie *S. pseudintermedius* são os principais patógenos em infecções estafilocócicas caninas na pele e em otites, em cães atendidos no hospital veterinário da UENF, Campos dos Goytacazes, RJ.

.Os dados aqui obtidos corroboram com o fato de que os testes fenotípicos (incluindo o MALDI-TOF-MS) apresentam falhas na identificação da nova espécie *S. pseudintermedius*, e indicam que os testes envolvendo a tecnologia de DNA devem ser utilizados para uma identificação precisa dos mesmos.

.As amostras de estafilococos obtidas apresentaram resistência a diversos antimicrobianos testados, sendo mais susceptíveis a antibióticos como gentamicina, cloranfenicol e rifampicina, os quais são mais tóxicos e, geralmente, de pouco uso na medicina veterinária; além da vancomicina e linezolida que, por motivos éticos, devem ser evitados para uso em animais. Assim, a determinação da susceptibilidade aos antimicrobianos está indicada para o tratamento das infecções estafilocócicas mais graves ou recorrentes.

.O fato do gene *mecA* ter sido detectado em um número considerável de amostras de *S. aureus* (66,7%) e de *S. pseudintermedius* (13,7%), possui, obviamente, sérias implicações para o tratamento das infecções nos animais infectados, cujo potencial de transmissão dessas amostras para humanos não pode ser ignorado.

.A presença de clones pandêmicos de CA- e HA-MRSA (USA400, OSPC e BEC), e MRSP (ST71), entre os cães estudados, sugere que os pequenos animais possam ser fontes importantes de disseminação e emergência de clones internacionais pandêmicos mais resistentes e mais virulentos. A transmissão desses clones de animais para humanos e vice-versa já foi relatada anteriormente.

.Este estudo é o primeiro relatada detecção do clone USA400, produtor de PVL, no Brasil e, através dos dados levantados, pudemos concluir que esta cepa não era, provavelmente, autóctone, mas importada dos EUA.

.O conjunto dos resultados aqui apresentados indicam que estudos, como este, deveriam ser realizados, constantemente, em nosso país, visando o monitoramento continuado da resistência aos antimicrobianos, e da circulação de clones internacionais pandêmicos de MRSA e de MRSP, entre os animais domésticos, como parte das estratégias de controle da disseminação de bactérias multirresistentes e mais virulentas em nosso país.

## 9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AMARAL, M. M., COELHO, L. R., FLORES, R. P., SOUZA, R. R., SILVA-CARVALHO, M. C., TEIXEIRA, L. A., FERREIRA-CARVALHO, B. T., FIGUEIREDO, A.M. **The predominant variant of the Brazilian epidemic clonal complex of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* has an enhanced ability to produce biofilm and to adhere to and invade airway epithelial cells.***J. Infect. Dis.*, v. 192, p. 801-810, 2005.

ARCHER, G. L.; NIEMEYER, D.M. **Origin and evolution of DNA associated with resistance to methicillin in staphylococci.** *Trends in Microbiol.*,v. 2, p. 243-247, 1994.

ARMAND-LEFEVRE, L.; RUIMY, R.; ANDREMONT, A. **Clonal comparison of *Staphylococcus aureus* isolates from healthy pig farmers, human controls, and pigs.***Emerg. Infect. Dis.*, v. 11, p. 711–714, 2005.

BANNOEHR, J.; GUARDABASSI, L. ***Staphylococcus pseudintermedius* in the dog: taxonomy, diagnostics, ecology, epidemiology and pathogenicity.** *Veterinary Dermatology*, v. 23, n. 4, p. 253-266, 2012.

BAPTISTE, K.E.; WILLIAMS, K.; WILLIAMS, N.J.; WATTRET, A.; CLEGG, P.D.; DAWSON, S. **Methicillin-resistant staphylococci in companion animals.***Emerging Infectious Disease*, v.11, p. 1942–1944, 2005.

BARDIAU, M.; YAMAZAKI, K.; OTE, I.; MISAWA, N.; MAINIL, J. G. **Characterization of methicillin resistant *Staphylococcus pseudintermedius* isolated from dogs and cats.***Microbiol Immunol.*, v. 57, n. 7, p. 496-501, 2013.

BARON, F.; COCHET, M. F.; PELLERIN, J. L. **Development of a PCR test to differentiate between *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus intermedius*.** *J. Food Prot.*; v.67, p.2302–2305, 2004.

BECKER, K.; VON EIFF, C. ***Staphylococcus, Micrococcus, and other catalase-positive cocci.*** *Manual of clinical microbiology*, v.1, 10th ed , p. 308-330, 2011.

BEEKMANN, S. E.; DIEKEMA, D. J.; CHAPIN, K. C.; DOERN, G. V. **Effects of rapid detection of bloodstream infections on length of hospitalization and hospital charges.** *J. Clin. Microbiol.*, v.41, n.7, p. 319-325, 2003.

BENAGLI, C.; ROSSI, V.; DOLINA, M.; TONOLLA, M.; PETRINI, O. **Matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry for the identification of clinically relevant bacteria.** *PLoS. One.*v.6, n.1, 2011.

BERGER-BACHI, B.; ROHRER, S. **Factor influencing methicillin resistance in *Staphylococci*.** *Arch. Microbiol.*, v. 178, p. 165-171, 2002.

BERGLUND, C., ITO, T., IKEDA, M., MA, X.X., SÖDERQUIST, B. & HIRAMATSU, K. **Novel type of *Staphylococcal* cassette chromosome *mec* in a methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strain isolated in Sweden.** *Antimicrob. Agents Chemother.*, v. 52, p. 3512-3516, 2008.

BERGLUND, C., ITO, T., MA, X.X., IKEDA, M., WATANABE, S., SÖDERQUIST, B. & HIRAMATSU, K. **Genetic diversity of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* carrying type IV SCC*mec* in Orebro County and the western region of Sweden.** *J Antimicrob. Chemother.*, v. 63, p. 32-41, 2009.

BIBERSTEIN, E .L.; JANG, S.S.; HIRSH, D. C. **Species distribution of coagulase positive staphylococci in animals.** *Journal of Clinical Microbiology*, v.19, p. 610-615, 1984.

BIZZINI, A.; DURUSSEL, C.; BILLE, J.; GREUB, G.; PROD'HOM, G. **Performance of matrix-assisted laser desorption ionization–time of flight mass spectrometry for identification of bacterial strains routinely isolated in a clinical microbiology laboratory's.** *Clin. Microbiol.*, v.48, p.1549-1555, 2010.

BLUNT, C. A.;VAN VUUREN, M.; PICARD, J.**Antimicrobial susceptibility profiles of *Staphylococcus intermedius* isolates from clinical cases of canine pyoderma in South Africa.** *J. S. Afr. Vet. Assoc.*, v. 16, n. 84, 2013.

BOND, R.; LOEFFLER, A. **What`s happened to *Staphylococcus intermedius*? Taxonomic revision and emergence of multi-drug resistance.** *Journal of Small Animal Practice*, v. 56, p. 147-154, 2012.

BOYE, K.; BARTELS, M.D.; ANDERSEN, I.S.; MOLLER, J. A.; WESTH, H. **A new multiplex PCR for easy screening of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* SCCmec types I-V.** *J. Clin. Microb. Infec. Diseases*. v.13, p. 725-727, 2007.

CARROLL, K. C.; BOREK, A. P.; BURGER, C.; GLANZ, B.; BHALLY, H.; HENCIK, S.; FLAYHART, D. C **Evaluation of the BD Phoenix automated microbiology system for identification and antimicrobial susceptibility testing of staphylococci and enterococci.** *J Clin Microbiol.*, v. 44, n.6, p. 2072-2077, 2006.

CASEY, A. L.; LAMBERT, P. A.; ELLIOTT, T. S. J. **Staphylococci.** *International Journal of Antimicrobial Agents*, v. 29, p. 23–32. 2007.

CDC (Centers of Disease Control and Prevention). **Vancomycin-resistant *Staphylococcus aureus* – New York, 2004.** *MMW Morb. Mortal. Wkly. Rep.*, v. 53, p. 322-323, 2004.

CHAH, K. F.; GÓMEZ-SANZ, E.; NWANTA, J. A.; ASADU, B.; AGBO, I. C.; LOZANO, C.; ZARAZAGA, M.; TORRES, C. **Methicillin-resistant coagulase-negative staphylococci from healthy dogs in Nsukka, Nigeria.** *Braz. J. Microbiol.*, n. 18, v. 45, p.215-220, 2014.

CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE (CLSI). **Performance Standards for Antimicrobial Disk and Dilution Susceptibility Tests for Bacteria Isolated From Animals**,, v. 28, n. 8, 2008.

CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE (CLSI). **Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Nineteenth Informational Supplement.** Update M100-S19. Wayne, PA: CLSI; 2011.

CHEN, C. J.; HUANG, Y.C. **Community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in Taiwan.** *J. Microbiol. Immunol. Infect.*,v. 38, p. 376-382, 2009.

COHN, L. A.; MIDDLETON, J. R. **A veterinary perspective on methicillin-resistant staphylococci.** *Journal of Veterinary Emergency and Critical Care*, v. 20,p. 31–45. 2010.

COCKFIELD, J.D.; PATHAK, S.; EDGEWORTH, J. D.; LINDSAY, J.A. J. **Rapid determination of hospital-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* lineages.** *Medical Microb.* v. 56, p. 614-619, 2007.

COX, H. U. Staphylococcal infections. In Greene CE (ed), *Infectious diseases of the dog and cat*, ed 2 WB Saunders, Philadelphia, PA, p. 214-217, 2006.

DAILEY, L.; COOMBS, G. W.; O'BRIEN, F. G.; PEARMAN, J. W.; CHRISTIANSEN, K.; GRUBB, W. B.; RILEY, T. V. **Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* Western Australia.** *Emerg. Infect. Dis.*, v. 11, p. 1584-1590, 2005.

DAUM, R.S.; ITO, T.; HIRAMATSU, K.; HUSSAIN, F.; MONGKOLRATTANOTHAI, K.; JAMKLANG, M.; BOYLE-VAVRA, S. **A novel methicillin-resistant cassette in community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates of diverse genetic backgrounds.** *J. Infect. Dis.*, v. 186, p. 1344-1347, 2010.

DAVID, M.Z., RUDOLPH, K.M., HENNESSY, T. W., BOYLE-VAVRA, S.; DAUM, R.S. **Molecular epidemiology of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* rural Southwestern Alaska.** *Emerg. Infect. Dis.*, v. 14, p. 1693-1699, 2008.

DE ARAÚJO, B.E., BORCHERT, J.M., MANHÃES, P.G., FERREIRA, F.A., RAMUNDO, M.S., SILVA-CARVALHO, M.C., SEABRA, A. C., VICTAL, S. H.; SÁ FIGUEIREDO, A.M. **A rare case of pyomyositis complicated by compartment syndrome caused by ST30-staphylococcal cassette chromosome *mec* type IV methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*.** *Am. J. Emerg. Med.*, v. 28, p. 537-539, 2010.

DECRISTOPHORISA, P.; FASOLAD, A.; BENAGLIA, C.; TONOLLA, M.; PETRINI, O. **Identification of *Staphylococcus intermedius* Group by MALDI-TOF MS.** *Systematic and Applied Microbiology*, v.34, p.45–51, 2011.

DE LEO, F.R., OTTO, M., KREISWIRTH, B. N.; CHAMBERS, H.F. **Community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*.** *Lancet*, v. 375, p. 1557-1568, 2010.

DEURENBERG, R. H.; STOBBERINGH, E. E. **The evolution of *Staphylococcus aureus*.** *Infect. Gen. Evol.*, v. 8, p. 747-763, 2008.

DEURENBERG, R.H.; NULENS, E.; VALVATNE, H.; SEBASTIAN, S.; DRISSEN, C.; CRAEGHS, J.; DE BRAUWER, E. **Cross-Border Dissemination of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*, Euregio Meuse-Rhin Region.** *Emerging Infectious Diseases*, v. 15, n. 5, 2009.



DEVRIESE, L. A. **Staphylococci in healthy and diseased animals.** *Journal of Applied Bacteriology*, v. 69, p. 71-80, 1990.

DEVRIESE, L. A.; VANCANNEYT, M.; BAELE, M.; VANEECHOUTTE, M.; DE GRAEF, E.; SNAUWAERT, C.; CLEENWERCK, I.; DAWYNDT, P.; SWINGS, J.; DECOSTERE, A.; HAESEBROUCK, F. ***Staphylococcus pseudintermedius* sp. nov., a coagulase-positive species from animals.** *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, v. 55, p. 1569-1573, 2005.

DIEP, B.A., CHAMBERS, H.F., GRABER, C.J., SZUMOWSKI, J.D., MILLER, L.G., HAN, L.L., CHEN, J.H., LIN, F., LIN, J., VAN PHAN, T.H., CARLETON, H.A., MCDUGAL, L.K., TENOVER, F.C., COHEN, D.E., MAYER, K.H., SENSABAUGH, G. F.; PERDREAU-REMYNGTON, F. **Emergence of multidrug-resistant, community-associated, methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clone USA300 in men who have sex with men.** *Annals Int. Med.*, v. 148, p. 249-257, 2008.

DUIJKEREN, E.; LUCCHINE, S., LEW, D. P., VAUDAUX, P., KELLEY, W . **Transmission of methicillin-resistant *Staphylococcus pseudintermedius* between infected dogs and cats and contact pets, humans and the environment in households and veterinary clinics.** *Veterinary Microbiology*, v. 150, p. 338-343, 2011.

ENRIGHT, M.; DAY, N.; DAVIES, C.; PEACOCK, S.; SPRAT, B. **Multilocus sequence typing for characterization of methicillin-resistant and methicillin-susceptible clones of *Staphylococcus aureus*.** *J. Clin. Microbiol.*, v. 38, p. 1008-1015, 2000.

ENRIGHT, M.C.; ROBINSON, D.A.; RANDLE, G.; FEIL, E. J.; GRUNDMANN, H.; SPRATT, B.G. **The evolutionary history of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA).** *Proc Natl Acad Sci USA*, v. 99, n. 11, p. 7687–7692, 2002.

FAIRES, M. C.; TRAVERSE, M.; TATER, K. C.; PEARL, D. L.; WEESE, J. S. **Methicillin-resistant and -susceptible *Staphylococcus aureus* infections in dogs.** *Emerg Infect Dis.*, v. 16, p. 69-75, 2010.

FENG, Y.; CHEN, C-H.; SU, L-H.; HU, S.; YU, J.; CHIU, C-H. **Evolution and pathogenesis of *Staphylococcus aureus*: lessons learned from genotyping and comparative genomics.** *FEMS Microbiol Rev.*, v. 32, p. 23-37, 2008.

FERREIRA, F.A., SOUZA, R.R., BONELLI, R.R., AMÉRICO, M.A., FRACALANZZA, S.E. L.; FIGUEIREDO, A.M.S. **Comparison of in vitro and in vivo systems to study *ica*-independent *staphylococcus aureus* biofilm.** *J. Microbiol. Methods*, v. 88, p. 393-398, 2012.

FITZGERALD, J.R.; STURDEVANT, D.E.; MACKIE, S.M.; GILL, S.R.; MUSSER, J.M.; **Evolutionary genomics of *Staphylococcus aureus*: insights in to the origin of methicillin-resistant strains and the toxic shock syndrome epidemic.** *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v. 98, p. 8821–8826, 2001.

FITZGERALD, J.R. **The *Staphylococcus intermedius* group of bacterial pathogens: species re-classification, pathogenesis and the emergence of methicillin resistance.** *Veterinary Dermatology*, v. 20, p. 490-495, 2009.

FRANK, L.; LOEFFLER, A. **Meticillin-resistant *Staphylococcus pseudintermedius*: clinical challenge and treatment options.** *Veterinary Dermatology*, v. 23, n. 56, 2012.

GALES, A. C.; SADER, H. S.; RIBEIRO, J.; ZOCCOLI, C.; BARTH, A.; PIGNATARI, A.C. **Antimicrobial susceptibility of Gram-positive bacteria isolated in Brazilian hospitals participating in the SENTRY program (2005-2008).** *Braz. J. Infect. Dis.*, v. 13, p. 90-98, 2009.

GARNIERE, J.P.; MEDAILLE, C.; MANGION, C.; **Antimicrobial drug susceptibility of *Staphylococcus intermedius* clinical isolates from canine pyoderma.** *B, Infectious diseases and veterinary public health*, v. 52, p. 25–31, 2005.

GARZONI, C., FRANÇOIS, P., HUYGHE, A., COUZINET, S., TAPPAREL, C., CHARBONNIER, Y., RENZONE, A., LUCCHINE, S., LEW, D. P., VAUDAUX, P., KELLEY, W. & SCHRENZEL, J. **A global view of *Staphylococcus aureus* whole genome expression upon internalization in human epithelial cells.** *BMC genomics*, v. 8, p. 1-14, 2007.

GENG, W., YANG, Y., WU, D., HUANG, G., WANG, C., DENG, L. & SHEN, X. **Molecular characteristics of community-acquired, methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolated from Chinese children.** *FEMS Immunol. Med. Microbiol.*, v. 58, p. 356–362, 2010.

GOLDING, G. R., LEVETT, P. N., MCDONALD, R. R., IRVINE, J., QUINN, B., NSUNGU, M., WOODS, S., KHAN, M., OFNER-AGOSTINI, M., MULVEY, M. R. & THE NORTHERN ANTIBIOTIC RESISTANCE PARTNERSHIP. **High rates of *Staphylococcus aureus* USA400 infection, Northern Canada.** *Emerg. Infect. Dis.*, v. 17, p. 722-725, 2011.

GOMES, A.R.; WESTH, H.; DE LENCASTRE, H. **Origins and evolution of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clonal lineages.** *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v. 50, p. 3237–3244. 2006.

GÓMEZ-SANZ, E.; TORRES, C.; LOZANO, C.; ZARAZAGA, M. **High diversity of *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus pseudintermedius* lineages and toxigenic traits in healthy pet-owning household members. Underestimating normal household contact.** *Comp Immunol Microbiol Infect Dis.*, v. 36, n. 1, p. 83-94, 2013.

GOULD, I.M., DAVID, M.Z., ESPOSITO, S., GARAU, J., LINA, G., MAZZEI, T.; PETERS, G. **New insights into methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) pathogenesis, treatment and resistance.** *J. Antimicrobiol. Agents*, v. 39, p. 96-104, 2012.

GRIFFETH, G. C.; MORRIS, D. O.; ABRAHAM, J. L.; SHOFER, F. S.; RANKIN, S. C. **Screening for skin carriage of methicillin-resistant coagulase-positive staphylococci and *Staphylococcus schleiferi* in dogs with healthy and inflamed skin.** *Veterinary Dermatology*, v. 19, n. 3, p. 142–149, 2008.

GROOM, A. V., WOLSEY, D. H., NAIMI, T. S., SMITH, K., JOHNSON, S., BOXRUD, D., MOORE, K. A.; CHEEK, J. E. **Community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in a rural american indian community.** *JAMA*, v. 286, p. 1201-1205, 2001.

GUARDABASSI, L., LOEBER, M.E.; JACOBSON, A. **Transmission of multiple antimicrobial-resistant *Staphylococcus intermedius* between dogs affected by deep pyoderma and their owners.** *Veterinary Microbiology*, v.98, p. 23–27, 2004.

HANSELMAN, B. A.; KRUTH, S.; J.; WEESE, S. **Methicillin-resistant staphylococcal colonization in dogs entering a veterinary teaching hospital.** *Veterinary Microbiology*, v. 126, p. 277-281, 2008.

HAUSCHILD, T.; WÓJCIK, A. **Species distribution and properties of staphylococci from canine dermatitis.** *Research in Veterinary Science*, v.82, n. 1, p. 1-6.2007.

HIGUCHI, W.; TAKANO, T.; TENG, L.J.; YAMAMOTO, T. **Structure and specific detection of staphylococcal cassette chromosome *mec* type VII .** *Biochemical and Biophysical Research Communications*, v. 377, p. 752-756, 2008.

HIRAMATSU, K.; KATAYAMA, Y.; YAZAWA, H.; ITO, T. **Molecular genetics of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*.** *Int. J. Med. Microbiol.*, v. 292, p. 67-74, 2002.

HOEKSTRA, K.A.; PAULTON, R.J.L. **Clinical prevalence and antimicrobial susceptibility of *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus intermedius* in dogs.** *Journal of Applied Microbiology*, v. 93, p. 406–413, 2002.

ITO, T.; KATAYAMA, Y.; HIRAMATSU, K. **Cloning and nucleotide sequence determination of the entire *mec* DNA of pre-methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* N315.** *Antimicrobial. Agents. Chemother.*, v. 43, p. 1449–1458, 1999.

ITO, T.; KATAYAMA, Y.; ASADA, K.; MORI, N. **Structural comparison of three types of *Staphylococcal* cassette chromosome *mec* integrated in the chromosome in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*.** *Antimicrob. Agents Chemother.*, v. 45, p. 1323-1336, 2001.

ITO T.; OKUMA, K.; MA, X. X.; YUZAWA, H.; HIRAMATSU, K. **Insights on antibiotic resistance of *Staphylococcus aureus* from its whole genome: genomic island SCC.** *Drug. Resist. Updat.*, v. 6, p. 41–52, 2003.

ITO, T., MA, X. X., TAKEUCHI, F., OKUMA, K., YUZAWA, H.; HIRAMATSU, K. **Novel type V *Staphylococcal* cassette chromosome *mec* driven by a novel cassette chromosome recombinase, *ccrC*.** *Antimicrob. Agents Chemother.*, v. 48, p. 2637-2651, 2004.

JARRAUD, S.; MOUGEL, C.; THIOULOUSE, J.; LINA, G.; MEUGNIER, H.; FOREY, F.; NESME, X.; ETIENNE, J.; VANDENESCH, F. **Relationships between *Staphylococcus aureus* genetic background, virulence factor, agr groups (alleles) and human disease.** *Infect. Immun.*, v. 70, p. 631-40, 2000.

JEVONS, P. **“Celbenin” – resistant staphylococci.** *Br. Med.*, v.1, p. 124-125, 1961.

JONES, R.D., KANIA, S. A., ROHRBACH, B. W., FRANK, L. A., BEMIS, D. A. **Prevalence of oxacilin-and multidrug-resistant staphylococci in clinical samples from dogs: 1772 samples (2001-2005).** *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, v. 230, p. 221-227, 2007.

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. **Molecular analysis of methicillin-resistant *Staphylococcus pseudintermedius* of feline origin from different European countries and North America.** *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, v. 65, p. 1826-1828, 2010.

KANG, M. H.; CHAE, M. J.; YOON, J. W.; KIM, S. G.; LEE, S. Y.; YOO, J. H.; PARK, H. M. **Antibiotic Resistance and Molecular Characterization of Ophthalmic *Staphylococcus pseudintermedius* Isolates from Dogs.** *J Vet Sci.*, 2014.

KATAYAMA, Y.; ITO, T.; HIRAMATSU, K. **A new class of genetic element, *Staphylococcus aureus* chromosome *mec*, encodes methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*.** *Agents Chemother.*, v. 44, p. 1549-1555, 2000.

HARIHARAN, H.; KATHRYN, G.; ROSS, P.; MATTHEW F.; VANESSA, M.; J. DANIELS.; NANCY A.MARTIN, LINTON ANDREWS, TARA PATERSON, RAVINDRA N. SHARMA. ***Staphylococcus pseudintermedius* and *Staphylococcus schleiferi* Subspecies *coagulans* from Canine Pyoderma Cases in Grenada, West Indies, and Their Susceptibility to Beta-Lactam Drugs.** *Veterinary Medicine International*, v. 24, 2014.

KAWAKAMI, T.; SHIBATA, S.; MURAYAMA, N.; NAGATA, M.; NISHIFUJI, K.; IWASAKI, T.; FUKATA, T. **Antimicrobial Susceptibility and Methicillin Resistance in *Staphylococcus pseudintermedius* and *Staphylococcus schleiferi* subsp. *coagulans* Isolated from Dogs with Pyoderma in Japan.** *Journal of Veterinary Medicine and Science*, v.72, n. 12, p. 1615–1619, 2010.

KLEVENS, R.M., MORRISON, M.A., FRIDKIN, S.K., REINGOLD, A., PETIT, S., GERSHMAN, K., RAY, S., HARRISON, L.H., LYNFIELD, R., DUMYATI, G., TOWNES, J.M., CRAIG, A.S., FOSHEIM, G., MCDUGAL, L.K., TENOVER, F. C. ACTIVE BACTERIAL CORE SURVEILLANCE OF THE EMERGING INFECTIONS PROGRAM NETWORK. **Community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and healthcare risk factors.** *Emerg. Infect. Dis.*, v. 12, p. 1991-1993, 2006.

KWON, N.H., PARK, K.T., MOON, J.S. & PARK, Y.H. ***Staphylococcal* cassette chromosome *mec* (SCC*mec*) characterization and molecular analysis for methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and novel SCC*mec* subtype IVg isolated from bovine milk in Korea.** *J. Antimicrob. Chemother.*, v. 56, p. 624–632, 2005.

LABANDEIRA-REY, M., COUZON, F., BOISSET, S., BROWN, E.L., BES, M., BENITO, Y., BARBU, E.M., VAZQUEZ, V., HÖÖK, M., ETIENNE, J., VANDENESCH, F.; BOWDEN, M.G. ***Staphylococcus aureus* Panton-Valentine leukocidin causes necrotizing pneumonia.** *Science*, v. 315, p. 1130-1133, 2007.

LAMY, B., LAURENT, F., GALLON, O., DOUCET-POPULAIRE, F., ETIENNE, J., DECOUSSER, J. W. THE COLLÈGE DE BACTERIOLOGIE VIROLOGIE HYGIÈNE (COLBVH) STUDY GROUP. **Antibacterial resistance, genes encoding toxins and genetic background among *Staphylococcus aureus* isolated from community-acquired skin and soft tissue infections in France: a national prospective survey.** *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.*, v. 31, p. 1279-1284, 2012.

LEONARD, F.C.; MARKEY, B.K. **Meticillin-resistant *Staphylococcus aureus* in animals: A review.** *The Veterinary Journal*, v. 175, p. 27-36, 2008.

LI, S., SKOV, R. L., HAN, X., LARSEN, J., SORUM, M., WULF, M. VOSS, A., HIRAMATSU, K. & ITO, T. **Novel types of staphylococcal cassette chromosome *mec* elements identified in clonal complex 398 methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains.** *Antimicrob. Agents Chemother.*, v. 55, p. 3046-3050, 2011.

LI, V.; CHUI, L.; SIMMONDS, K.; NGUYEN, T.; GOLDING, G. R.; YACOUB, W.; FERRATO, C.; LOUIE, M. **Emergence of New CMRSA7/USA400 Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus spa* Types in Alberta, Canada, from 2005 to 2012.** *J Clin Microbiol.*, v. 52, p. 2439-2446, 2014.

LIU, C., GRABER, C.J., KARR, M., DIEP, B.A., BASUINO, L., SCHWARTZ, B.S., ENRIGHT, M.C., O'HANLON, S.J., THOMAS, J.C., PERDREAU-REMINGTON, F., GORDON, S., GUNTORPE, H., JACOBS, R., JENSEN, P., LEOUNG, G., RUMACK, J.S.; CHAMBERS, H.F. **A population-based study of the incidence and molecular epidemiology of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* disease in San Francisco, 2004-2005.** *Clin. Infect. Dis.*, v. 46, p. 1637-1646, 2008.

LILENBAUM, W.; VERAS, M.; BLUM, E.; SOUZA, G.N. **Antimicrobial susceptibility of staphylococci isolated from otitis externa in dogs.** *Letters in Applied Microbiology*, v. 31, p. 42-45, 2000.

LOEFFLER, A.; BOAG, A.K.; SUNG, J.; LINDSAY, J.A.; GUARDABASSI, L.; DALSGAARD, A.; SMITH, H.; STEVENS, K.B.; LLOYD, D.H. **Prevalence of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* among staff and pets in a small 94 animal referral hospital in the UK.** *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, v.56, p. 692-697, 2005.

LOEFFLER, A.; LLOYD, D.H. **Companion animals: a reservoir for methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in the community?** *Epidemiology and Infection*, v. 138, p. 595-605, 2010.

LUCET, J. C.; REGNIER, B. **Screening and decolonization: Does methicillin-susceptible *Staphylococcus aureus* hold lessons for methicillin-resistant *S. aureus*?** *Clin. Infect. Dis.*, v. 51, p. 585-590, 2010.

LYSKOVA, P.; VYDRZALOVA, M.; MAZUROVA, J. **Identification and antimicrobial susceptibility of bacteria and yeasts isolated from healthy dogs and dogs with otitis externa.** *Journal of veterinary medicine. A, Physiology, pathology, clinical medicine*, v.54, n.10, p. 559-63, 2007.

MA, X. X., ITO, T., TIENSASITORN, C., JAMKLANG, M., CHONGTRAKOOL, P., BOYLE-VAVRA, S., DAUM, R. S. & HIRAMATSU, K. **Novel type of staphylococcal cassette chromosome *mec* identified in community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains.** *Antimicrob. Agents Chemother.*, v. 46, p. 1147–1152, 2002.

MA, X. X., ITO, T., CHONGTRAKOOL, P. & HIRAMATSU, K. **Predominance of clones carrying Pantone-Valentine leukocidin genes among methicillin-resistant**



***Staphylococcus aureus* strains isolated in Japanese hospitals from 1979 to 1985.** *J. Clin. Microbiol.*, v. 44, p. 4515–4527, 2006.

MALUPING, R. P.; PAUL, N. C.; MOODLEY, A. **Antimicrobial susceptibility of methicillin-resistant *Staphylococcus pseudintermedius* isolated from veterinary clinical cases in the UK.** *Br J Biomed Sci.*, v. 71, n. 2, p.55-7, 2014.

MAY, E.R.; HNILICA, K.A.; FRANK, L.A.; JONES, R.D.; BERNIS, D.A. **Isolation of *Staphylococcus schleiferi* from healthy dogs and dogs with otitis, pyoderma, or both.** *Journal of American Veterinary Medical Association*, v. 227, p. 928–931, 2005.

MCDUGAL, L.K.; STEWARD, C.D.; KILLGORE, G.E.; CHAITRAM, J. M.; SIGIRD, K.; TENOVER, F.C. **Pulsed-Field gel electrophoresis typing of oxacillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates from United States: establishing a national database.** *J. Clin. Microbiol.*, v. 41, p. 5113-5120, 2003.

MIDDLETON, J. R.; FALES, W. H.; LUBY, C. D.; OAKS, J. L.; SANCHEZ, S.; KINYON, J. M.; WU, C. C.; MADDOX, C. W. **Surveillance of *Staphylococcus aureus* in veterinary teaching hospitals.** *J Clin Microbiol.*, v. 43, p. 2916-2919, 2009.

MILHEIRIÇO, C.; OLIVEIRA, D. C.; DE LENCASTRE, H. **Multiplex PCR strategy for subtyping the staphylococcal cassette chromosome *mec* type IV in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*, SCC*mec* IV multiplex.** *J. Antimicrob. Chemother.*, v. 60, p. 42-48, 2007.

MILLER, L. G.; PERDREAU-HEMINGTON, F.; RIEG, G.; MEHDI, S.; PERLROTH, J.; BAYER, A. S.; TANG, A. W.; PHUNG, T. O.; SPELLBERG, B. **Necrotizing fasciitis caused by community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in Los Angeles.** *N. Engl. J. Med.*, v. 352, p. 1445-1453, 2005.

MOODLEY, A.; RILEY, M. C.; KANIA, S. A.; GUARDABASSI, L. **Genome Sequence of *Staphylococcus pseudintermedius* Strain E140, an ST71 European-Associated Methicillin-Resistant Isolate.** *Journal genome announcements.*, v.1, n. 2, p.207-212, 2013.

MOODLEY, A.; DAMBORG, P.; NIELSEN, S. S. **Antimicrobial resistance in methicillin susceptible and methicillin resistant *Staphylococcus pseudintermedius* of canine origin: literature review from 1980 to 2013.** *Vet Microbiol.*, v.16, n. 171, p. 337-341, 2014.

MORAN, G. B.; KRISHNADASAN, A.; GORWITZ, R. J.; FOSHEIM, G. E.; MCDUGAL, L. K.; CAREY, R. B.; TALAN, D. A. **Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infections among patients in the emergency department.** *N. Engl. J. Med.*, v. 355, p. 666-674, 2006.

MORRIS, D.O.; BOSTON. R. C.; O'SHEA, K.; RANKIN, S. C. **The prevalence of carriage of methicillin-resistant staphylococci by veterinary dermatology practice staff and their respective pets.** *Veterinary Dermatology*, v. 21, p. 400-407, 2010.

MUSSER, J.M.; KAPUR, V. **Clonal analysis of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains from intercontinental sources: association of the *mec* gene with divergent phylogenetic lineages implies dissemination by horizontal transfer and recombination.** *Journal of clinical microbiology*, v. 30, p. 2058–2063, 1992.

National Committee for Clinical Laboratory Standards. **Performance standards for antimicrobial disk susceptibility tests;** approves standard, 2007.

NAGASE, N.; SASAKI, A.; YAMASHITA, K.; SHIMIZU, A.; WAKITA, Y.; KITA,S.; KAWANO, J. **Isolation and species distribution of staphylococci from animal and human skin.** *Journal of Veterinary Medical Science*,v. 64, p. 245–250. 2002.

NIENHOFF, U.; KADLEC, K.; CHABERNY, I. F.; VERSPOHL, J.; GERLACH,G. F.; SCHWARZ, S.; SIMON, D.; NOLTE, I. **Transmission of methicillin-resistant**

***Staphylococcus aureus* strains between humans and dogs: two cases report.** *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, v. 64, p. 660-662, 2009.

NIENHOFF, U.; KADLEC, K.; CHABERNY, I. F.; VERSPOHL, J.; GERLACH, G. F.; SCHWARZ, S.; SIMON, D.; NOLTE, I. **Methicillin-resistant *Staphylococcus pseudintermedius* among dogs admitted to a small animal hospital.** *Veterinary Microbiology*, v.150, p. 191-197, 2011.

NOTO, M.J.; KREISWIRTH, B.N.; MONK, A. B.; ARCHERI, G.L. **Gene acquisition at the insertion site for *SCCmec*, the genomic island conferring methicillin resistance in *Staphylococcus aureus*.** *J. Bacteriol.*, v. 190, p. 1276-1283, 2008.

O'BRIEN, F. G., PEARMAN, J. W., GRACEY, M., RILEY, T. V.; GRUBB, W. B. **Community strain of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* involved in a hospital outbreak.** *J. Clin. Microbiol.*, v. 37, p. 2858–2862, 1999.

OLIVEIRA, D. C.; TOMASZ, A; DE LENCASTRE, H. **Secrets of success of a human pathogen: molecular evolution of pandemic clones of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*.** *Lancet. Infect. Dis.*, 2: 180-189. *Erratum in: Lancet. Infect. Dis.*, 2: 315, 2002.

OLIVEIRA, D. C., MILHEIRIÇO, C.; DE LENCASTRE, H. **Redefining a structural variant of staphylococcal cassette chromosome *mec*, *SCCmec* type VI.** *Antimicrob. Agents Chemother.*, v. 50, p. 3457-3459, 2006.

ONUMA, K.; TANABE, T.; SATO, H. **Antimicrobial resistance of *Staphylococcus pseudintermedius* isolates from healthy dogs and dogs affected with pyoderma in Japan.** *Vet Dermatol.*, v. 23, n. 1, p.17-22, 2012.

OTTO, M. ***Staphylococcus aureus* toxin gene hitchhikes on a transferable antibiotic resistance element.** *Virulence*, v. 1, p. 49-51, 2010.

PACHECO, A.B.; GUTH, B.E.; SOARES, K. C.; NISHIMURA, L.; DE ALMEIDA, D.F. **Random amplification of polymorphic DNA reveals serotype-specific clonal clusters among enterotoxigenic *Escherichia coli* strains isolated from humans.** *J. Clin. Microbiol.*, v. 35, p. 1521-1525, 1997.

PATCHANEE, P.; TADEE, P.; INGKANINAN, P.; TANKAEW, P.; HOET, A. E, CHUPIA, V. **Distribution and characterization of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) at the small animal hospital, faculty of veterinary medicine, Chiang Mai University, Thailand.** *Southeast Asian. J. Trop. Med. Public Health*,v. .45, n. 2, p.413-20, 2014.

PAUL, N.; MOODLEY, A.; GHIBAUDO, G.; GUARDABASSI, L. **Carriage of Methicillin-resistant *Staphylococcus pseudintermedius* in Small Animal Veterinarians: Indirect Evidence of Zoonotic Transmission.** *Zoonoses and Public Health*, v.58,p. 533–539, 2011.

PEDERSEN, K.; JENSEN, H.; FINSTER, K.; JENSEN, V. F.; HEUER, O. E. **Occurrence of antimicrobial resistance in bacteria from diagnostic samples from dogs.** *J. Antimicrob. Chemother.* v.60, p. 775–781, 2007.

PENNA, B.; VARGES, R.; MARTINS, G. M.; MARTINS, R. R.; LILENBAUM, W. **In vitro antimicrobial susceptibility of staphylococci isolated from canine pyoderma in Rio de Janeiro, Brazil.** *Braz J Microbiol.*, v. 40, p. 490-494, 2009.

PENNA, B.; VARGES, R.; MEDEIROS, L.; MARTINS, G. M.; MARTINS, R. R.; LILENBAUM, W. **Species distribution and antimicrobial susceptibility of staphylococci isolated from canine otitis externa.** *Veterinary Dermatology*, v. 21, p. 292-296, 2010.

PENNA, B.; MENDES, W.; RABELLO, R. F.; LILENBAUM, W. **Isolation of methicillin resistant staphylococci in canine skin infections in Rio de Janeiro, Brazil.** *Veterinary Dermatology*, v. 24, p. 373–375, 2013.

PERRETTEN, V.; KADLEC, K.; SCHWARZ, S.; GRÖNLUND 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. **Clonal spread of methicillin-resistant *Staphylococcus pseudintermedius* in Europe and North America: an international multicentre study.** *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, v. 65, p. 1145-1154, 2010.

PRESCOTT, J.F.; HANNA, W.J.B.; SMITH, R.R.; DROST, K. **Antimicrobial drugs and resistance in dogs.** *Canadian Veterinary Journal*, v.43, p. 107–116, 2002.

PROIETTI, P.C.; BIETTA, A.; COLETTI, M.; MARENZONI, M.L.; SCORZA, A.V.; PASSAMONTI, F. **Insertion sequence IS256 in canine pyoderma isolates of *Staphylococcus pseudintermedius* associated with antibiotic resistance.** *Vet. Microbiol.*, v. 157, p. 376–382, 2012.

QI, W.; ENDER, M.; O'BRIEN, F.; IMHOF, A.; RUEF, C.; MCCALLUM, N.; BERGER-BACHI, B. **Molecular epidemiology of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in Zurich, Switzerland (2003): prevalence of type IVSCC*mec* and a new SCC*mec* element associated with isolates from intravenous drug users.** *Journal of Clinical Microbiology*, v. 43, p. 5164–5170, 2005.

QUITOCO, I. M. Z.; RAMUNDO, M. S.; SILVA-CARVALHO, M. C.; SOUZA, R. R.; BELTRAME, C. O.; OLIVEIRA, T. F.; ARAÚJO, R.; DEL PELOSO, P. F.; COELHO, L. R.; FIGUEIREDO, A. M.S. **First report in South America of companion animal colonization by the USA1100 clone of community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (ST30) and by the European clone of methicillin-resistant *Staphylococcus pseudintermedius* (ST71).** *B. M. C. Research*, v.6, n.6, p.336, 2013.

RAVENS, P. A.; VOGELNEST, L. J.; EWEN, E.; BOSWARD, K. I.; NORRIS, J. M. **Canine superficial bacterial pyoderma: evaluation of skin surface sampling methods and**

**antimicrobial susceptibility of causal *Staphylococcus* isolates.** *Aust Vet. J.*, v. 92, p. 149-155, 2014.

RIBEIRO, A.; DIAS, C.; SILVA-CARVALHO, M.C.; BERQUÓ, L. FERREIRA, F.A.; SANTOS, R.N.S.; FERREIRA-CARVALHO, B.; FIGUEIREDO, A.M.S. **First report of infection with community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in South America.** *J. Clin. Microbiol.*, v. 43, p. 1985-1988, 2005.

RIBEIRO, A.; CORONADO, A. Z.; SILVA-CARVALHO, M. C.; FERREIRA-CARVALHO, B. T.; DIAS, C.; ROZENBAUM, R.; DEL PELOSO, P. F.; DA COSTA FERREIRA LEITE, C.; TEIXEIRA, L.A.; FIGUEIREDO, A.M. **Detection and characterization of international community-acquired infections by methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clones in Rio de Janeiro and Porto Alegre cities causing both community- and hospital-associated diseases.** *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.*, v. 59, p. 339-45, 2007.

ROMAN, R.S., SMITH, J., WALKER, M., BYRNE, S., RAMOTAR, K., DYCJK, B., KABANI, A.; NICOLE, L.E. **Rapid geographic spread of a methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strain.** *Clin. Infect. Dis.*, v. 25, p. 698-705, 1997.

ROSSER, J.R. **Piodermatite.** Em: Bichard, S.J.; Scherding, R.G. (editors), Manual Saunders Clínica de pequenos Animais, 2<sup>o</sup>ed, Roca, São Paulo, SP, 2006.

ROUGIER, S.; BORELL, D.; PHEULPIN, S.; WOEHLÉ, F.; BOISRAMÉ, B. **A comparative study of two antimicrobial /anti-inflammatory formulations in the treatment of canine otitis externa.** *Veterinary Dermatology*, v.16, p. 299–307, 2005.

ROZENBAUM, R., SAMPAIO, M.G., BATISTA, G. S., GARIBALDI, A. M., TERRA, G. M., SOUZA, M. J., VIEIRA, E. N., SILVA-CARVALHO, M. C., TEIXEIRA, L. A.; FIGUEIREDO, A. M. **First report in Brazil of severe infection cause by community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (CA-MRSA).** *Braz. J. Med. Biol. Res.*, v. 42, p. 756-760, 2009.

RUBIN, J.E.; BALL, K.R.; CHIRINO-TREJO, M. **Antimicrobial susceptibility of *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus pseudintermedius* isolated from various animals.** *Canadian Veterinary Journal*, v. 52, n. 2, p. 153-157, 2011.

SAIMAN, L., O'KEEFE, M., GRAHAM, P.L., WU, F., SAID-SALIM, B., KREISWIRTH, B., LASALA, A., SCHLIEVERT, P.M.; DELLA-LATTA, P. **Hospital transmission of community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* among postpartum women.** *Clin. Infect. Dis.*, v. 37, p. 1313-1319, 2003.

SAMBROOK, J., FRITSCH, E. F.; MANIATIS, T. **Molecular Cloning: a Laboratory Manual.** 2nd ed. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press., 1989.

SASAKI, T.; TSUBAKISHITA, S.; TANAKA, Y.; SAKUSABE, A.; OHTSUKA, M.; HIROTAKI, S.; KAWAKAMI, T.; FUKATA, T.; HIRAMATSU, K. **Multiplex-PCR method for species identification of coagulase-positive staphylococci.** *Journal Clin. Microbiol.*, v. 48, p. 765-769, 2007.

SASAKI, T.; TSUBAKISHITA, S.; TANAKA, Y. **Multiplex-PCR method for species identification of coagulase-positive *staphylococci*.** *J. Clin. Microbiol.*, v.48, n.3, p.765-769, 2010.

SZABADOS, F.; WOLOSZYN, J.; RICHTER, C.; KAASE, M.; GATERMANN, S. **Identification of molecularly defined *Staphylococcus aureus* strains using matrix-assisted laser desorption/ionization time of flight mass spectrometry and the Biotyper 2.0 database.***J. Med. Microbiol.*, v.59, n.7, p.787-790, 2010.

SZABADOS, F.; ANDERS, A.; KAASE, M.; MARLINGHAUS, L.; GATERMANN, SG.; TESKE, W.; LICHTINGER, T. **Late Periprosthetic Joint Infection due to *Staphylococcus lugdunensis* Identified by Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionisation Time of Flight**

**Mass Spectrometry: A Case Report and Review of the Literature.** *Case Rep Med.* 2011;2011.

SCHLEBUSCH, S., SCHOONEVELDT, J. M., HUYGENS, F.; NIMMO, G.R. **Prevalence of *Staphylococcus aureus* strains in an Australian cohort, 1989-2003: evidence for the low prevalence of the toxic shock toxin and Panton-Valentine leukocidin genes.** *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.*, v. 28, p. 1183-1189, 2009.

SCHLIEVERT, P. M., STRANDBERG, K. L., LIN, Y. C., PETERSON, M. L.; LEUNG, D.Y. **Secreted virulence factor comparison between methicillin-resistant and methicillin-sensitive *Staphylococcus aureus*, and its relevance to atopic dermatitis.** *J. Allergy Clin. Immunol.*, v.125, p. 39-49, 2010.

SCHMIDT, V. M.; WILLIAMS, N. J.; PINCHBECK, G.; CORLESS, C. E, SHAW, S.; MCEWAN, N.; DAWSON, S.; NUTTALL, T. **Antimicrobial resistance and characterization of staphylococci isolated from healthy Labrador retrievers in the United Kingdom.** *BMC Vet Res.*, v.10, n. 17, 2014.

SCOTT, D.W.; MILLER, W.H.; GRIFFIN, C.E. (eds). **Bacterial skin diseases.** In: **Muller and Kirk's Small Animal Dermatology**, 6th ed. Philadelphia, PA: W.B.Saunders: 274–335. 2001.

SCRIBEL, L. V.; SILVA-CARVALHO, M. C.; SOUZA, R. R.; SUPERTI, S. V.; KVIKTO, C. H. C.; FIGUEIREDO, A. M. S.; ZAVASCKI, A. P. **Clinical and molecular epidemiology of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* carrying SCCmecIV in a university hospital in Porto Alegre, Brazil.** *Diag. Microbiol. Infec. Dis.*, 56, 457-61, 2009.

SHORE, A.; ROSSNEY, A.S.; KEANE, C.T.; ENRIGHT, M. C.; COLEMAN, D.C. **Seven novel variants of the staphylococcal chromosome cassette *mec* in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates from Ireland.** *Antimicrob. Agents Chemother.*, v. 49, p. 2070-2083, 2005.



SHORE, A. C.; DEASY, E. C.; SLICKERS, P.; BRENNAN, G.; O'CONNELL, B.; MONECKE, S.; EHRICHT, R.; COLEMAN, D. C. **Detection of *Staphylococcal* cassette chromosome mec type XI carrying highly divergent mecA, mecl, mecR1, blaZ, and ccr genes in human clinical isolates of clonal complex 130 methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*.** *Antimicrob. Agents Chomother.*, v. 55, p. 3765-73, 2011.

SILVA-CARVALHO, M.C., BONELLI, R.R., SOUZA, R.R., MOREIRA, S., DOS SANTOS, L.C., DE SOUZA CONCEIÇÃO, M., DE MELLO JÚNIOR, S. J., CARBALLIDO, J.M., RITO, P.N., VIEIRA, V.V., TEIXEIRA, L. A.; SÁ FIGUEIREDO, A.M. **Emergence of multiresistant variants of the community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* lineage ST1-SCCmecIV in 2 hospitals in Rio de Janeiro, Brazil.** *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.*, v. 65, p. 300-305, 2009.

SINHA, B.; HERRMANN, M. **Mechanism and consequences of invasion of endothelial cells by *Staphylococcus aureus*.** *Thromb Haemost.*, v. 94, p. 266-277, 2005.

SKOV, R., CHRISTIANSEN, K., DANCER, S. J., DAUM, R. S., DRYDEN, M., HUANG, Y. C.; LOWY, F. D. **Update on the prevention and control of community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (CA-MRSA).** *Int. J. Antimicrob. Agents*, v. 39, p. 193-200, 2012.

SOARES, M. J. S.; TEIXEIRA, L.A.; NUNES, M.R.; CARVALHO, M.C.S.; FERREIRA-CARVALHO, B.T.; FIGUEIREDO, A.M.S. **Analysis of different molecular methods for typing methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates belonging to the Brazilian Epidemic clone.** *J. Med. Microbiol.*, v. 50, p. 732-742, 2001.

SOUSA-JUNIOR, F.C.; SILVA-CARVALHO, M.C.; M.J.B.C. FERNANDES, M. J. B. C.; VIEIRA, M. F. P.; PELLEGRINO, F. L. P. C.; FIGUEIREDO, A. M. S.; DE MELO, M. C. N.; MILAN, E. P. **Genotyping of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates obtained in the Northeast region of Brazil.** *Brazilian Journal of Medical and Biological Research.*, v.42, p. 877-881, 2009.

STEFANI, S., CHUNG, D.R., LINDSAY, J.A., FRIEDRICH, A.W., KEARNS, A. M., WESTH, H.; MACKENZIE, F.M. **Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA): global epidemiology and harmonization of typing methods.** *J. Antimicrobiol. Agents*, v. 39, p. 273-282, 2012.

STEGMANN, R.; BURNENS, A.; MARANTA, C.A.; PERRETEN, V. **Human infection associated with methicillin-resistant *Staphylococcus pseudintermedius* ST71.** *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, v. 65, p. 2047–2048, 2010.

STROMMENGER, R.; CUNY, C.; MERNER, G.; WITTE, W. **Obvious lack of association between dynamics of epidemic methicillin –resistant *Staphylococcus aureus* in central Europe and agr specificity groups.** *Eur.J.Clin.Microbiol.Infect.Dis.*, v. 23, p. 15-19, 2006.

STRUELENS, M.J.; HAWKEY, P.M.; FRENCH, G.L.; WITTE, W.; TACCONELLI, E. **Laboratory tools and strategies for methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* screening, surveillance and typing: state of the art and unmet needs.** *Clinical Microbiology and Infection*, v.15, p.112-119, 2009.

TENOVER, F.C.; ARBEIT, R.D.; GOERING, R.V.; MICKLSEN, P.A.; MURRAY, B. E.; PERSING, D.H. **Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by pulse-field gel electrophoresis: criteria for bacterial strain typing.** *J. Clin. Microbiol.*, v. 33, p. 2233-39, 1995.

TOMAZI, T.; GONÇALVES, J. L.; BARREIRO, J. R.; BRAGA, P. A.; SILVA, L.F.; EBERLIN, M. N.; SANTOS, M. V. **Identification of Coagulase-Negative *Staphylococci* from Bovine Intramammary Infection by Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization - Time of Flight Mass Spectrometry.** *J Clin Microbiol.*, v.36, n.2, 2014.

TURLEJ, A.; HRYNIEWICZ, W.; EMPEL, J. **Staphylococcal cassette chromosome *mec* (*Sccmec*) classification and typing methods: an overview.** *Pol. J. Microbiol.*, v. 60, n. 2, p. 95-103, 2011.

UDO, E. E., PEARMAN, J. W.; GRUBB, W.B. **Genetic analysis of community isolates methicillin-resistant *S. Aureus* in Western Australia.** *J. Hosp. Infect.*, v. 25, p. 97-108, 1993.

VAN DUIJKEREN, E.; WOLFHAGEN, M.; BOX, A. **Human-to-Dog Transmission of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*.** *Emerging Infectious Disease*, v. 10, p. 2235-2237. 2004.

VAN DUIJKEREN, E.; HOUWERS, D.J.; SCHOORMANS, A. **Transmission of methicillin-resistant *Staphylococcus intermedius* between humans and animals.***Veterinary Microbiology*, v. 128, n. 1–2, p. 213–215, 2008.

VANDENESCH, F., NAIMI, T., ENRIGHT, M.C., LINA, G., NIMMO, G.R., HEFFERNAN, H., LIASSINE, N., BES, M., GREENLAND, T., REVERDY, M.E. & ETIENNE, J. **Community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* carrying Panton-Valentine leukocidin genes, worldwide emergence.** *Emerg. Infect. Dis.*, v. 9, p. 978-984, 2003.

VARGES, R.; MEDEIROS, L.; MARTINS, G.; MARTINS, R.; LILENBAUM, W. **Species distribution and antimicrobial susceptibility of staphylococci isolated from canine otitis externa.** *Veterinary Dermatology*, v. 23, p. 292-296, 2010.

VENGUST, M.; ANDERSON, M. E.; ROUSSEAU, J.; WEESE, J. S. **Methicillin-Resistant staphylococcal colonization in clinically normal dogs and horses in the community.** *Letters of Applied Microbiology*, v. 43, p. 602-606, 2006.

VINCZE, S.; STAMM, I.; KOPP, P. A.; HERMES, J.; ADLHOCH, C.; SEMMLER, T.; WIELER, L. H.; LÜBKE-BECKER, A.; WALTHER, B. **Alarming proportions of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) in wound samples from companion animals, Germany 2010-2012.***PLoS One*, v. 9, 2014.

VOSS, A.; LOEFFEN, F.; BAKKER, J.; WULF, M.; KLAASSEN C. **Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in pig farming.** *Emerging Infectious Diseases, Atlanta*, v. 11, n.12, p. 1965-1966, 2005.

WALDRON, D. E.; LINDSAY, J. A. **Sau1: a novel lineage-specific type I Restriction-Modification system that blocks horizontal gene transfer into *Staphylococcus aureus* and between *S.aureus* isolates of different lineages.** *J. Bacteriol.*, v. 189, p. 5578-5585, 2006.

WALTHER, B.; WIELER, L. H.; FRIEDRICH, A. W.; HANSEN, A.; KOHN, B.; LEO BRUNNBERG, L.; LUBKE-BECKER, A. **Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) isolated from small and exotic animals at a university hospital during routine microbiological examinations.** *Veterinary Microbiology*, v. 127, p. 171-178, 2008.

WANG, Y.; YANG, J.; LOGUE, C. M.; LIU, K.; CAO, X.; ZHANG, W.; SHEN, J.; WU, C. **Methicillin-resistant *Staphylococcus pseudintermedius* isolated from canine pyoderma in North China.** *J Appl Microbiol.*, v. 112, n. 4, p. 623-630, 2012.

WEDLEY, A. L.; DAWSON, S.; MADDOX, T. W.; COYNE, K. P.; PINCHBECK, G. L.; CLEGG, P.; JAMROZY, D.; FIELDER, M. D.; DONOVAN, D.; NUTTALL, T.; WILLIAMS, N. J. **Carriage of *Staphylococcus* species in the veterinary visiting dog population in mainland UK: molecular characterization of resistance and virulence.** *Vet Microbiol.*, v. 14, n. 170, p.81-8, 2014.

WEESE, J. S. **Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: an emerging pathogen in small animals.** *Journal of American Animal Hospital Association*, v. 41, p. 150–157, 2005.

WEESE, J.S.; FAIRES, M.; ROUSSEA, J.; BERSENAS, A.M.E.; MATHEWS, K.A. **Cluster of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* colonization in a small animal intensive care unit.** *Journal of American Veterinary Medical Association*, v. 231, p. 1361–1364, 2007.

WEESE, J.S.; VAN DUIJKEREN. E. **Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus pseudintermedius* in veterinary medicine.** *Veterinary Microbiology*, v. 140, n. 3-4, p. 4184-29, 2010.

WEIR, S. K.; FRAM, J.; BERG, G.; KABBANI, D.; STRYMISH, J.; TANG, M.; FITZSIMMONS, D.; BRECHER, S. M.; GUPTA, K. **Molecular epidemiology of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates from patients newly identified as nasal carriers.** *J Clin Microbiol.*, v. 50, p. 3283-3286, 2012.

WERTHEIM, H.F.L., WALSH, E., CHOUDHURRY, R., MELLES, D.C., BOELEN, H.A.M., MIAJLOVIC, H., VERBRUGH, H. A., FOSTER, T.; VAN BELKUM, A. **Key role for clumping factor B in *Staphylococcus aureus* nasal colonization of humans.** *PLoS Med.*, v. 5, n. 17, 2008.

YAMASHITA, K.; SHIMIZU, A.; KAWANO, J.; UCHIDA, E.; HARUNA, A.; IGIMI, S. **Isolation and characterization of staphylococci from external auditory meatus of dogs with or without otitis externa with special reference to *Staphylococcus schleiferi* subsp. *coagulans* isolates.** *Journal of Veterinary Medical Science*, v. 67, n. 3, p. 263-268, 2005.

YOO, J. H.; YOON, J. W.; LEE, S. Y.; PARK, H. M. **High prevalence of Fluoroquinolone- and Methicillin-resistant *Staphylococcus pseudintermedius* isolates from canine pyoderma and otitis externa in veterinary teaching hospital.** *J. Microbiol. Biotechnol.*, v. 20, n. 4, p.798-802, 2010.

YOON, J.W.; LEE, K.J.; LEE, S.Y.; CHAE, M.J.; PARK, J.K.; YOO, J.H.; PARK,H.M. **Antibiotic resistance profiles of *Staphylococcus pseudintermedius* isolates from canine patients in Korea.** *Journal of microbiology and biotechnology*, v. 20, n. 12, p. 1764-8, 2010.

YOUN, J., YOON, J. W., KOO, H. C., LIM, S. K., PARK, Y. H. **Prevalence and antimicrogram of *Staphylococcus intermedius* group isolates from veterinary staff,**

**companion animals, and the environment in veterinary hospitals in Korea.** *J. Vet. Diagn. Invest.*, v. 23, p. 268-274, 2011.

YOUN, J. H.; PARK, Y. H.; HANG'OMBE, B.; SUGIMOTO, C. **Prevalence and characterization of *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus pseudintermedius* isolated from companion animals and environment in the veterinary teaching hospital in Zambia, Africa.** *Comp Immunol Microbiol Infect Dis.*, v. 37, p. 123-130, 2014.

ZHANG, K.; MCCLURE, J. A.; SAMMER, E.; CONLY, J. M. **Novel Staphylococcal Cassette Chromosome *mec* Type, Tentatively Designated Type VIII, Harboring Class A *mec* and Type 4 *ccr* Gene Complexes in a Canadian Epidemic Strain of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*.** *Anti. Microbiol. Agents. Chemot.*, v. 53, p. 531–540, 2009.

ZONG, Z.; PENG, C.; LÜ, X. **Diversity of SCC*mec* Elements in Methicillin-Resistant Coagulase-Negative Staphylococci Clinical Isolates.** *PLoS ONE*, v. 6, n. 5, 2011.

ZUBIER, I.E.M.E.; KANBAR, T.; ALBER, J.; LAMMLER, C.; AKINEDEN, O.; WEISS, R.; ZSCHOCK, M. **Phenotypic and genotypic characteristics of methicillin/oxacilin-resistant *Staphylococcus intermedius* isolated from clinical specimens during routine veterinary microbiological examinations.** *Veterinary Microbiology*, v. 121, p. 170-176, 2007.