

UFRRJ
INSTITUTO DE VETERINÁRIA
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS
VETERINÁRIAS

TESE

ETIOLOGIA DOS PROCESSOS INFECCIOSOS E
ABORDAGEM SOBRE A AVALIAÇÃO EM
***STAPHYLOCOCCUS* SPP. DOS FATORES DE**
VIRULÊNCIA E RESISTÊNCIA AOS
ANTIMICROBIANOS DE USO CLÍNICO EM CÃES E
GATOS

Ingrid Annes Pereira

2010

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.



**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE VETERINÁRIA
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS**

**ETIOLOGIA DOS PROCESSOS INFECCIOSOS E
ABORDAGEM SOBRE A AVALIAÇÃO EM *STAPHYLOCOCCUS*
SPP. DOS FATORES DE VIRULÊNCIA E RESISTÊNCIA AOS
ANTIMICROBIANOS DE USO CLÍNICO EM CÃES E GATOS**

INGRID ANNES PEREIRA

Sob a Orientação da Professora
Miliane Moreira Soares de Souza

Tese submetida como requisito
parcial para obtenção do grau de
Doutor em Ciências, no Curso de
Pós-Graduação em Ciências
Veterinárias

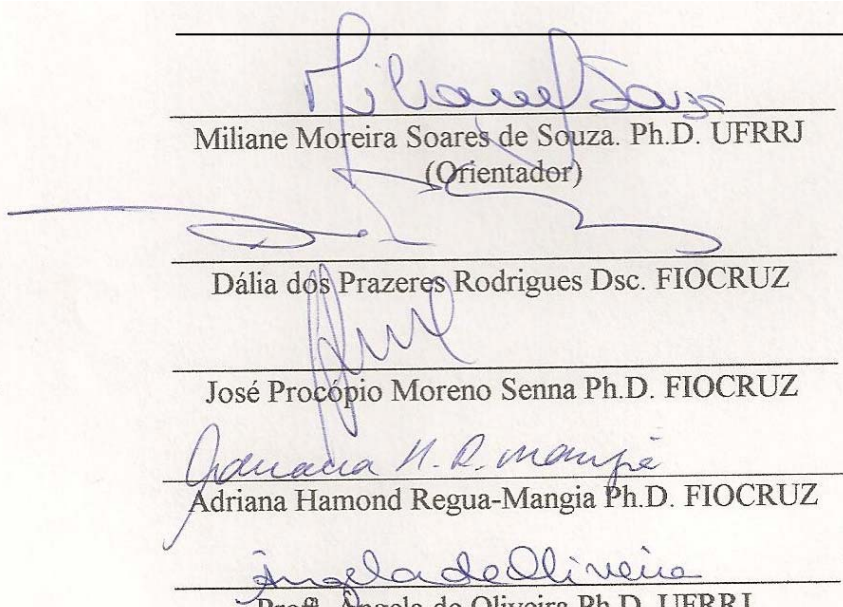
Seropédica, RJ
Fevereiro de 2010

UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE VETERINÁRIA
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS

INGRID ANNES PEREIRA

Tese submetida como requisito parcial para obtenção do grau de **Doutor em Ciências**, no Curso de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, área de Concentração em Sanidade Animal.

TESE APROVADA EM 23/02/2010.



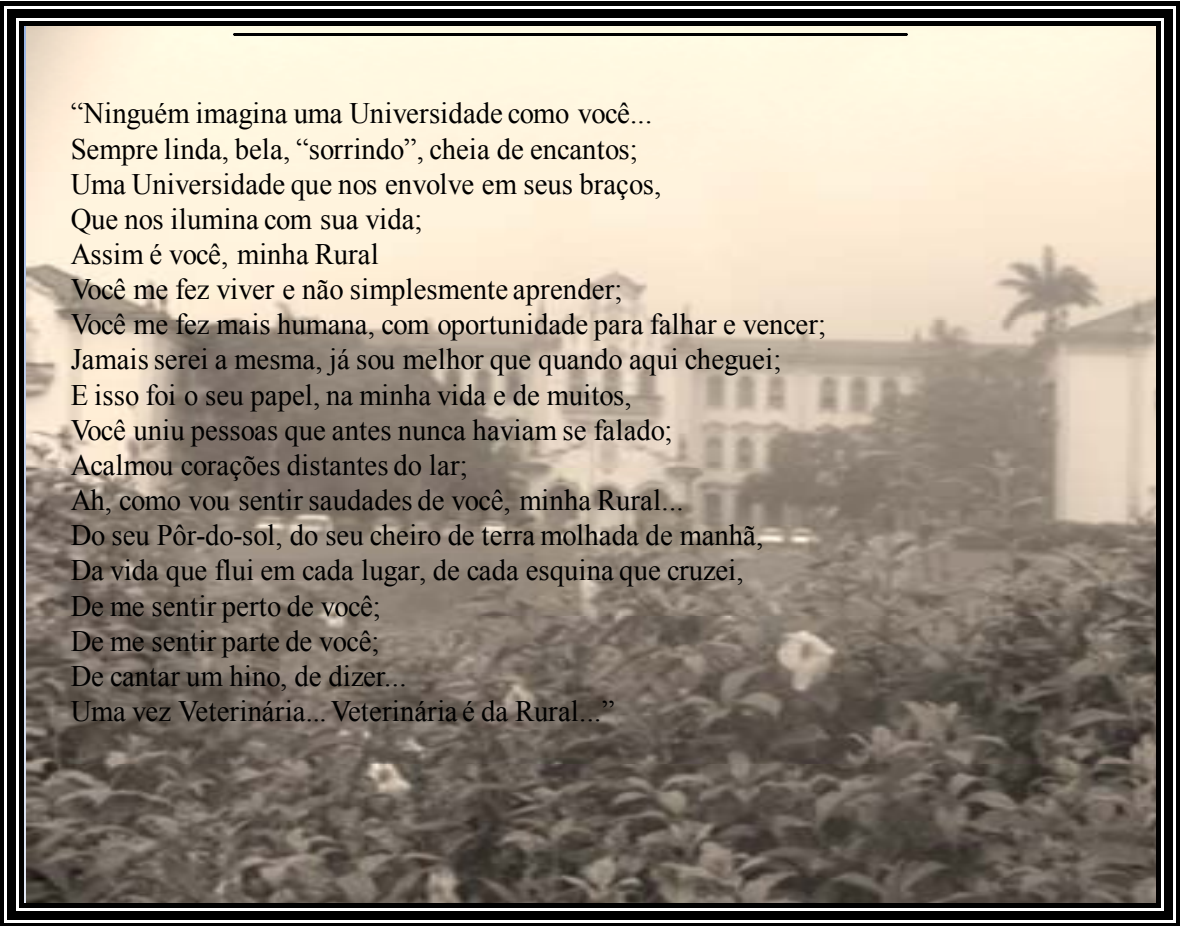
Miliane Moreira Soares de Souza. Ph.D. UFRRJ
(Orientador)

Dália dos Prazeres Rodrigues Dsc. FIOCRUZ

José Procópio Moreno Senna Ph.D. FIOCRUZ

Adriana Hamond Regua-Mangia Ph.D. FIOCRUZ

Profª. Ângela de Oliveira Ph.D. UFRRJ



“Ninguém imagina uma Universidade como você...
Sempre linda, bela, “sorrindo”, cheia de encantos;
Uma Universidade que nos envolve em seus braços,
Que nos ilumina com sua vida;
Assim é você, minha Rural
Você me fez viver e não simplesmente aprender;
Você me fez mais humana, com oportunidade para falhar e vencer;
Jamais serei a mesma, já sou melhor que quando aqui cheguei;
E isso foi o seu papel, na minha vida e de muitos,
Você uniu pessoas que antes nunca haviam se falado;
Acalmou corações distantes do lar;
Ah, como vou sentir saudades de você, minha Rural...
Do seu Pôr-do-sol, do seu cheiro de terra molhada de manhã,
Da vida que flui em cada lugar, de cada esquina que cruzei,
De me sentir perto de você;
De me sentir parte de você;
De cantar um hino, de dizer...
Uma vez Veterinária... Veterinária é da Rural...”

Este trabalho é dedicado à
minha amada
Universidade Federal
Rural do Rio de Janeiro
que me acolheu durante
10 anos.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a DEUS por me fazer entender que sem Ele nada tem valor. Obrigada por ter me dado todas as oportunidades que recebi, por multiplicar o meu tempo, por me dar força todos os dias e por colocar no meu caminho pessoas que foram fundamentais para a realização deste sonho. Eu creio que vou além com o Sobrenatural de Deus e que conquistarei muito mais que os meus sonhos, pois sobre mim está a vontade do Senhor!

A meu pai, PAULO ROBERTO FERNANDES PEREIRA (*in memoriam*), por tudo o que é e sempre será em minha vida! Muito Obrigada!

Ao meu marido, JOÃO PAULO DE ALMEIDA COELHO. Muito obrigada pela compreensão nos momentos de ausência, por ter feito parte desse trabalho tanto quanto eu, pois bastava eu precisar e lá estava você. Perdão pela falta de paciência, pelo excesso de responsabilidade, pelas brigas, mas você sabe que o nosso amor superou tudo isso. Obrigada pelo incentivo e pelo seu orgulho: Essa vitória é nossa! Te amo muito!

À minha mãe, GUARACIARA ANNES PEREIRA, por toda sua dedicação e trabalho.

À minha avó, LÍGIA FERNANDES ANNES, pelo seu amor incondicional, por ter sempre me acompanhado nas alegrias e nas tristezas

A toda minha família em especial a minha irmã MARCELLI ANNES PEREIRA e ao meu tio RONALDO ANNES DE ALMEIDA e a minha prima TAÍS CARVALHO SILVA.

A minha orientadora MILIANE MOREIRA SOARES DE SOUZA, por seu exemplo de integridade, honestidade e competência, por me ensinar a crescer como profissional e a lidar com as responsabilidades.

A minha amiga, SHANA MATTOS DE OLIVEIRA COELHO, agradeço pelo apoio e dedicação e por todo o amor que me proporcionou durante todo o tempo em que estivemos juntas.

A amiga, LIDIANE DE CASTRO SOARES, obrigada pela ajuda na realização deste trabalho e pela parceria de Laboratório durante todos esses anos. Sucesso!

Aos meus amigos BRUNO “WALLY” GOMES DE CASTRO e MARCELO SANTOS DE OLIVA que tornaram os meus dias de trabalho mais engraçados e descontraídos. Obrigada pelas frases de grande cunho intelectual e pelas “intriguinhas” que divertiram a todos naquele laboratório.

Agradeço àqueles que em algum momento passaram pela minha vida e se instalaram trazendo muita alegria: JOSÉ EDISON E ALZIRA COELHO, CLÉIA CUNHA, BRUNO ROCHA PRIBUL, MARCELO GOMES, TATIANI ABREU, LIGIA PORTUGAL GOMES, PRISCILA e JORGE RAUTA, DELGI e LETÍCIA COELHO.

Aos meus queridos estagiários do Laboratório de Bacteriologia Veterinária. Espero ter cultivado uma sementinha chamada “microbiologia” na vida profissional de vocês. Meus agradecimentos especiais para: DAYANNE MELLO, VIVIANE

FIGUEIRA, CÁSSIA MOTTA, CARLOS ARAUJO, ABRAÃO CÔE, ELAINE LIPORAGE, HOSANA DAU.

Aos professores de microbiologia da UFRRJ, ÂNGELA DE OLIVEIRA e FRANCISCO BARONI, por tudo que me ensinaram durante todos esses 10 anos.

Aos funcionários do Instituto de Veterinária, que sempre me ajudaram direta ou indiretamente, em especial a GILBERTO FLAUSINO, pela sua cooperação e paciência, e ao amigo de fé ATAÍDE BAPTISTA.

Ao Dr. JOSÉ PROCÓPIO MORENO SENNA que me ajudou, mesmo à distância e sem me conhecer, na técnica de extração de DNA bacteriano.

Ao grande mestre, ROGÉRIO GARBER, que me fez entender as análises estatísticas desse estudo. Obrigada pela paciência e dedicação dispensadas.

Ao Médico Veterinário e Presidente do Centro de Estudos Instituto Veterinário Municipal Jorge Waitsman, DR. CEZAR COUTO BERMONDO, aos Médicos Veterinários: FERNANDO QUILHERME DE OLIVEIRA, ILTON RAMALHO DE ALMEIDA e SIMONE MAIA FERNANDES pela colaboração cedida para a coleta de amostras.

Ao Médico Veterinário e Diretor da Policlínica Veterinária da Universidade Estácio de Sá, Dr. CARLOS XAVIER FERNANDES e a toda sua equipe pelas amostras cedidas e pela dedicação.

Agradeço a POLÍCIA MILITAR DO ESTADO DO RIO DE JANEIRO e a médica veterinária CLARA TRAPA, pelas amostras cedidas e pelo apoio na execução deste trabalho.

Agradeço aos médicos veterinários e estagiários do HOSPITAL VETERINÁRIO DE PEQUENOS ANIMAIS DA UFRRJ, pelas amostras cedidas.

Ao Curso de PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS da UFRRJ e aos seus funcionários, pelo apoio em materiais e pelas condições que recebemos para trabalhar, em especial no Laboratório de Biologia Molecular.

Agradeço ao CONSELHO NACIONAL DE DESENVOLVIMENTO CIENTÍFICO E TECNOLÓGICO (Cnpq) e a COORDENAÇÃO DE APERFEIÇOAMENTO DE PESSOAL DE NÍVEL SUPERIOR (CAPES) pela bolsa de estudos e patrocínios agraciados durante este doutorado. E a FUNDAÇÃO CARLOS CHAGAS FILHO DE AMPARO À PESQUISA DO ESTADO DO RIO DE JANEIRO (FAPERJ) pelo apoio em equipamentos utilizados no Laboratório de Biologia Molecular e em projetos que nos foram contemplados.

BIOGRAFIA

Ingrid Annes Pereira, filha de Paulo Roberto Fernandes Pereira (*in memorian*) e Guaraciara Annes Pereira, nascida em 23 de novembro de 1982, no bairro de Laranjeiras, município Rio do Janeiro-RJ.

Cursou o primário, ensino fundamental, parte do ensino médio no Colégio Replublicano e o último ano do 2º grau no Colégio e Pré-vestibular Bahiense no município do Rio de Janeiro.

No ano de 2000 ingressou no Curso de Medicina veterinária da universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica – RJ, diplomando-se em março de 2005.

Foi aprovada no Processo de Seleção para o Curso de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, do Instituto de Veterinária da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro em 2005, sob a orientação da Prof.^a Dr.^a. Miliane Moreira Soares de Souza. Foi bolsista do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (Cnpq) no período de março de 2005 a fevereiro de 2007.

Em 2007, foi aprovada no Processo de Seleção para o Curso de Pós-graduação em Ciências Veterinárias, nível Doutorado, do Instituto de Veterinária da UFRRJ sob orientação da Professora Dra. Miliane Moreira Soares de Souza. Foi bolsista do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (Cnpq) durante o período de março de 2007 a fevereiro de 2010.

RESUMO

PEREIRA, Ingrid Annes. **Etiologia dos processos infecciosos e abordagem sobre a avaliação em *Staphylococcus* spp. dos fatores de virulência e resistência aos antimicrobianos de uso clínico em cães e gatos.** 139 p. Tese (Doutorado em Ciências Veterinárias). Instituto de Veterinária, Departamento de Parasitologia Animal, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2010.

O presente estudo realizou uma abordagem investigativa sobre a etiologia de processos infecciosos de animais de companhia e seu respectivo perfil de suscetibilidade antimicrobiana. Foram investigados diferentes mecanismos de resistência à azitromicina e oxacilina, e os principais fatores de virulência expressos em *Staphylococcus* spp. provenientes desses casos de infecção. Foram coletados 225 espécimes de casos de otite externa, pioderma, infecções do trato genito-urinário, respiratório, cavidade oral e da mucosa conjuntival de cães e gatos. Foram identificados 100 isolados do gênero *Staphylococcus* spp. representados por: *S. aureus*, *S. intermedius*, *S. hyicus* e *Staphylococcus* spp. coagulase-negativos. Também foram detectados 64 Bastonetes Gram-negativos (BGN), representados por *Pseudomonas* e enterobactérias. Os *Staphylococcus* spp. foram mais resistentes à penicilina, ampicilina, cefoxitina, ceftriaxona, azitromicina e clindamicina. As Enterobactérias foram mais resistentes à enrofloxacina e tetraciclina, enquanto *Pseudomonas* spp. à ceftriaxona. Diferentes testes foram utilizados para avaliação do perfil de atividade da azitromicina dentre estes, a Difusão em Disco e a Microdiluição em Caldo, que detectaram resistência em 55% e 66% dos *Staphylococcus* spp., respectivamente e 53,1% e 90% dos BGN. A CIM_{50/90} foi de 16,0 µg/mL e 64 µg/mL para *Staphylococcus* spp. e de 256µg/mL e >512µg/mL para BGN. Também foram detectados genes envolvidos na resistência à macrolídeos, tais como, os genes *ermA*, *B* e *C* em 12%, 3% e 24% dos *Staphylococcus* spp., respectivamente. Em relação à resistência à oxacilina, foi possível detectar um fenótipo de resistência heterogêneo sendo o teste de “Ágar screen” mais sensível na predição dessa resistência. O gene *mecA* foi detectado em 25% dos *Staphylococcus* spp., destes três isolados foram positivos para todos os genes do sistema *mec* (*mecA-mecI-mecR1*) e estes apresentaram resistência à oxacilina na maioria dos testes fenotípicos. Os genes do sistema regulatório para produção de β-lactamase foram investigados, tendo sido detectado apenas o gene *blaZ* em 9% dos isolados, os genes *blaZ* e *blaI* em 19% e os genes do sistema *blaZ*, *blaI* e *blaR1* em 3% dos *Staphylococcus* spp. Quanto aos fatores de virulência de *Staphylococcus* spp., 81% dos *Staphylococcus* spp. foram produtores de “slime” e destes 15% foram positivos para os genes *icaA* e *icaD*. Um total de 43% dos isolados foram hemolíticos, sendo prevalente a β-hemolisina. Os genes *hla* e *hly* foram detectados em 48,8% dos *Staphylococcus* spp. hemolíticos. O gene *spaA*, que codifica a região X da proteína A de superfície celular, foi positivo em todos os *S. aureus*, e em 88,2% dos *S. intermedius* e 75% dos *S. hyicus*, apresentando amplicons de tamanhos variados, sendo o tamanho prevalente o de 300pb. A amplificação do gene *coa* apresentou cinco tipos polimórficos distintos, sendo prevalente o amplicon de 520pb. O gene *agr* foi detectado em 29% dos *Staphylococcus* spp.. Em apenas 5% dos *Staphylococcus* spp.. O gene *agr* apresentou regulação positiva de hemolisinas e negativa da proteína A de superfície, sugerindo a interferência de outros sistemas reguladores.

Palavras-chave: Processos infecciosos, animais de companhia, resistência antimicrobiana, fatores de virulência, *Staphylococcus* spp..

ABSTRACT

PEREIRA, Ingrid Annes. **Etiology of infectious diseases of dogs and cats and approach on *Staphylococcus* spp. virulence factors and resistance to antimicrobials applied in veterinary practices.** 139p. Tesis (Doctor in Veterinary Science). Instituto de Veterinária, Departamento de Parasitologia Animal, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2008.

The present study was designed to investigate the etiology of different infectious disease of pet animals and the bacteria antimicrobial susceptibility pattern. Also different oxacillin and azithromycin resistance mechanisms and virulence factors of *Staphylococcus* spp. were investigated in order to enlarge the knowledge about pathogenic potential of this bacteria. A total of 225 clinical samples of dogs and cats were collected from cases of otitis externa, pyoderma, infections from urinary, reproductive and respiratory tract, oral and conjunctival mucosas. There were identified 100 isolates from genus *Staphylococcus* spp. represented by the species *S. aureus*, *S. intermedius* e *S. hyicus* and negative-coagulase *Staphylococcus*. It was also detected 64 Gram-negative rods (GNR), represented by *Pseudomonas* spp. and Enterobacteriaceae. *Staphylococcus* spp. isolates were resistant to penicillin, ampicillin, cefoxitin, azithromycin and clindamycin, while Enterobacteriaceae were resistant to enrofloxacin and tetracycline, and *Pseudomonas* spp. to ceftriaxone. Different tests were used to access the activity pattern of azithromycin, such as Disc Diffusion and Broth Microdilution that detected 55% and 66% of resistant *Staphylococcus* spp., and 53,1% e 90% of resistant GNR. *Staphylococcus* spp. azithromycin MIC_{50/90} were 16,0 µg/mL and 64 µg/mL, to GNR were 256µg/mL and >512µg/mL. Macrolide resistance genes, such *ermA*, *B* and *C*, were detected in 12%, 3% and 24% of *Staphylococcus* spp. isolates and all isolates were negative to *mef* gene. Concerning to the oxacillin resistance, it was possible to detect a heterogeneous phenotype and the agar screen test was the most sensitive to predicte this resistance. The *mecA* gene were detected in 25% of *Staphylococcus* isolates, and three of them were positive to all genes of the *mec* complex (*mecA-mecI-mecR1*) and phenotically resistant to oxacillin in most of the tests. It was also investigated the *blaZ* genes complex wich are involved in regulation of β-lactamase, been possible to detect only *blaZ* gene in 9% of isolates, *blaZ* e *blaI* genes in 19% and the complete complex (*blaZ*, *blaI* and *blaR1*) in 3% of *Staphylococcus* spp. About the virulence factors, 81% were slime producers and 15% of them were associated to the presence of *icaA* and *icaD* genes. In 43% of isolates were detected hemolysis and the β-hemolisin were the prevalent one. The *hla* e *hly* genes were detected in 48,8% of hemolytic *Staphylococcus* spp. isolates. The *spaA* gene that codifies the X region of protein A was positive in all *S. aureus* isolated and in 88,2% of *S. intermedius* and 75% of *S. hyicus*, revealed different size of amplicons, being the prevalent the size of 300pb. The amplification of the *coa* gene presented five distinct polymorfics types, with single and double bands, being prevalent the profile of 520pb. The *agr* gene was positive in 29% of *Staphylococcus* spp. Only in 5% of *Staphylococcus* spp. the *agr* gene was correlated to positive regulation of hemolins and negative regulation of protein A.

KEY WORD: infectious disease, pet animals, antimicrobial resistance, virulence factors, *Staphylococcus* spp.

LISTA DE ABREVIACÕES

SCN: *Staphylococcus* spp. coagulase-negativos
SCP: *Staphylococcus* spp. coagulase-positivos
BGN: Bastonetes Gram-negativos
MLS_B: macrolídeos, lincosaminas e estreptogramina B
ERM : enzimas metiltransferases
erm: “erythromycin ribosome methylase”
cMLS_B: resistência constitutiva aos MLS_B
iMLS_B: resistência induzida aos MLS_B
mRNA: RNA mensageiro
APGF: água, peptona, glicose e fosfato
BHI: Infuso Cérebro Coração
CIM: Concentração Inibitória Mínima
DNA: ácido desoxiribonucléico
KOH: hidróxido de potássio
MH: “Müller-Hinton”
h: horas
mL: mililitros
mm: milímetros
mM: milimolar
MVF: Agar Manitol Vermelho de Fenol
MRSA: *Staphylococcus aureus* resistentes à meticilina
ORSA: *Staphylococcus aureus* resistentes à oxacilina
MARSA: *Staphylococcus aureus* resistentes à múltiplos antimicrobianos
EMRSA: *Staphylococcus aureus* resistentes à meticilina epidêmicos
PBP: “Penicillin Binding Protein” - Proteína Ligadora de Penicilina
SCC_{mec}: cassette cromossômico de *mec* estafilocócico
ccr: “Cassete Chromosome Recombinases”
IS43: elemento de inserção 431
NaCl: cloreto de sódio
pb: pares de base
SP: estirpes produtoras de “slime”
NSP: estirpes não produtoras de “slime”
PFGE: eletroforese por campo pulsátil
QS: “Quorum Sensing”
AIS: moléculas autoindutoras
pH: potencial hidrogeniônico
PCR: “Polymerase Chain Reaction” - reação em cadeia de polimerase
rpm : rotação por minuto
CLSI: “Clinical and Laboratory Standards Institute”
NCCLS: “National Committee for Clinical Laboratory Standards”
U: unidades
UI: unidade internacional
UFC: unidades formadoras de colônia
V: volts
VP: “Voges Proskauer”
µg: micrograma
µL: microlitro
°C: graus Celsius

ÍNDICE DE FIGURAS

	Pág
Figura 1. Estrutura molecular da azitromicina.	10
Figura 2. Estruturas dos cassetes estafilocócicos <i>mec</i> tipos I, II, III, IV (subtipos IVa, IVb e IVc) e V.	15
Figura 3. Desenvolvimento de um biofilme.	19
Figura 4. Diagrama esquemático do gene <i>spaA</i> .	20
Figura 5. Diagrama esquemático do gene <i>coa</i> .	21
Figura 6. Diagrama esquemático do gene regulatório <i>agr</i> .	23
Figura 7. Gráfico apresentando o percentual de isolados bacterianos obtidos a partir das técnicas de isolamento e identificação bacteriológica dos 220 espécimes provenientes de infecções em animais de companhia.	39
Figura 8. Gráfico apresentando o percentual de isolados bacterianos obtidos a partir das técnicas de isolamento e identificação bacteriológica dos 66 espécimes provenientes de otite externa canina.	41
Figura 9. Gráfico apresentando o percentual de isolados bacterianos obtidos a partir dos 42 espécimes provenientes de infecções de pele de animais de companhia.	42
Figura 10. Gráfico apresentando o percentual de isolados bacterianos obtidos a partir dos 49 espécimes provenientes de infecções do trato urinário inferior de animais de companhia.	43
Figura 11. Método de difusão em disco.	46
Figura 12. Gráfico apresentando o percentual de resistência dos <i>Staphylococcus</i> spp. (n=100) de processos infecciosos de animais de companhia.	46
Figura 13. Gráfico apresentando o percentual de resistência de <i>Staphylococcus</i> spp. isolados de infecções em animais de companhia frente antibióticos β -lactâmicos e cefalosporinas.	47
Figura 14. Gráfico dos percentuais de resistência de Enterobacteriaceae (n=53) isolados de diferentes sítios infecciosos de animais de companhia.	50
Figura 15. Gráfico dos percentuais de resistência de Pseudomonadaceae (n=11) isolados de diferentes sítios infecciosos de animais de companhia.	51
Figura 16. Genes de identificação das espécies <i>Staphylococcus aureus</i> , <i>S. intermedius</i> e <i>S. hyicus</i> isolados de infecções de animais de companhia em gel de agarose 1,5%.	53
Figura 17. Teste de microdiluição em caldo.	55
Figura 18. Teste de diluição ágar	56
Figura 19. Gráfico do perfil de atividade da azitromicina segundo resultados obtidos no teste de microdiluição em caldo.	57
Figura 20. Gráfico do perfil de atividade da azitromicina segundo resultados obtidos no teste de diluição em ágar.	59
Figura 21. Gráfico do perfil de atividade da azitromicina frente os BGN.	59
Figura 22. Genes <i>ermA</i> (A) (421 pb), <i>ermB</i> (B) (639 pb) e <i>ermC</i> (512 pb) (B) de <i>Staphylococcus</i> spp. isolados de animais de companhia em gel de agarose (1,5%).	60

Figura 23.	Gene <i>mecA</i> (513 pb) de oito isolados de <i>Staphylococcus intermedius</i> provenientes de infecções de animais de companhia em gel de agarose a 1,5%.	64
Figura 24.	Resistência à oxacilina avaliada através do teste de ágar “screen”.	67
Figura 25.	Genes <i>blaZ</i> dos <i>Staphylococcus</i> spp. de infecções de animais de companhia em gel de agarose a 1,5%.	71
Figura 26.	Gene <i>femA</i> (132 pb) de <i>Staphylococcus aureus</i> isolados de infecções de animais de companhia em gel de agarose (1,5%).	75
Figura 27.	Técnica da microplaca revelando a produção de “slime”, por <i>Staphylococcus</i> spp. isolados de infecções em animais de companhia.	79
Figura 28.	Genes <i>icaD</i> (A) e <i>icaA</i> (B) em <i>Staphylococcus</i> spp. de infecções de animais de companhia, em gel de agarose a 1,5%.	80
Figura 29.	Colônias de <i>Staphylococcus</i> spp. isolados de infecções em animais de companhia crescidas em ágar Vermelho Congo.	81
Figura 30.	Produção de hemolisinas por <i>Staphylococcus</i> spp. isolados de infecções em animais de companhia.	82
Figura 31.	Genes <i>hla</i> (210pb) e <i>hlb</i> (300pb) em <i>Staphylococcus</i> spp. isolados de infecções de animais de companhia, através do PCR multiplex (gel de agarose a 1,5%).	83
Figura 32.	Gene <i>spaA</i> (região polimórfica) em <i>Staphylococcus</i> spp. isolados de infecções de animais de companhia (gel de agarose a 1,5%).	85
Figura 33.	Gene <i>coa</i> em <i>Staphylococcus</i> spp. isolados de infecções de animais de companhia (gel de agarose a 1,5%).	87

ÍNDICE DE QUADROS

	Pág
Quadro 1. Iniciadores e ciclos empregados para amplificação dos genes de identificação das espécies de <i>Staphylococcus</i> spp. coagulase-positivos.	35
Quadro 2. Iniciadores e ciclos empregados para amplificação dos genes de resistência à macrolídeos de <i>Staphylococcus</i> spp..	36
Quadro 3. Iniciadores e ciclos empregados para a amplificação dos genes do sistema <i>mec</i> de <i>Staphylococcus</i> spp..	36
Quadro 4. Iniciadores e ciclos empregados para amplificação dos genes <i>bla</i> de <i>Staphylococcus</i> spp..	37
Quadro 5. Iniciadores e ciclos empregados para amplificação dos genes de virulência de <i>Staphylococcus</i> spp..	37
Quadro 6. Iniciadores e ciclos empregados para amplificação dos genes de virulência de <i>Staphylococcus</i> spp..	38

ÍNDICE DE TABELAS

	Pág
Tabela 1. Percentual de isolados bacterianos obtidos nos respectivos sítios infecciosos investigados.	40
Tabela 2. Perfis de suscetibilidade à azitromicina dos <i>Staphylococcus</i> spp. positivos para genes <i>erm</i> (n=37).	61
Tabela 3. Perfis de suscetibilidade à oxacilina dos isolados de <i>Staphylococcus</i> spp. (n=100) nos distintos testes fenotípicos.	63
Tabela 4. Perfil de resistência a antibióticos β-lactâmico de <i>Staphylococcus</i> spp. <i>mecA</i> -positivos (n= 25).	65
Tabela 5. Perfil de resistência a diferentes classes de antibióticos de <i>Staphylococcus</i> spp. <i>mecA</i> -positivos (n= 25).	65
Tabela 6. Percentual de sensibilidade, especificidade, valor preditivo positivo e negativo dos testes de suscetibilidade à oxacilina em <i>Staphylococcus</i> spp. (n=100)	66
Tabela 7. Percentual de sensibilidade, especificidade, valor preditivo positivo e negativo dos testes de difusão com disco de oxacilina e cefoxitina em <i>Staphylococcus</i> spp. <i>mecA</i> -positivos (n=100).	68
Tabela 8. Genes do sistema regulatório <i>mec</i> e fenótipo de resistência à oxacilina dos <i>Staphylococcus</i> spp. (n=100)	69
Tabela 9. Perfil de suscetibilidade a alguns antibióticos β-lactâmicos dos <i>Staphylococcus</i> spp. produtores de β-lactamase (n=38) detectada através do teste de nitrocefina.	71
Tabela 10. Detecção dos genes <i>blaZ</i> e resistência à oxacilina em <i>Staphylococcus</i> spp. (n=32).	72
Tabela 11. Perfis de resistência à antibióticos β-lactâmicos e a presença de genes <i>blaZ</i> de <i>Staphylococcus</i> spp. (n=100).	74
Tabela 12. Percentual de sensibilidade, especificidade, valor preditivo positivo e negativo do teste de nitrocefina com a detecção do gene <i>blaZ</i> .	75
Tabela 13. Detecção dos genes <i>femA</i> e <i>mecA</i> em <i>Staphylococcus</i> spp. isolados de infecções em animais de companhia	76
Tabela 14. Genótipo e fenótipo de resistência à azitromicina em <i>Staphylococcus</i> spp. <i>blaZ</i> -positivos (n= 25 isolados)	77
Tabela 15. Perfil de resistência à azitromicina e a presença de genes <i>blaZ</i> de <i>Staphylococcus</i> spp. (n=100).	78
Tabela 16. Níveis de produção de “slime” dos 100 isolados de <i>Staphylococcus</i> spp. provenientes de infecções em animais de companhia.	79
Tabela 17. Presença dos genes <i>icaAD</i> e característica de coloração em ágar vermelho congo por <i>Staphylococcus</i> spp.	81
Tabela 18. Detecção de hemolisinas e os genes <i>hla</i> e <i>hly</i> dos 100 isolados de <i>Staphylococcus</i> spp.	83
Tabela 19. Perfis estabelecidos segundo amplificação da região X do gene <i>spaA</i> em <i>Staphylococcus aureus</i> (n=22) isolados de infecções de animais de companhia.	84
Tabela 20. Perfis estabelecidos segundo amplificação da região X do gene <i>spaA</i> em <i>Staphylococcus intermedius</i> (n=30) e <i>S. hyicus</i> (n=10) isolados de infecções de animais de companhia.	85
Tabela 21. Perfil polimórfico do gene <i>spaA</i> em <i>Staphylococcus</i> spp. isolados de de animais de companhia.	86
Tabela 22. Perfis estabelecidos segundo amplificação do gene <i>coa</i> em	

	<i>Staphylococcus</i> spp.	87
Tabela 23.	Perfil polimórfico do gene <i>coa</i> em <i>Staphylococcus</i> spp. isolados de infecções de animais de companhia.	88
Tabela 24.	Detecção do gene <i>agr</i> e fatores de virulência em <i>Staphylococcus</i> spp. (n=100).	89
Tabela 25.	Percentual de resistência dos 39 isolados de <i>Staphylococcus</i> spp. isolados de casos de otite externa canina.	91

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO	1
2.	REVISÃO DE LITERATURA	4
2.1.	Processos Infeciosos em Animais de Companhia	4
2.1.1.	Otite externa canina	4
2.1.2.	Infecções de pele	4
2.1.3.	Infecções do trato urinário	5
2.1.4.	Infecções uterinas em cadelas	5
2.1.5.	Infecções bacterianas do trato respiratório inferior	6
2.1.6.	Infecções da cavidade oral	6
2.1.7.	Infecções da conjuntiva ocular	7
2.2.	<i>Staphylococcus</i> spp. e processos infecciosos de animais de companhia	7
2.3.	Resistência antimicrobiana x Condutas terapêuticas em Medicina Veterinária	8
2.3.1.	Animais de Companhia x Disseminação da Resistência Antimicrobiana	8
2.4.	Azitromicina	9
2.4.1.	Aspectos farmacológicos e microbiológicos	10
2.4.2.	Mecanismos de resistência à azitromicina	11
2.5.	Resistência cruzada entre antibióticos macrolídeos e β -lactâmicos em <i>Staphylococcus</i> spp.	13
2.5.1.	<i>Staphylococcus</i> spp. resistentes à múltiplos antimicrobianos	14
2.5.2.	Marcadores genéticos da resistência aos antibióticos β -lactâmicos	14
2.6.	Fatores de virulência associados à <i>Staphylococcus</i> spp.	17
2.6.1.	Formação de biofilme (genes <i>icaA</i> e <i>icaD</i>)	18
2.6.2.	Proteína A (gene <i>spaA</i>)	20
2.6.3.	Produção de coagulase (gene <i>coa</i>)	21
2.6.4.	Propriedades hemolíticas (genes <i>hla</i> e <i>hly</i>)	21
2.6.5.	Sistema regulador de proteínas (gene <i>agr</i>)	22
3.	OBJETIVOS	25
3.1.	Objetivo geral	25
3.2.	Objetivos específicos	25
4.	MATERIAL E METÓDOS	36
4.1.	Origem das amostras	26
4.2.	Coleta das Amostras	26
4.2.1.	Quadros de otite externa canina	26
4.2.2.	Quadros de infecção de pele	26
4.2.3.	Quadros de infecção urinária	26
4.2.4.	Quadros de infecção uterina em cadelas	26
4.2.5.	Quadros de infecção de infecção respiratória	27
4.2.6.	Quadros de infecção da conjuntiva ocular	27
4.2.7.	Quadros de infecção do tecido ósseo	27
4.2.8.	Quadros de infecção da cavidade oral	27
4.2.9.	Quadros de infecção do trato gastrointestinal	27

4.3.	Isolamento Primário e Identificação Presuntiva	27
4.3.1.	<i>Staphylococcus</i> spp.	27
4.3.2.	<i>Streptococcus</i> spp.	28
4.3.3.	Enterobactérias	28
4.3.4.	Bastonetes Gram-negativos não-fermentadores	28
4.3.5.	Bastonetes Gram-positivos	28
4.4.	Teste de suscetibilidade aos antimicrobianos de eleição	29
4.4.1.	Antimicrobianos	29
4.4.2.	Técnica da Difusão em Disco	29
4.5.	Avaliação <i>in vitro</i> do Perfil de Atividade da Azitromicina	30
4.5.1.	Avaliação do perfil de suscetibilidade bacteriana a azitromicina através da técnica de Difusão em Disco	30
4.5.2.	Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) para azitromicina através da técnica de Microdiluição em Caldo	30
4.5.3.	Determinação da CIM para azitromicina através da técnica de Diluição em Ágar	30
4.5.4.	Deteção do fenótipo MLS _B em <i>Staphylococcus</i> spp. isolados de infecções de animais de companhia	30
4.6.	Avaliação da Resistência Cruzada em <i>Staphylococcus</i> spp. Resistentes à Oxacilina e Azitromicina em isolados de infecções de animais de companhia	31
4.7.	Avaliação fenotípica da resistência à oxacilina	31
4.7.1.	Teste de difusão em disco simples para deteção do perfil de suscetibilidade à oxacilina e aos antibióticos β -lactâmicos	31
4.7.2.	Difusão em Disco Modificada	32
4.7.3.	Ágar Screen	32
4.7.4.	Determinação da CIM para oxacilina através da Técnica da Microdiluição em Caldo	32
4.7.5.	Determinação da CIM para oxacilina através da Técnica de Diluição em Ágar	32
4.8.	Teste de suscetibilidade à cefoxitina	33
4.9.	Testes de deteção da produção de β -lactamases em <i>Staphylococcus</i> spp.	33
4.9.1.	Teste de fita para deteção da produção de β -lactamases	33
4.9.2.	Teste de nitrocefin para deteção da produção de β -lactamases	33
4.10.	Deteção Fenotípica dos Fatores de Virulência em <i>Staphylococcus</i> spp. isolados de infecções em animais de companhia	33
4.10.1.	Produção de “slime” em microplaca	33
4.10.2.	Produção de “slime” em ágar Vermelho Congo	34
4.10.3.	Produção de Hemolisinas	34
4.10.4.	Sinergismo Hemolítico (SHA)	34
4.11.	Técnica de Reação em Cadeia de Polimerase (PCR) para a amplificação dos genes de resistência e virulência em <i>Staphylococcus</i> spp. isolados de infecções em animais de companhia	34
4.11.1.	Extração do DNA bacteriano	34
4.11.2.	Amplificação dos genes através da técnica de PCR	35
4.11.2.1.	Genes de identificação das espécies de <i>Staphylococcus</i> spp coagulase-positivos	35
4.11.2.2.	Genes de resistência à macrolídeos de <i>Staphylococcus</i> spp.	36
4.11.2.3.	Genes de resistência à oxacilina de <i>Staphylococcus</i> spp.	36
4.11.2.4.	Genes de relacionados à produção de β -lactamases de <i>Staphylococcus</i>	

spp.	36
4.11.2.5. Genes de virulência de <i>Staphylococcus</i> spp.	37
4.11.2.6. Genes de fatores de virulência com padrão polimórfico de <i>Staphylococcus</i> spp.	37
4.12. Análise estatística	38
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	39
5.1. Identificação das Espécies	39
5.1.1. Otite externa canina	40
5.1.2. Infecções de pele	42
5.1.3. Infecções do trato urinário	42
5.1.4. Infecções do trato reprodutivo de cadelas	43
5.1.5. Infecções da mucosa oral	44
5.1.6. Infecções do trato respiratório inferior	44
5.1.7. Infecções da conjuntiva ocular	45
5.1.8. Infecções do trato gastrointestinal	45
5.1.9. Infecções do tecido ósseo	45
5.2. Suscetibilidade antimicrobiana das bactérias isoladas de diferentes infecções em animais de companhia	45
5.2.1. Perfil de suscetibilidade antimicrobiana dos <i>Staphylococcus</i> spp.	45
5.2.1.1. Antibióticos β -lactâmicos e cefalosporinas	47
5.2.1.2. Antibióticos glicopeptídeos e aminoglicosídeos	48
5.2.1.3. Antibióticos fluoroquinolonas	49
5.2.1.4. Outras classes de Antibióticos avaliadas	49
5.2.2. Perfil de suscetibilidade antimicrobiana dos Bastonetes Gram-negativos	50
5.3. <i>Staphylococcus</i> spp. em processos infecciosos de animais de companhia	52
5.3.1. Testes bioquímicos de identificação fenotípica	52
5.3.2. Identificação genotípica	53
5.4. Perfil de suscetibilidade à Azitromicina	54
5.4.1. Ensaio de Difusão em Disco	54
5.4.2. Ensaio de Microdiluição em Caldo	55
5.4.3. Ensaio de Diluição em Ágar	56
5.4.4. Determinação da CIM para azitromicina	57
5.4.5. Teste de duplo disco para detecção do fenótipo de resistência em antibióticos MLSB em <i>Staphylococcus</i> spp.	60
5.4.6. Detecção de marcadores genéticos da resistência à macrolídeos em <i>Staphylococcus</i> spp.	60
5.5. Detecção de marcadores da resistência à oxacilina em <i>Staphylococcus</i> spp.	62
5.5.1. Avaliação fenotípica da resistência à oxacilina em <i>Staphylococcus</i> spp.	62
5.5.2. Detecção do gene <i>mecA</i> em <i>Staphylococcus</i> spp.	63
5.5.3. Avaliação da resistência à múltiplos antimicrobianos em <i>Staphylococcus</i> spp. <i>mecA</i> -positivos	64
5.5.4. Avaliação dos testes fenotípicos para detecção da suscetibilidade à oxacilina em <i>Staphylococcus</i> spp.	66
5.5.5. Teste de suscetibilidade à cefoxitina e gene <i>mecA</i>	67
5.5.6. Detecção de Genes reguladores do sistema <i>mec</i> em <i>Staphylococcus</i> spp.	68
5.5.7. Produção de β -lactamases por <i>Staphylococcus</i> spp.	70
5.5.7.1. Testes fenotípicos de detecção da produção de β -lactamases	70

5.5.7.2.	Detecção dos genes do sistema <i>blaZ</i> em <i>Staphylococcus</i> spp.	71
5.5.7.3.	Detecção de genes do sistema regulatório <i>blaZ</i> em <i>Staphylococcus</i> spp. resistentes a múltiplos antibióticos β -lactâmicos	73
5.5.8.	<i>Staphylococcus</i> spp. e gene <i>femA</i>	75
5.6.	Avaliação da possível resistência cruzada entre azitromicina e oxacilina em <i>Staphylococcus</i> spp. isolados de infecções em animais de companhia	76
5.7.	Correlação entre a presença de genes do sistema <i>blaZ</i> e a resistência a azitromicina em <i>Staphylococcus</i> spp. isolados de infecções em animais de companhia	77
5.8.	Fatores de virulência	79
5.8.1.	Produção de “slime” e genes <i>icaA</i> e <i>icaD</i>	79
5.8.2.	Produção de hemolisinas e genes <i>hla</i> e <i>hlb</i>	82
5.8.3.	Gene <i>spaA</i> em <i>Staphylococcus</i> spp.	84
5.8.4.	Gene <i>coa</i> em <i>Staphylococcus</i> spp.	86
5.8.5.	Gene <i>agr</i> em <i>Staphylococcus</i> spp.	88
5.9.	Análise epidemiológica dos processos infecciosos de animais de companhia	90
5.9.1.	Coleta das amostras	90
5.9.2.	Processos infecciosos	91
5.9.2.1.	Otite externa canina	91
5.9.2.2.	Infecções do Trato urinário	93
5.9.2.3.	Infecções da pele	93
6.	CONCLUSÃO	95
6.1.	Considerações Finais	96
7.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	97

1. INTRODUÇÃO

Os animais de companhia, como cães e gatos, estão frequentemente expostos a uma gama de bactérias presentes no ambiente que podem colonizar locais específicos como, a pele, trato digestório, respiratório e urogenital. Uma grande diversidade de agentes microbianos pode estar associada aos processos infecciosos de animais de companhia, dentre estes, diferentes espécies de bactérias dos gêneros *Staphylococcus* spp., *Streptococcus* spp. e espécies Gram-negativas, tais como, *Escherichia coli* e *Pseudomonas aeruginosa* são comumente identificadas (GUARDABASI et al., 2004). Estes agentes infecciosos, em associação às condições imunológicas do hospedeiro e fatores extrínsecos, podem desenvolver doenças que apresentam resultados clínicos variáveis segundo a virulência e patogenicidade do agente. O isolamento e identificação bacteriana são ferramentas importantes para evitar falhas comuns na conduta terapêutica quando o tratamento é realizado de forma presuntiva, como por exemplo, *Staphylococcus intermedius* em piodermatite canina, desconsiderando a possibilidade do envolvimento de diferentes espécies bacterianas na etiologia desta infecção. No entanto, a compreensão da significância da conduta microbiológica diagnóstica parece ter sido substituída pela prática do diagnóstico terapêutico que colabora com o aumento do uso de antimicrobianos de amplo espectro favorecendo casos de resistência e falhas terapêuticas.

Desde seu lançamento no mercado farmacológico “pet” do Brasil, a azitromicina tem sido utilizada em larga escala na clínica veterinária de pequenos animais. No entanto, não existem relatos a respeito do perfil de suscetibilidade dos isolados bacterianos de origem animal. As vantagens microbiológicas e bioquímicas da azitromicina estimularam os médicos veterinários atuantes na área de clínica de pequenos animais a prescreverem este fármaco como alternativa eletiva ao tratamento de diferentes processos infecciosos. A azitromicina é um antibiótico da classe dos macrolídeos, indicada para o tratamento de processos infecciosos dos sistemas genito-urinário, respiratório, oral e pele de cães e gatos. Este fármaco apresenta características farmacocinéticas e microbiológicas diferenciais, podendo ser absorvida pela via oral e parenteral em dose única diária e em ciclos de tratamento curtos, favorecendo a terapêutica veterinária. Seu mecanismo de ação é bacteriostático e consiste na ligação à subunidade 23S do ribossomo, inibindo assim a síntese protéica. As características farmacocinéticas mais importantes incluem rápida e elevada difusão tissular e meia-vida biológica bastante prolongada (GIRARD et al., 1990). Apresenta atividade contra bactérias aeróbias e anaeróbias Gram-positivas, com exceção de enterococos, e contra Gram-negativos (RETSEMA, 1999).

Embora as vantagens na administração e a eficácia terapêutica da azitromicina sejam reconhecidas, sua utilização indiscriminada, sem um monitoramento microbiológico, pode acarretar aumento da pressão seletiva na população bacteriana, e induzir alguns mecanismos de resistência. Estudos científicos apontam para o desenvolvimento de resistência à azitromicina em cepas Gram-positivas, incluindo *Streptococcus pneumoniae* e à maioria das cepas de *Staphylococcus* spp. oxacilina-resistentes provenientes de infecções humanas (AMSDEN, 1999; TRAMPER-STRANDERS et al., 2007) e em cepas Gram-negativas, como *Haemophilus* spp. e *Pseudomonas aeruginosa* produtora de biofilme (GILLIS et al., 2005; PHAFF et al., 2006).

Os mecanismos bioquímicos associados à resistência a antibióticos macrolídeos, como a azitromicina, compreendem modificação do sítio ativo ribossomal, bombas de

efluxo e inativação antimicrobiana, e resultam em uma variedade de fenótipos de resistência (LECLERCQ, 2002). A modificação do sítio ativo ribossomal ocorre através produção de metiltransferases, que reduzem a afinidade dos macrolídeos pelos alvos bacterianos, estas enzimas são codificadas pelos genes *erm* já detectados em uma ampla variedade de espécies bacterianas. O mecanismo associado a bombas de efluxo promove o desenvolvimento de componentes transmembrana com atividade transportadora reduzida e pode ser mediado pela aquisição de genes *mef* (LECLERCQ, 2002; LIM et al., 2002).

Alguns estudos relataram também o desenvolvimento de resistência cruzada à azitromicina em cepas de *Staphylococcus* spp. oxacilina-resistentes portadoras do gene *mecA*. O gene *mecA* regula a produção de uma proteína alvo modificada de baixa afinidade pelos antibióticos β -lactâmicos, denominada de PBP2a ou PBP2' (MOON et al., 2007). A redução da afinidade de proteínas transportadoras da membrana bacteriana pode ser um mecanismo responsável pela resistência cruzada entre diferentes classes de antimicrobianos (LIM et al., 2002). Este gene é inserido no cromossomo estafilocócico através de um elemento genético móvel, denominado cassete estafilocócico cromossômico *mec* (SCC*mec*-“staphylococcal cassette chromossome”), que pode ser transferido via plasmídeos, transposons, e se integrarem a ilhas de patogenicidade do genoma bacteriano (KATAYAMA et al., 2000). O cassete *mec* carrega outros elementos genéticos como *Tn554*, pUB110 e pT181, que codificam a resistência às outras classes de antimicrobianos causando multirresistência. A transferência horizontal do gene *mecA* em *Staphylococcus* spp. resultou na disseminação mundial de clones oxacilina e multidroga-resistentes, tornando-se uma dificuldade adicional para o controle de infecções causadas por este agente (ITO et al., 2001).

Além da habilidade apresentada pelos *Staphylococcus* spp. em disseminar informações genéticas, permitindo o intercâmbio entre bactérias da mesma espécie ou espécies diferentes, seu reconhecido potencial de patogenicidade favorece sua atuação como agente etiológico das infecções humanas e animais. Em medicina veterinária, as principais patologias provocadas por este gênero incluem as infecções de pele, otite externa, infecções respiratórias, do trato urinário e gastrointestinal de cães e gatos, além de outras espécies animais (SCOTT et al., 2001; ÇETIN et al., 2003; FRANSSON; RAGLE, 2003; OLIVEIRA et al., 2005).

Os processos infecciosos provocados por *Staphylococcus* spp. podem estar associados a expressão de uma ampla variedade de fatores de virulência extracelulares e outras proteínas, que contribuem na invasão das defesas fagocíticas do hospedeiro, na aderência às células epiteliais, na colonização dos tecidos e persistência extracelular (DINGES et al., 2000). A maioria dos *Staphylococcus* spp. pode expressar uma camada de mucopolissacarídeo, “slime”, que atua na aderência e colonização do epitélio e matéria inerte (AGUILAR et al., 2001). Durante o processo de colonização, são liberadas enzimas e proteínas, tais como proteína A, coagulase, hemolisinas, que possibilitam a invasão, escape do sistema imunológico e auxílio na obtenção de nutrientes através da transformação de substâncias do tecido hospedeiro (DINGES et al., 2000). A expressão destas proteínas extracelulares está sujeita à regulação coordenada de vários loci gênicos. O mais estudado é o sistema *agr* que envolve cinco genes (*agrA*, *agrB*, *agrC* e *agrD*) que atua como regulador positivo de proteínas secretoras (α e β hemolisinas, proteases, DNases e estafiloquinases) e pode reprimir a transcrição dos genes que codificam a proteína A, coagulase e outras proteínas associadas à parede (NOVICK; JIANG, 2003).

O presente estudo realizou uma abordagem investigativa sobre a etiologia de diferentes processos infecciosos de animais de companhia, identificando as espécies bacterianas e avaliando seu perfil de suscetibilidade frente diferentes classes de

antibióticos aplicados na terapêutica veterinária. De modo específico, foi avaliado perfil de suscetibilidade à azitromicina, que tem sido prescrita de forma indiscriminada na terapêutica veterinária, como modelo para avaliação da resistência em isolados bacterianos de processos infecciosos de animais de companhia. Diferentes mecanismos de resistência à azitromicina foram avaliados, incluindo a possível resistência cruzada entre oxacilina e azitromicina em isolados de *Staphylococcus* spp. conforme apontado pela literatura. Os testes fenotípicos e genotípicos foram realizados para detecção dos marcadores de resistência à azitromicina e à oxacilina em *Staphylococcus* spp., e para avaliação dos principais fatores de virulência associados aos isolados de *Staphylococcus* spp. das infecções de animais de companhia como forma de ampliar o conhecimento a respeito do potencial patogênico dessas bactérias.

O objetivo desse estudo é fornecer dados que possam ser de valia tanto para área da clínica quanto para a microbiologia veterinária e contribuir para a construção do quadro real do desenvolvimento de resistência à azitromicina em nossa região, de forma que seu uso represente um ganho real como alternativa terapêutica em Medicina Veterinária.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Processos Infeciosos em Animais de Companhia

Os animais estão frequentemente expostos a uma gama de bactérias presentes no ambiente que podem colonizar locais específicos como a pele, trato digestório, respiratório e urogenital. Estes agentes infecciosos, em associação às condições imunológicas do hospedeiro e fatores extrínsecos, podem desenvolver doenças que apresentam resultados clínicos variáveis segundo a virulência e patogenicidade do agente.

A investigação laboratorial de doenças bacterianas é necessária para identificar o agente etiológico e determinar a suscetibilidade aos antimicrobianos a fim de selecionar o fármaco ideal. As dificuldades para o estabelecimento do diagnóstico correto de um processo infeccioso e a utilização inadequada de antibióticos contribuem para o surgimento de cepas resistentes.

Alternativas terapêuticas eficazes e que minimizem o impacto da resistência aos antimicrobianos estão relacionadas a compreensão dos agentes etiológicos prevalentes e dos processos infecciosos por eles desencadeados nos diferentes sítios em animais de companhia.

2.1.1. Otite externa

A otite externa é considerada a causa mais comum de doença do conduto auditivo de cães, representando de 8 a 15% dos casos atendidos na clínica veterinária no Brasil (LEITE, 2000) e 76,7% das otopatias correspondem à forma crônica da doença (FARIAS, 2002). As alterações patológicas são caracterizadas por inflamação aguda ou crônica do epitélio do meato auditivo externo, eritema, aumento das secreções e descamações do epitélio, associado a diferentes graus de dor e prurido.

A otite externa é multifatorial e fatores como ectoparasitoses, doenças alérgicas, problemas dermatológicos e desordens endócrinas são predisponentes ao estabelecimento do processo infeccioso. As infecções mistas ocorrem em aproximadamente 30% dos casos e os microrganismos mais frequentemente isolados são *Staphylococcus aureus*, *S. intermedius*, *Malassezia pachydermatis*, *Proteus* spp., *Klebsiella* spp. e *Pseudomonas* spp., entre outros (OLIVEIRA et al., 2006). Nas infecções crônicas, são relatados *Streptococcus* spp. β -hemolíticos, *Escherichia coli* e *Bacillus* spp. (SILVA, 2001).

A seleção de medicamentos otológicos específicos tem como base o agente etiológico, o estado do tímpano e a resposta orgânica ao processo nosológico. Os principais antimicrobianos recomendados para o tratamento dessa doença incluem aminoglicosídeos, fluoroquinolonas, β -lactâmicos, cloranfenicol, polimixina B e tetraciclina (OLIVEIRA et al., 2005).

2.1.2. Infecções de pele

Dentre as doenças que comumente acometem os pequenos animais as infecções de pele representam um percentual significativo do atendimento clínico veterinário e em muitos casos são causadas por microrganismos naturalmente presentes na pele. A microbiota normal da pele de animais é constituída por bactérias residentes, transitórias e fungos. Em cães, as bactérias residentes mais isoladas são: *Micrococcus* spp., *Staphylococcus intermedius*, *S. epidermidis*, *Streptococcus* α -hemolítico e *Propionibacterium acnes*. Os microrganismos transitórios do cão incluem *Corynebacterium* spp., *E. coli*, *Bacillus* spp., *Pseudomonas* spp. e *Proteus mirabilis*, enquanto que na espécie felina as espécies prevalentes são: *Streptococcus* β -hemolíticos,

E. coli, *P. mirabilis*, *Pseudomonas* spp., *Bacillus* spp., *Staphylococcus* spp. coagulase positivos e negativos (SCOTT et al., 2001).

A patogênese das infecções bacterianas da pele requer aderência e consequente colonização. O patógeno prevalente é o *S. intermedius*, que por ser da microbiota residente da pele, apresenta maior facilidade de multiplicação quando ocorre perda da continuidade dos tecidos ou desequilíbrio da microbiota normal provocado por outras bactérias ou fungos. Pellerin e colaboradores (1998) afirmaram que *S. intermedius* cria um microclima favorável à proliferação de agentes bacterianos secundários Gram-negativos, além de propiciar o crescimento de leveduras do gênero *Malassezia*.

A escolha do antibiótico é frequentemente empírica, sendo eleitos antibióticos de amplo espectro sem prévia identificação do agente envolvido. Às vezes, o profissional recorre à citologia como auxílio diagnóstico, e *S. intermedius* é implicado como agente quando ocorre a evidência de cocos Gram-positivos. Cultura e testes de sensibilidade devem sempre ser realizados para obtenção de um diagnóstico conclusivo e para detecção de casos de infecções mistas, evitando a ineficácia do tratamento e recidivas (SCOTT et al., 2001). Aspectos como segurança, via de administração, frequência da dose, habilidade de penetração nos tecidos, capacidade de atingir altas concentrações e efeitos colaterais, devem ser considerados devido à extensão do tratamento (SCOTT et al., 2001).

2.1.3. Infecções do trato urinário

Infecções do Trato Urinário (UTI) em cães são geralmente associadas à vesícula urinária, podendo em alguns casos, envolver os rins. Correspondem a uma estimativa de 10% dos pacientes caninos dos atendimentos clínicos veterinários e, alguns estudos concluíram que as fêmeas e idosos são potenciais grupos de risco para essa doença. O diagnóstico dessa enfermidade é baseado nos achados clínicos e urinálise, porém a cultura da urina é requerida para o diagnóstico definitivo da UTI (ÇETIN et al., 2003). Diversos microrganismos estão associados à etiologia dessa doença em cães e as principais bactérias envolvidas são: *E. coli*, *Proteus* spp., *Pseudomonas* spp., *Staphylococcus* spp. e *Streptococcus* spp.. Infecções causadas por uma única espécie bacteriana são mais prevalentes que infecções mistas (KOGIKA et al., 1995).

Em contraste do que ocorre em cães, os resultados de diferentes ensaios clínicos e laboratoriais indicam que os felinos são mais resistentes às infecções bacterianas das vias urinárias. A baixa frequência da infecção urinária bacteriana em gatos pode estar relacionada a mecanismos locais de defesa, como a capacidade dos felinos de produzir uma urina altamente concentrada e ao consumo de dietas ricas em proteínas, que proporciona a formação de urina naturalmente ácida e altamente concentrada em uréia. As bactérias mais comumente isoladas na urina de felinos com cistite são: *E. coli*, *Staphylococcus* spp., *Streptococcus* spp., *Proteus* spp., *Klebsiella* spp. e *Pseudomonas* spp. (RECHER JUNIOR, 2005).

Os principais antibióticos utilizados no tratamento dessa infecção são: amoxicilina associada a ácido clavulânico, ampicilina associada à sulbactam, gentamicina, enrofloxacin, orbifloxacin, nitrofurantoína, oxitetraciclina, cefalotina, danofloxacin e sulfametoxazol-trimetoprim (ÇETIN et al., 2003, RECHER JUNIOR, 2005).

2.1.4. Infecções uterinas

Em cadelas, a piometra resulta da infecção do endométrio que sofreu hiperplasia cística causada por uma prolongada estimulação progesterônica. Esse processo patológico também denominado de Complexo Hiperplasia-Cística-Endometrial apresenta alta incidência em cadelas e é reconhecida como uma das causas mais comuns de

enfermidade e morte desta espécie animal. Pode ser complicada por infecções bacterianas, devido à capacidade da microbiota vaginal de ascender até o útero durante o estro e causar infecções oportunistas. As infecções bacterianas não são a causa desencadeante da piometra canina, mas são responsáveis pela maioria dos casos de morbidade e mortalidade associados a essa doença (FRANSSON; RAGLE, 2003; OLIVEIRA et al., 2008).

Dentre as espécies bacterianas, *Escherichia coli* é o agente etiológico frequentemente relatado devido sua habilidade de aderência a sítios antigênicos específicos no endométrio e miométrio quando estimulados por progesterona (COGGAN et al., 2004; SIQUEIRA et al., 2008). *Streptococcus* spp. hemolíticos, *Staphylococcus* spp. coagulase negativos e positivos, *Klebsiella* spp., *Pasteurella* spp., *Pseudomonas* spp., *Proteus* spp., *Moraxella* spp. fazem parte da microbiota uterina de animais saudáveis, mas também apresentam potencial patogênico reconhecido, podendo estar presentes em infecções mono ou polimicrobianas (JOHNSTON, et al., 2001; FRANSSON; RAGLE, 2003).

Em muitos casos o tratamento é baseado na intervenção cirúrgica (panhisterectomia) como forma de prevenção da doença recidivante. Porém alternativas como a prescrição de hormônios, principalmente prostaglandina e antimicrobianos de amplo-espectro por tempo prolongado também são recomendados (FRANSSON; RAGLE, 2003).

2.1.5. Infecções bacterianas do trato respiratório inferior

A pneumonia bacteriana é resultado de uma combinação de diversos fatores como alterações e falhas nos mecanismos de defesa do trato respiratório inferior tais como, broncoconstricção, movimentos ciliares, produção de muco, fagocitose por macrófagos e doenças imunossupressoras que podem predispor às injúrias causadas pela exposição natural a bactérias potencialmente patogênicas.

As infecções do trato respiratório inferior são comumente causadas pela aspiração de bactérias oportunistas provenientes da orofaringe ou pela invasão de bactérias presentes no ambiente. Espécies de *Streptococcus*, *Staphylococcus*, *Pasteurella*, *Klebsiella* e *E. coli* são as mais encontradas, sendo a *Bordetella bronchiseptica* o patógeno primário seguidos dos gêneros *Mycoplasma*, *Chlamydia* e alguns fungos (HIRSH; ZEE, 2003).

As principais alternativas de tratamento para infecções do trato respiratório de cães e gatos são: amoxicilina mais ácido clavulânico, cefotaxima, cefalexina sulfonamidas mais trimetopim, cloranfenicol, fluoroquinolonas, tetraciclina, macrolídeos e lincosamidas (GUARDABASSI et al., 2004).

2.1.6. Infecções da cavidade oral

A doença periodontal é uma das causas mais comuns de doença da cavidade oral de cães e pode afetar tanto a saúde quanto à qualidade de vida do animal. As lesões periodontais são caracterizadas por uma condição inflamatória progressiva que acomete o tecido de suporte do dente, tecido gengival, cemento, ligamento periodontal e o osso alveolar (GIOSO, 1993; HARVEY; EMILY, 1993). A doença periodontal tem como principais causas a presença da placa bacteriana na região do sulco gengival onde os microrganismos presentes podem liberar substâncias que lesam a sua integridade, constituindo um fator extrínseco relacionado às etiologias da inflamação gengival e doença periodontal (GIOSO, 1993).

Inicialmente bactérias Gram-positivas aeróbicas, tais como, *Actinomyces* e *Streptococcus* spp. liberam substâncias aderentes que formam a placa. Em poucos dias, o acúmulo de restos alimentares e de mais bactérias, reduz a concentração de oxigênio,

favorecendo a proliferação de anaeróbios na região subgengival. As endotoxinas liberadas por estes causam destruição do tecido e perdas ósseas. As principais bactérias anaeróbicas envolvidas na periodontite de cães são bactérias produtoras de pigmento negro (DOMINGUES et al., 1999).

O tratamento dessa doença é realizado através de retirada cirúrgica do cálculo dentário e antibioticoterapia no pré e pós-cirúrgico com penicilina G, amoxicilina, amoxicilina associada ao ácido clavulânico, espiramicina, clindamicina ou metronidazol (WATSON; ROSIN, 2000).

2.1.7. Infecções da conjuntiva ocular

A conjuntiva é a membrana mais exposta do organismo e mantém relação direta com o meio externo (SLATER, 1990). A microbiota normal da superfície ocular interfere na invasão de microrganismos através da competição por nutrientes, além de secretar substâncias com propriedades antimicrobianas (ANDRADE et al., 2002). A destruição desta microbiota por uso prolongado de antimicrobianos tópicos pode resultar em crescimento excessivo de bactérias, leveduras ou fungos que podem tornar-se patogênicos. Andrade e colaboradores (2002) investigaram a microbiota conjuntival de gatos saudáveis e as bactérias de maior ocorrência foram *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus* β -hemolíticos e o fungo *Penicillium* sp..

Os cães são, por natureza, mais vulneráveis a injúrias externas da estrutura ocular que pode favorecer a aderência e colonização de bactérias ou fungos (MOORE, et al., 1988). Segundo Slater (1990) a conjuntivite bacteriana primária em cães está comumente associada à *Moraxella* spp. e a outros microrganismos frequentemente isolados a partir de cães com mucosa normal, tais como, *S. aureus*, *S. epidermidis*, *Streptococcus* spp.. A conduta terapêutica inclui corticoterapia local e sistêmica, uso local de sulfato de atropina, anti-inflamatórios e antibioticoterapia. Os principais antimicrobianos prescritos para o tratamento de infecções causadas por cocos Gram-positivos são neomicina, bacitracina, penicilina, eritromicina, gentamicina, enrofloxacin e cefalosporinas. No caso de infecções causadas por bastonetes Gram-negativos são utilizados a polimixina B, gentamicina, tobramicina, cloranfenicol, tetraciclina e cefalosporinas (SLATER, 1990).

2.2. *Staphylococcus* spp. e processos infecciosos de animais de companhia

É possível observar que o gênero *Staphylococcus* ocupa um papel destacado na etiologia dos processos infecciosos abordados anteriormente. Estas bactérias são cocos Gram-positivos da família *Micrococaceae*, e fazem parte da microbiota saprófita da pele, da mucosa oral e nasal de humanos e animais, além de estarem amplamente distribuídas no ambiente. Além de seu reconhecido potencial de patogenicidade que favorece sua atuação como agente etiológico das infecções humanas e animais, os estafilococos também apresentam notória habilidade em disseminar informações genéticas de resistência antimicrobiana entre bactérias de mesma espécie ou espécies diferentes. Ito e colaboradores (2001) relataram que a transferência horizontal do gene *mecA* resultou na disseminação mundial de clones de *Staphylococcus* spp oxacilina e multidroga-resistentes. Este fato é explicado pela inserção deste gene em um elemento genético móvel, denominado cassete estafilocócico cromossômico *mec* (SCC*mec*-“staphylococcal cassette chromosome”), que carrega outros elementos genéticos codificadores da resistência às outras classes de antimicrobianos. A hipótese de que a presença do gene *mecA* contribua para a expressão de resistência a outras classes de antimicrobianos, como por exemplo, os macrolídeos, é corroborada com estudos que apontam para o desenvolvimento de resistência à azitromicina na maioria das cepas de

Staphylococcus spp. oxacilina-resistentes provenientes de infecções humanas (TRAMPER-STRANDERS et al., 2007). A azitromicina é reconhecida por apresentar vantagens microbiológicas e bioquímicas que estimulam os médicos veterinários a prescrever este fármaco como alternativa eletiva ao tratamento de diferentes processos infecciosos na clínica de pequenos animais. Embora as vantagens em sua administração e eficácia terapêutica sejam reconhecidas, sua utilização indiscriminada, sem um monitoramento microbiológico, pode acarretar aumento da pressão seletiva na população bacteriana, e induzir a expressão dos mecanismos de resistência.

2.3. Resistência antimicrobiana x Conduas terapêuticas em Medicina Veterinária

O diagnóstico terapêutico é uma conduta amplamente exercida na clínica veterinária. Essa prática está associada à prescrição de antimicrobianos de amplo espectro como primeira alternativa de tratamento em detrimento de fármacos de primeira linha, como penicilinas e sulfonamidas. As companhias farmacêuticas podem ter certa participação nesse quadro devido a pressão do mercado para a prescrição de novos antimicrobianos para o tratamento de casos onde fármacos antigos são ainda efetivos. Entretanto, possíveis falhas no tratamento dos antimicrobianos de primeira linha desencorajam os proprietários de animais de companhia a pagar por consultas veterinárias e antibióticos adicionais (PRESCOTT et al., 2002). O uso indiscriminado de antibióticos na clínica veterinária, sem realização de testes de sensibilidade que possibilitem a utilização do fármaco ideal, entre outros fatores, contribui para o aumento do espectro de microrganismos resistentes a agentes antimicrobianos, bem como para as falhas terapêuticas.

As classes de antimicrobianos mais utilizadas são penicilinas, cefalosporinas, macrolídeos, lincosamidas, tetraciclina, cloranfenicol, sulfonamidas, aminoglicosídeos e fluoroquinolonas, geralmente indicados por terapia contínua por longos períodos. Uma vez que estes antimicrobianos são também alternativas terapêuticas para infecções humanas, estudos indicam a possível associação entre o uso indiscriminado de antimicrobiano, a emergência da resistência em animais e a possível transferência de microrganismos resistentes para humanos. O Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI, 2005) tem orientado pesquisadores na padronização da avaliação do perfil de resistência a antimicrobianos assim como na avaliação de possíveis mecanismos de resistência cruzada. Além disso, diversos programas de vigilância têm sido desenvolvidos mundialmente para promover o controle da resistência antimicrobiana e detectar a emergência de novos mecanismos de resistência (KARLOWSKY; SAHM, 2002).

2.3.1. Animais de Companhia x Disseminação da Resistência Antimicrobiana

A domesticação dos primeiros cães e gatos apresenta relatos pré-históricos (SERPELL, 1995; HOFFMAN, 1997), desde então, esses animais distribuíram-se em todos os continentes (WANDELLER et al., 1993). O convívio com animais de companhia, como cães e gatos, tem sido associado a benefícios físicos e emocionais, especialmente para crianças, idosos, indivíduos socialmente isolados e deficientes físicos e mentais. Entretanto, a relação entre homem e animais de companhia, que dividem o mesmo nicho, tem motivado diversos pesquisadores a investigarem a extensão dessa associação e determinar a importância dos animais de companhia na transmissão de doenças zoonóticas e como reservatórios potenciais de bactérias resistentes a diversos antimicrobianos (SNARY et al., 2004).

Bactérias resistentes podem ser adquiridas por humanos pela transferência pessoa-pessoa, exposição ao meio ambiente, exposição direta aos animais e via alimentos. Animais domésticos podem atuar como reservatórios de espécies bacterianas e/ou genes de resistência, tais como, *Staphylococcus aureus* meticilina-resistente (MRSA), *Enterococcus* spp. vancomicina-resistentes (VRE) e *Salmonella Typhimurium* DT104 (GUARDABASSI et al., 2004). Uma pequena quantidade de células bacterianas é suficiente para que a resistência antimicrobiana seja transferida de um hospedeiro para outro. Teoricamente, uma única célula bacteriana pode transmitir genes de resistência para a microbiota do hospedeiro. Teoricamente, uma única célula bacteriana pode transmitir genes de resistência para a microbiota do hospedeiro. Além disso, a facilidade das células bacterianas em disseminar informações genéticas, permite intercâmbio das bactérias da mesma espécie ou espécies diferentes, bem como de hospedeiros diversos (AARESTRUP, 2001).

2.4. Azitromicina

Pesquisas farmacológicas têm sido desenvolvidas no sentido da descoberta de novas moléculas antibióticas capazes de enfrentar eficazmente os múltiplos e complexos problemas ligados à antibioticoterapia. Um antibiótico que se destina à extensa utilização clínica deve ter um amplo espectro de ação e capacidade de transpor os mecanismos de resistência bacteriana.

A azitromicina, um antibiótico da classe dos macrolídeos, representa o que mais se aproxima das exigências da antibioticoterapia moderna, porque pode ser administrada pela via oral e parenteral, não desencadeando fenômenos alérgicos. Os macrolídeos possuem mecanismo de ação bacteriostático que consiste na inibição da síntese protéica bacteriana através da sua ligação à subunidade ribossômica 23S (NEU et al., 1991).

Após sua ampla utilização na medicina humana, a azitromicina está disponível atualmente para a clínica veterinária como alternativa de tratamento em processos infecciosos que acometem diferentes sítios orgânicos de cães e gatos. Sua atividade antimicrobiana é similar a eritromicina, porém com reduzido efeito colateral em nível gastrintestinal e maior resistência à hidrólise ácida gástrica (GIRARD et al., 1990). Pode ser administrada em esquema de dose única diária e ciclos curtos, favorecendo a terapêutica veterinária. Esse fármaco é prescrito para o tratamento de infecções respiratórias, otorrinolaringológicas, dermatológicas, urogenitais, digestivas e osteoarticulares que acometem cães e gatos. A dose recomendada é de 10 a 30 mg/Kg/PV/dia de 3 a 5 dias dependendo do quadro clínico do animal, podendo também ser prescrita para o tratamento da toxoplasmose e erlichiose durante 7 dias consecutivos de administração (VIANA, 2003).

Desde seu lançamento no mercado farmacológico “pet” do Brasil, a azitromicina tem sido utilizada em larga escala na clínica veterinária de pequenos animais. No entanto, não existem relatos a respeito do perfil de suscetibilidade dos isolados bacterianos de origem animal. A literatura aponta que o aumento da pressão seletiva na população bacteriana, estabelecido pelo uso indiscriminado de antibióticos pode induzir alguns mecanismos de resistência (PRESCOTT et al., 2002). Portanto, é possível que a crescente utilização da azitromicina, que apresenta a vantagem de ser prescrita em esquema de dose diária única, favoreça casos de resistência em bactérias associadas à infecções em animais de companhia.

2.4.1 Aspectos farmacológicos e microbiológicos

Dentre os macrolídeos, a azitromicina ($C_{38}H_{72}N_2O_{12}$) é quimicamente classificada como azalídeo, devido à inserção de um átomo de nitrogênio no anel lactônico de sua molécula (Figura 1). Esta reorganização estrutural confere características farmacocinéticas e microbiológicas inovadoras, permitindo sua penetração através da parede das bactérias Gram-negativas ampliando seu espectro de ação. A molécula de azitromicina apresenta rápida e elevada difusão tissular e meia-vida biológica prolongada nos tecidos. Dessa forma, pode concentrar-se no interior de fagócitos, que a transportam diretamente para o local da infecção e a liberam em contato direto com o agente patogênico responsável pelo processo infeccioso. A capacidade de difusão tissular justifica a prescrição desse antimicrobiano segundo um esquema de dosagem baseado na administração de dose diária única durante três dias consecutivos (GIRARD et al., 1990).

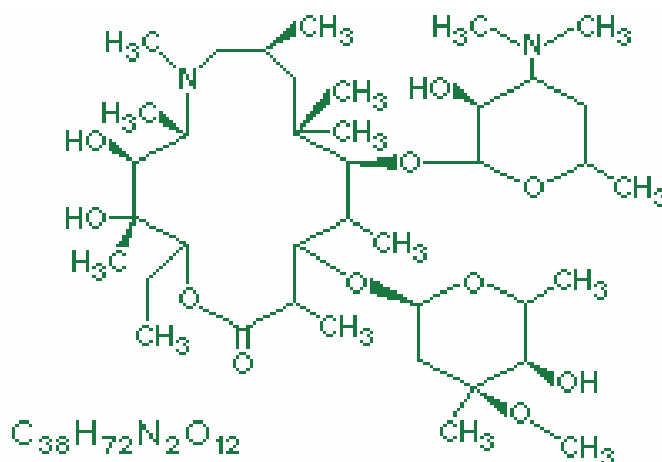


Figura 1. Estrutura molecular da azitromicina.

Os fatores que determinam o tropismo e a persistência da azitromicina nos tecidos são: fraca ligação protéica; estrutura química dibásica e interação sinérgica com fagócitos (GIRARD et al., 1990). O baixo valor de ligação com proteínas plasmáticas, que geralmente não ultrapassa 50%, proporciona uma maior fração livre do fármaco para interação com fagócitos. Além disso, possui dois grupos terciários amínicos básicos, que conferem a sua molécula uma característica anfipática, facilitando sua passagem através das membranas celulares (GIRARD et al., 1990).

A azitromicina concentra-se seletivamente nos macrófagos, fibroblastos e nos polimorfonucleares (PMN) atingindo concentrações intracelulares até cem vezes superiores às encontradas no nível extracelular, utilizando esses efetores imunológicos como vetores no processo de difusão para os locais intersticiais (SCHENTAG; BALOW, 1991). Essa característica farmacocinética explica o seu perfil de atividade contra microrganismos patogênicos intracelulares, podendo permanecer ativa dentro dos fagócitos e, além disso, constituir uma importante reserva de antibiótico diretamente disponível no local da infecção, distribuindo-se prontamente em diversos sítios orgânicos, como trato respiratório, urogenital, oral e pele. A liberação da azitromicina pelos fagócitos pode ser aumentada pela presença eventual de bactérias ou de componentes da parede celular bacteriana (RETSEMA et al., 1991).

A azitromicina possui um amplo espectro de ação apresentando atividade contra bactérias Gram-positivas e uma vasta gama de bactérias Gram-negativas. Dentre as bactérias Gram-positivas pode-se destacar sua ação contra *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pyogenes* (estreptococos β -hemolíticos do grupo A), *Streptococcus*

pneumoniae, estreptococos α -hemolíticos (grupo viridans), outros estreptococos e *Corynebacterium* spp. (MASKELL et al., 1990). Demonstra resistência cruzada contra cepas Gram-positivas resistentes à eritromicina, incluindo *Enterococcus faecalis* e à maioria das cepas de estafilococos oxacilina-resistentes (RETSEMA, 1999). Entre as bactérias Gram-negativas pertencentes à família Enterobacteriaceae, *Escherichia coli*, *Salmonella Enteritidis*, *Salmonella typhi*, *Enterobacter* spp. apresentam perfil de suscetibilidade variável à azitromicina, já para *Klebsiella* spp., espécies de *Proteus*, *Serratia*, *Morganella* e a *Pseudomonas aeruginosa* são frequentemente resistentes (RETSEMA et al., 1987). A azitromicina apresenta notável atividade *in vitro* em relação a microrganismos intracelulares, como *Chlamydia trachomatis*, *Mycoplasma* spp. e bactérias anaeróbias, como *Bacteroides fragilis* e *Bacteroides* spp., *Clostridium perfringens* e *Fusobacterium necrophorum*.

2.4.2. Mecanismos de resistência à azitromicina

Os antibióticos macrolídeos foram lançados há mais de cinco décadas e desde a introdução da eritromicina na terapia humana, um grande número de moléculas tem sido desenvolvido para o uso clínico. Durante anos estes antibióticos representaram a melhor alternativa em substituição ao uso das penicilinas e cefalosporinas para o tratamento das infecções relacionadas a bactérias Gram-positivas, principalmente, Pneumococos e Estreptococos β -hemolíticos. Os antimicrobianos da classe dos macrolídeos são assim classificados pelo seu mecanismo de inibição da síntese protéica bacteriana tendo ação sobre a subunidade ribossômica 23S. Outras classes de antimicrobianos, quimicamente distintos, possuem o mesmo mecanismo de ação e por isso são incluídos no grupo denominado MLS_B, representado pelos macrolídeos, lincosamidas e streptogramina B (LECLERCQ, 2002).

O aumento da resistência aos MLS_B tem sido reportado mundialmente em isolados bacterianos Gram-positivos provenientes de infecções humanas. Na década de 90 houve a evolução da classe dos macrolídeos marcada pelo desenvolvimento dos macrolídeos semi-sintéticos com melhor atividade farmacocinética e tolerância.

Estudos relataram que o desenvolvimento mundial da resistência a macrolídeos pode ser reduzida a partir da limitação do uso destes antibióticos, de acordo com variações para cada país e espécie bacteriana (SEPPÄLA et al., 1997; DAGAN et al., 2001). Entretanto, a crescente utilização de novos macrolídeos, como a azitromicina utilizada em dose diária única, dificulta a adoção desta medida em medicina veterinária. Outro importante aspecto é a multiplicidade de mecanismos de resistência que inclui modificação do sítio ativo ribossomal, bombas de efluxo e inativação antimicrobiana, que resultam em uma variedade de fenótipos de resistência (LECLERCQ, 2002).

Dentre os mecanismos de resistência aos antibióticos macrolídeos, a produção de enzimas metiltransferases (ERM) parece ser o mecanismo predominante. Em 1956 logo após a introdução da eritromicina na terapia antimicrobiana, foi detectada a emergência de resistência em bactérias do gênero *Staphylococcus* spp. (WEISBLUM, 1995). Este fato tem sido observado desde 1991, quando Neu e colaboradores relataram a ocorrência de resistência cruzada à azitromicina, em *S. aureus* e SCN eritromicina e oxacilina-resistentes.

Estudos bioquímicos indicaram que a resistência era causada pela metilação do alvo ribossomal dos antibióticos, o qual determina a resistência cruzada aos MLS_B. Estas enzimas são codificadas pelos genes *erm* ("erythromycin ribosome methylase") induzidos na presença de eritromicina. As proteínas ERM dimetilase possuem um domínio único, chamado de A2058, que está localizado na região conservada do domínio V do ribossoma 23S que atua como sítio de ligação dos antibióticos MLS_B. A adição de dois radicais metil a um sítio no rRNA 23S próximo a região ligante ao

antibiótico macrolídeo, altera a sua conformação e reduz a afinidade aos MLS_B (LECLERCQ, 2002).

A expressão da resistência MLS_B pode ser constitutiva (fenótipo cMLS_B), quando a metiltransferase é produzida continuamente, levando a resistência a níveis elevados, ou de maneira induzida (iMLS_B), na qual a expressão de resistência à MLS_B só ocorre na presença de eritromicina (LIM et al., 2002; D'OLIVEIRA et al., 2003). Diversos autores têm utilizado a técnica de antibiograma baseada no teste de disco aproximação que avalia o fenótipo de resistência pela proximidade de aplicação dos discos de eritromicina e clindamicina. Neste caso, O fenótipo MLS_B é caracterizado como constitutivo (cMLS_B) quando isolados resistentes apresentam halos de inibição reduzidos ao redor dos discos ou indutivo (iMLS_B) quando halo de inibição ao redor do disco de clindamicina sofre uma constricção de diâmetro próximo ao disco de eritromicina ou azitromicina. Já no fenótipo M ocorre resistência apenas ao macrolídeo, eritromicina ou azitromicina. (HAMILTON-MILLER; SARAH, 2000, DUARTE et al., 2004).

O genótipo de resistência à macrolídeos é investigado pela técnica de PCR que detecta a presença de genes do complexo *erm*, formado por mais de 40 genes (LIM et al., 2002). Quatro classes de genes *erm* são detectadas em bactérias patogênicas: *erm*(A), *erm*(B), *erm*(C), e *erm*(F) (ROBERTS et al., 1999). Os genes *erm*(A) e *erm*(C) são tipicamente detectados em diferentes espécies de *Staphylococcus*, enquanto *erm*(B) é disseminado em *Streptococcus* spp. e *erm*(F) em *Bacteroides* spp. e outras bactérias anaeróbias (LIM et al., 2002). No caso da resistência induzida, a bactéria produz um mRNA inativo incapaz de codificar a ERM metiltransferase, que na presença do indutor macrolídeo se torna ativo. O contrário ocorre na resistência constitutiva, na qual a ERM metiltransferase ativa é produzida na ausência do indutor. A indução ocorre após a transcrição dos genes *erm*(A) e *erm*(C) em *Staphylococcus* spp. e provavelmente no determinante *erm*(B) de outras espécies. A presença do indutor leva a rearranjos estruturais no mRNA que permite a tradução das sequências das enzimas de metilação (WEISBLUM, 1995).

Os genes *erm*(A) são amplamente disseminados em cepas MRSA adquiridas pela incorporação do transposon Tn554, enquanto *erm*(C) incriminado na resistência a eritromicina é adquirido via plasmídeos (LIM et al., 2002). O'Brien e colaboradores (2005) reportaram o sequenciamento completo do plasmídeo pWBG738 codificado pelo gene *erm*(C), a partir de um paciente australiano infectado por MRSA. Este plasmídeo apresentou 99% de homologia com o plasmídeo pT48 detectado em um paciente da Flórida-USA infectado por *Staphylococcus aureus*. Deleções em regiões específicas no gene *erm*(C) que controlam o pWBG738 foram incriminadas na ocorrência do fenótipo constitutivo de resistência aos MLS_B (O'BRIEN et al., 2005).

Outro mecanismo de resistência à macrolídeos está representado pelas bombas de efluxo codificadas pelos genes *mef*. Os genes da classe *mef* estão presentes em diversas espécies de bactérias gram-positivas, como *Streptococcus pyogenes*, *S. pneumoniae*, *Enterococcus* spp., *Corynebacterium* spp., *Micrococcus* spp. e *Staphylococcus* spp.. Nestas bactérias a aquisição da resistência à macrolídeos por bomba de efluxo é causada por duas classes de bombas transportadoras, sistema ABC ("ATP-binding-cassette") e transportadores MFS ("Major Facilitator Superfamily"). O sistema de transporte ABC parece ser o único sistema de bomba de efluxo que confere resistência à macrolídeos em espécies de *Staphylococcus*. Este gene foi adquirido a partir do plasmídeo que contém genes *msr*(A) que codifica o desenvolvimento de componentes transmembrana com atividade transportadora reduzida especificamente relacionada aos antibióticos macrolídeos e estreptograminas B (LECLERCQ, 2002; LIM et al., 2002).

Estudos relatam a possibilidade de resistência cruzada entre oxacilina e azitromicina em isolados de *Staphylococcus* spp., como sendo outro importante mecanismo de resistência à macrolídeos (MASKEL et al., 1990; NEU, 1991; PETERS et al., 1992). Neu (1991) observou que a CIM_{50/90} calculada de azitromicina para isolados de *S. aureus* suscetíveis à oxacilina foi de 0,5 e 1,0 µg/mL, porém os valores aumentaram consideravelmente em relação aos isolados de *S. aureus* resistentes (CIM_{50/90} >128 µg/mL).

O perfil de atividade da azitromicina tem sido avaliado desde o seu lançamento no mercado farmacêutico por diversos estudos que já apontaram para a emergência de resistência, frequentemente associada com alterações no padrão de produção de β-lactamase e com a presença de genes que codificam proteínas alteradas (PETERS et al., 1992; BINGEN et al., 2002; HANSEN et al., 2002; LOW, et al., 2002). De modo similar, a resistência à oxacilina em isolados de *Staphylococcus* spp. pode estar associada tanto a hiperprodução de β-lactamase, quanto por um mecanismo diretamente relacionado a alterações da PBP2a, em isolados que possuem o gene *mecA* expresso. A transferência horizontal do gene *mecA* em *Staphylococcus* spp. resultou na disseminação mundial de clones oxacilina e multidroga-resistentes. Desse modo há interesse em detectar a presença deste gene como um possível mecanismo comum de resistência para estes fármacos.

O aumento da pressão seletiva na população bacteriana pode induzir alguns mecanismos de resistência à macrolídeos em animais de companhia que podem atuar como reservatórios de bactérias resistentes e respectivos genes, e assim contribuir com disseminação da resistência antimicrobiana a humanos contactantes. Alguns estudos em populações humanas relataram que mecanismos de transferência da resistência bacteriana podem ocorrer. Tramper-Stranders e colaboradores (2007) investigaram isolados de *Staphylococcus aureus* provenientes de 65 pacientes com fibrose cística (FC) mantidos sob terapia antimicrobiana a base de macrolídeos e seus respectivos contactantes domésticos (n= 194 indivíduos). Os autores reportaram que do total de isolados investigados, 69,6% dos *S. aureus* que colonizavam pacientes com FC eram resistentes a macrolídeos e que 9,6% dos isolados resistentes a macrolídeos colonizavam os contactantes domésticos.

Estes relatos apontam para importância da realização de estudos que monitorem o perfil de suscetibilidade antimicrobiana em isolados bacterianos de origem animal quando novas classes de antibióticos são introduzidas como princípios ativos na prática clínica veterinária e representam alternativas comuns ao tratamento de infecções humanas.

2.5. Resistência cruzada entre antibióticos macrolídeos e β-lactâmicos em *Staphylococcus* spp.

A literatura atual relata o desenvolvimento de resistência à azitromicina em cepas de *Staphylococcus* spp. oxacilina-resistentes (NEU et al., 1991; SCHMITZ et al., 2000). Nas décadas mais recentes, a prevalência aumentada de *Staphylococcus* spp. resistentes à oxacilina tem se tornado uma dificuldade adicional para o controle de infecções causadas por este agente. Os membros pertencentes ao gênero *Staphylococcus* spp. frequentemente estão associados às infecções que acometem tanto humanos quanto animais. As cepas estafilocócicas variam muito no seu potencial de virulência e no aspecto epidemiológico, contribuindo para a rápida disseminação de agentes multidrogas resistentes, o que levanta questões sobre o futuro da terapia antimicrobiana,

tornando necessária a investigação desse possível mecanismo de resistência em *Staphylococcus* spp. provenientes de espécimes animais.

2.5.1. *Staphylococcus* spp. resistentes à múltiplos antimicrobianos

Durante as últimas décadas, houve uma grande preocupação com o aparecimento de cepas de *Staphylococcus* resistentes a múltiplos antimicrobianos e sua associação a surtos. Quadros infecciosos provocados por *Staphylococcus aureus* multirresistentes (MARSA) são comuns nos grandes hospitais de todo o mundo, limitando as opções terapêuticas (LEVY, 1997). Tais estirpes estão envolvidas na resistência aos antimicrobianos, como tetraciclina, ácido fusídico, macrolídeos, sulfonamidas e lincomicinas. Estudos conduzidos em hospitais veterinários vêm indicando que a resistência a esses agentes antimicrobianos emergiu entre espécies animais e que estes poderiam apresentar potencial para a transmissão zoonótica de cepas MARSA. Strommenger e colaboradores (2005) realizaram uma investigação epidemiológica a partir da comparação do perfil genético de cepas de *Staphylococcus aureus* isolados de infecções de animais de companhia, com MARSA obtidas de complexos clonais prevalentes em infecções humanas hospitalares na Europa Central. Os isolados de *S. aureus* de animais apresentaram fenótipo de multiresistência e genótipo de resistência aos antibióticos β -lactâmicos (gene *mecA*) e MLS_B (gene *ermC*). Os autores relataram que houve homologia genética entre os isolados de MARSA de origem animal e humana, sugerindo que a transmissão cruzada pode ocorrer.

Entretanto, é necessário ressaltar que animais de companhia são considerados fontes de infecção de MARSA após sua exposição a humanos infectados (GUARDABASSI et al., 2004). Cepas de MARSA podem ser carregadas dos animais para os seus proprietários, médicos veterinários ou outros manipuladores ou contactantes, principalmente se houver um aumento da suscetibilidade desses hospedeiros humanos à infecção. Moodley e colaboradores (2006) investigaram geneticamente isolados de MARSA provenientes de 27 cães, nove equinos, seis felinos, 22 médicos veterinários e de três superfícies ambientais de hospitais veterinários do Reino Unido. Os autores relataram que todos os isolados de felinos, 96% dos caninos e 82% dos humanos apresentaram homologia genética e foram proximamente relatados a clones epidêmicos (EMRSA).

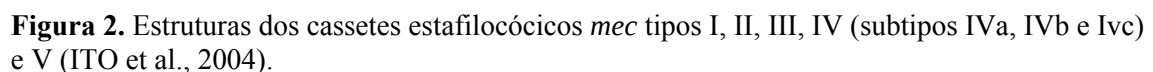
Frente a esses dados, pode-se constatar que as infecções em animais ou a transmissão de tais microrganismos representam um perigo potencial para a população que desenvolve um maior contato com esses animais.

2.5.2. Marcadores genéticos da resistência aos antibióticos β -lactâmicos

Os antimicrobianos β -lactâmicos são amplamente utilizados no tratamento das infecções estafilocócicas em animais de companhia. O sítio de atuação desses antimicrobianos são enzimas com função de transpeptidases que atuam nas etapas finais da formação da parede celular das bactérias. Estas proteínas, denominadas proteínas ligantes a penicilina (PBPs) realizam ligações cruzadas entre as cadeias de peptidoglicano pré-formadas garantindo a integridade da parede celular dos *Staphylococcus* spp. (MALLORQUÍ-FERNÁNDEZ et al., 2004). Os antimicrobianos β -lactâmicos ao inibirem estas PBPs, impedem a formação da camada de peptidoglicano da parede celular, o que parece desencadear a morte bacteriana (WEESE et al., 2005).

Diversos mecanismos de resistência bacteriana estão associados à classe de antimicrobianos β -lactâmicos. Dentre estes, a produção ou presença de uma proteína alvo modificada de baixa afinidade pelos β -lactâmicos, denominada de PBP2a ou PBP2' que é mediada pela presença do gene *mecA* (MOON et al., 2007). Este gene está localizado em um elemento genético móvel, denominado "cassete cromossômico de

O SCCmec é composto por diversos elementos genéticos essenciais: o complexo *mec*, composto pela ilha de patogenicidade *IS431*, os genes *mecA* e seus reguladores *mecI* e *mecR1*, e o complexo *ccr* (*Cassete Chromossome Recombinases*), caracterizado pela presença de genes que codificam recombinases. Esses complexos genéticos possuem terminais invertidos que podem ser reconhecidos pelas recombinases tanto do complexo *ccr* quanto pelo gene *mec*. Com base na classe do complexo dos genes *mec* e *ccr* presentes e em suas combinações, os cassetes SCCmec são classificados em seis tipos, I, II, III, IV, V e VI (ITO et al., 2004; OLIVEIRA et al., 2006) (Figura 2).



A expressão do gene *mecA* e consequentemente a produção de PBP2a, é regulada por proteínas chamadas Mec, e seu sistema genômico regulatório *mecR1-mecI* (PETINAKI et al., 2001). Hiramatsu e colaboradores (2001) identificaram o elemento regulador *mecR1-mecI*, o qual é um divergon do gene *mecA* e está localizado na porção “upstream” deste gene. O gene *mecI* codifica para uma proteína repressora e o gene *mecR1* para uma proteína transmembrana sinalizadora induzida por antibióticos β -lactâmicos. A meticilina e a oxacilina, no entanto não são bons indutores desse sistema proteico regulatório, o que desencadeia uma indução baixa da resistência à meticilina ou oxacilina (PETINAKI et al., 2001). Por isso, cepas de *Staphylococcus* coagulase-positivos e coagulase-negativos *mecA*-positivas, não expressam resistência à oxacilina, uma vez que a expressão do gene *mecA* é inibida pelo gene *mecI*.

As cepas de MRSA são resistentes a todos os agentes β -lactâmicos, incluindo o antimicrobianos de diferentes classes utilizados em ampla escala nos hospitais. Esta resistência se deve ao fato de que o cassete *mec* porta outros elementos genéticos como *Tn554*, *pUB110* e *pT181*, que codificam a resistência às outras classes de antimicrobianos causando a multirresistência (ITO et al., 2001).

A resistência aos antibióticos β -lactâmicos pode também estar relacionada a produção de enzimas β -lactamases que inativam os antibióticos. A produção de β -lactamases em *Staphylococcus* spp. é mediada pelo complexo genético *blaZ*, que inclui um sistema de regulação composto pelos genes *blaZ*, *blaR1* e *blaI* (LEWIS; DIKE., 2005). Estes genes estão localizados num mesmo transposon, *Tn552*, que foi completamente sequenciado e que pode se encontrar inserido no cassete *SCCmec* (ROWLAND; DIKE, 1990). O componente repressor da síntese da proteína, *blaI*, está localizado em uma região entre os genes reguladores *blaR1* e *blaZ*. A ligação do antibiótico β -lactâmico ao componente de membrana *BlaR1* promove um sinal que é transmitido através da membrana para o citoplasma da célula. Este sinal é responsável pela remoção do componente repressor localizado na região entre os genes *blaR1* e *blaZ*, permitindo assim a transcrição do gene *blaZ* e consequentemente da enzima β -lactamase (LEWIS; DIKE, 2005).

Os antibióticos β -lactâmicos são amplamente utilizados na clínica médica humana e veterinária. A resistência aos antibióticos β -lactâmicos tem sido relatada em bactérias de origem animal, incluindo as espécies *Escherichia coli*, *Salmonella* spp., *Campylobacter* spp., *Enterococcus* spp. e *Staphylococcus* spp. provenientes de animais de produção e animais de companhia, que podem atuar como reservatórios dessa resistência para humanos. Os mecanismos de resistência aos β -lactâmicos incluem: redução do transporte até alvo celular (PBPs alteradas, tais como, PBP2a, PBP3 e PBP4), alteração do sítio ativo, bombas de efluxo e inativação por β -lactamases (LI; NIKAIDO, 2004). Diversos tipos de enzimas β -lactamases tem sido identificadas em diferentes espécies bacterianas, dentre estas, os *Staphylococcus* spp. apresentam a capacidade de expressar β -lactamases que atuam como mecanismo de resistência para múltiplos antimicrobianos. Os genes que codificam para estas enzimas podem coexistir com outros determinantes para resistência antimicrobiana contidos em transposons, integrons e plasmídeos que contribuem para a disseminação intra e interespecífica (LI et al., 2007).

Outros autores relataram a atuação de alguns genes, denominados genes auxiliares ou fatores essenciais, tais como o gene *fem* (*factor essential for methicilin resistance*), que auxilia o gene *mecA* a expressar um alto nível de resistência aos β -lactâmicos (VANNUFFEL et al., 1995). Foram identificados diferentes tipos de genes *fem*, denominados *femA*, *femB*, *femC*, *femD*, *femE* e *femF* (VANNUFFEL et al., 1995). O gene *femA* é essencial para a expressão da resistência e parece ser uma característica peculiar de *S. aureus*, não sendo encontrado em outras espécies de estafilococos.

Esta variedade de marcadores genéticos da resistência aos antibióticos β -lactâmicos influencia a expressão de fenótipos heterogêneos que dificultam a detecção da resistência antimicrobiana por técnicas laboratoriais tradicionais. Muitas pesquisas têm utilizado a técnica da Reação em Cadeia de Polimerase (PCR), para detecção de cepas de ORSA através do gene *mecA* (MURAKAMI et al., 1991; TOKUE et al., 1992). O método de PCR apresenta alta sensibilidade e especificidade além de ser independente das condições físicas e químicas das culturas bacterianas. No entanto, esta técnica molecular ainda é pouco executada na prática laboratorial em Medicina Veterinária, devido ao seu alto custo, limitando sua aplicação a pesquisa científica.

O reconhecimento desta heteroresistência vem sendo um problema devido às diferenças de características de crescimento de vários microrganismos em uma mesma população, onde possivelmente uma população heterorresistente contém tanto organismos suscetíveis que exibem crescimento atípico de *Staphylococcus* não-heterorresistentes, quanto organismos resistentes que crescem mais lentos, ou em condições distintas de temperatura e concentração de NaCl (AARESTRUP et al., 2001).

Em consequência a esses fatores, trabalhos de pesquisas recentes reportaram a dificuldade na avaliação do perfil de suscetibilidade de *Staphylococcus* spp. à oxacilina. Numerosas técnicas são utilizadas na identificação de ORSA. O CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute, 2009), anteriormente NCCLS (National Committee for Clinical Laboratory Standards), padronizou condições distintas de temperatura, concentração de NaCl e a utilização do teste de difusão em disco com cefoxitina, para detecção do fenótipo de resistência à oxacilina. A cefoxitina é uma cefalosporina de segunda geração, que parece apresentar maior eficácia na detecção da presença do gene *mecA*, em relação ao uso da do disco de oxacilina (DANCER, 2001). A cefoxitina induz a produção de PBP2a e têm provavelmente uma afinidade elevada para PBP2 estafilocócica, além de ser resistente à ação de β -lactamases produzidas por *Staphylococcus* spp. (MURAKAMI et al; 1991).

A multiplicidade de fatores associados à resistência ao antibiótico β -lactâmico, oxacilina requer uma investigação minuciosa que inclua a detecção de diferentes marcadores genéticos de resistência para interpretar de forma correta o fenótipo de heteroresistência expresso por determinados isolados de *Staphylococcus* spp..

2.6. Fatores de virulência associados à *Staphylococcus* spp.

Os *Staphylococcus* são microrganismos patogênicos que elaboram uma série de estratégias de sobrevivência para colonizar determinados sítios do hospedeiro mediante a aquisição de uma variedade de fatores de virulência, que permitem a invasão das defesas fagocíticas, facilitam sua aderência às células epiteliais, colonizam os tecidos e favorecem sua persistência extracelular. Também se sabe que *Staphylococcus* spp. é capaz de persistir dentro do hospedeiro evadindo a reposta imune. Este processo deve-se à internalização das cepas nas células epidérmicas e endoteliais (ALMEIDA et al., 1996). Assim como é capaz de invadir e induzir à morte de vários tipos celulares mediante atividade citotóxica (BAYLES et al., 1998; KRUT et al., 2003).

A patogenicidade dos estafilococos é multifatorial, geralmente envolvendo um grande número de proteínas extracelulares e outros fatores de virulência. Algumas destas proteínas, incluindo citotoxinas e exoenzimas, são secretadas; outras, incluindo a proteína A e várias adesinas, fixam-se na parede celular. Juntas, estas proteínas capacitam o microrganismo a escapar das defesas do hospedeiro, aderir às células e moléculas da matriz intercelular, invadir ou destruir as células do hospedeiro, e a se propagar dentro dos tecidos. Sua produção é governada por uma cadeia complexa de

funções regulatórias cuja expressão “in vitro” é temporariamente programada e depende amplamente, direta ou indiretamente, de sinais ambientais (DINGES et al., 2000).

Diversos estudos a respeito de fatores de virulência são conduzidos a partir da detecção de genes especificamente associados à espécie *Staphylococcus aureus*, no entanto, diversas outras espécies desse gênero estão associadas à patologia em animais de companhia (LILENBAUM et al., 1998). Portanto, o presente estudo investigou o fenótipo e genótipo de diversos fatores de virulência nas principais espécies de *Staphylococcus* isoladas a partir de infecções em animais de companhia como forma de observar o perfil epidemiológico destes isolados e fornecer dados a respeito da dispersão de genes de virulência na população animal.

2.6.1. Formação de biofilme (genes *icaA* e *icaD*)

A adesão é primeiro ponto crítico na patogenia provocada por microrganismos patogênicos. A habilidade dos *Staphylococcus* spp. de se aderirem à superfície do epitélio tem sido associada à produção de biofilmes, composto de multicamadas de células embebidas em uma matriz de mucopolissacarídeo. Algumas estirpes produtoras de biofilmes têm uma significativa capacidade de colonização quando comparadas com as estirpes não produtoras e variantes (BASELGA et al., 1993). Os biofilmes formados por *S. aureus* isolados de mastite bovina e infecções de pele de cães tem sido associados à redução da susceptibilidade a antimicrobianos, fato este atribuído a baixa difusão de antimicrobianos na matriz e a baixa atividade metabólica das bactérias dentro dos biofilmes (AMORENA et al., 1999).

Os biofilmes são agregados de microrganismos embebidos nessa matriz polimérica e aderidos a uma superfície sólida, formando uma estrutura porosa e altamente hidratada contendo exopolissacarídeos e pequenos canais, abertos por entre microcolônias. Este tipo de organização é extremamente vantajoso a todas as espécies de microrganismos por fornecer proteção contra adversidades como desidratação, colonização por bacteriófagos e resistência a antimicrobianos (UZCUDUN, 2004).

Os biofilmes são também considerados exopolissacarídeos, com uma matriz espessa, conhecida como “slime” rodeados de multicamadas de células sendo que a produção dessa matriz está sobre um controle poligênico (JEFFERSON, 2004). A composição desta matriz secretada varia entre os microrganismos e no caso de *S. aureus* é formada por poli-N-acetilglicosamina. O locus de adesão intercelular é denominado *ica* e consiste nos genes *icaADB* e *C* responsáveis pela produção do polissacarídeo. A deleção destes genes resulta na perda da capacidade de formação do biofilme (VASUDEVAN et al., 2003). Entre os genes citados, o *icaA* e o *icaD* vêm sendo reportados como os principais responsáveis pela formação do biofilme (ARCIOLA et al., 2001). O gene *icaA* que codifica a N-acetilglicosaminatransferase, uma enzima envolvida na síntese de N-acetilglicosamina e, o gene *icaD* representam um papel fundamental na expressão desta enzima, possibilitando a expressão fenotípica do polissacarídeo (ARCIOLA et al., 2001). O gene *icaA* que apresenta atividade catalítica N-acetilglicosaminatransferase quando expresso sozinho tem baixa atividade transferase mas, quando é co-expresso com o gene *icaD* apresenta atividade total sintetizando resíduos longos de 10-20 oligômeros de β -1,6-N-acetilglicosamina (DOBINSKY et al., 2002; GALDBART et al., 2000; GOTZ, 2002).

Em geral a formação do biofilme envolve distintos estágios, incluindo adesão inicial ao substrato, adesão entre as células, proliferação, maturação e finalmente as bactérias da matriz se liberam do biofilme para poder colonizar novas superfícies, completando o processo de formação do biofilme (OTTO et al., 2004) (Figura 3). Acredita-se que o sistema “Quorum Sensing” influencia a formação do biofilme em muitos destes estágios em *Staphylococcus* spp..

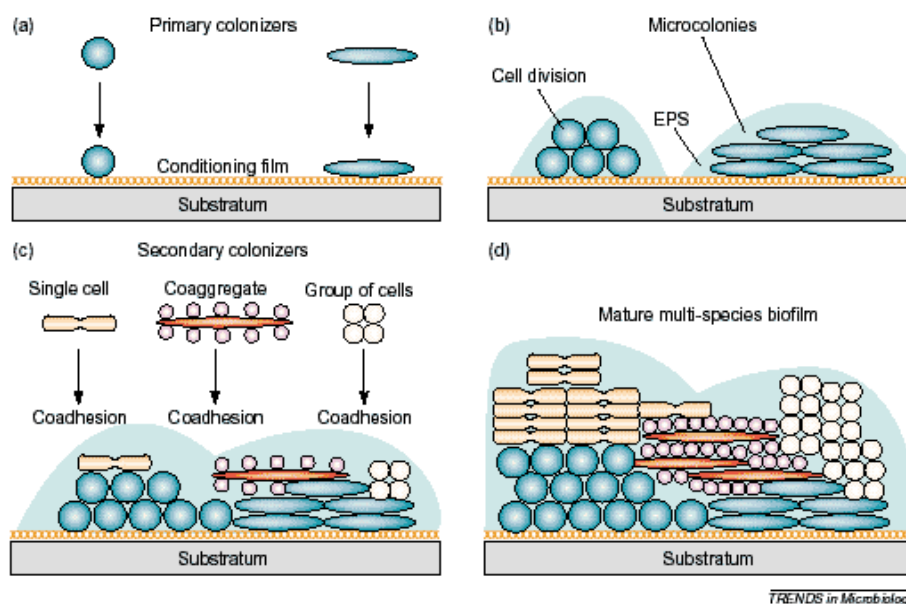


Figura 3. Desenvolvimento de um biofilme. (a) Colonização primária; (b) crescimento, divisão celular e produção do exopolissacarídeo (“slime”), com o desenvolvimento de microcolônias; (c) coesão de células individuais, originando um biofilme jovem, de múltiplas espécies; (d) maturação do biofilme maduro. (Extraído de RICKARD et al., 2003).

A adesão à superfície é o estágio crucial de transição entre as células livres e as que formarão a primeira camada do biofilme. Este fenômeno envolve a produção de muitas moléculas de adesão que são capazes de estabelecer uma interação físico-química entre as células e a superfície (VUONG et al., 2000).

A liberação destas bactérias é a etapa que menos se conhece. No caso de *S. aureus*, é descrito um processo de variação de fase produzido pela inversão reversível de um elemento de inserção (IS256) no interior do operon (*icaADBC*) responsável pela síntese do exopolissacarídeo do biofilme. O fenômeno de variação de fase foi primeiramente descrito por Baselga e colaboradores (1993) referindo-se aos *S. aureus* isolados de casos de mastite, no qual colônias de *S. aureus* produtoras de “slime” foram capazes de após novo cultivo no Ágar Vermelho Congo (CRA) não produzirem mais “slime” e colônias não produtoras se tornaram produtoras. No referido trabalho foram descritas as diferenças entre estirpes produtoras de “slime” (SP) e não produtoras de “slime” (NSP), que se multiplicaram no Ágar Vermelho Congo. Os autores relataram que após repetidos sub-cultivos foi possível converter estirpes não produtoras de “slime” em estirpes produtoras de “slime” e vice-versa. Pesquisas feitas por Conlon e colaboradores (2004) demonstraram que a variação de fase está sob regulação do locus *icaADBC* e ocorre quando esses genes são inativados ou tem baixa regulação na expressão gênica, sendo que, esta variação de fase representa um importante mecanismo que facilita a saída das células livres dos biofilmes. Essa saída das células dos biofilmes resultou na ativação da expressão do gene por meio de adesão, toxinas e rápida multiplicação, e esse estágio é frequentemente acompanhado por recorrência da infecção.

Os biofilmes podem representar problemas em relação ao tratamento das infecções por permitir que microrganismos fiquem protegidos da ação de antimicrobianos e da fagocitose pelo sistema imune, o que o torna persistente em diversos sítios infecciosos, induzindo falhas terapêuticas. Algumas estirpes produtoras de biofilmes têm uma significativa capacidade de colonização quando comparadas com as estirpes não produtoras e variantes (ARCIOLA et al., 2001). Os biofilmes formados

por *Staphylococcus aureus* isolados de infecções humanas e animais estão associados à redução da susceptibilidade a antimicrobianos, fato este atribuído a baixa difusão de antimicrobianos na matriz e a baixa atividade metabólica das bactérias dentro dos biofilmes.

O conhecimento do envolvimento do “slime” na patogênese das infecções estafilocócicas inspirou a elaboração de investigações que detectem o perfil fenotípico e genotípico desse fator de virulência em isolados de *Staphylococcus* spp. provenientes de infecções de animais de companhia.

2.6.2. Proteína A (gene *spaA*)

A proteína A apresenta a propriedade de combinar-se ao fragmento Fc da imunoglobulina G, bloqueando a via alternativa de ativação do complemento e da subsequente opsonização e fagocitose. O complexo proteína A-IgG funciona no processo de ligação e aderência dos estafilococos aos tecidos infectados (ALONSO; DAGGET, 2000).

A proteína A é codificada pelo gene *spaA* que possui uma região polimórfica ou variável e uma região conservada. A região polimórfica X consiste em um número variável de seqüências de 24pb repetidas e está localizada na região codificante do extremo C-terminal da parede celular (Figura 4) (KOREEN et al., 2004).

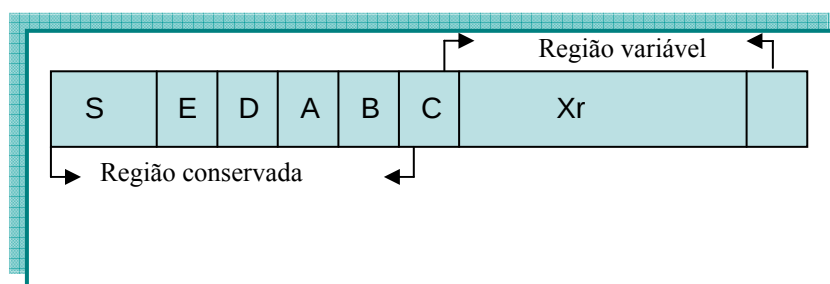


Figura 4. Diagrama esquemático do gene *spaA*. S: sequência sinal; regiões E, D, A, B e C: sítio de ligação de imunoglobulinas; Xr: região variável repetida (figura adaptada de COELHO, 2008).

A diversidade da região parece originar-se a partir de deleções ou duplicações espontâneas das unidades repetidas, assim como também por mutações pontuais. O domínio da proteína A, codificado pela região X, funciona de modo a estender a porção N-terminal da união à imunoglobulina IgG através da parede celular, evitando assim a fagocitose e a fixação do complemento (KOREEN et al., 2004).

Recentemente o sequenciamento da região polimórfica X, ou de pequenas repetições sequenciais do gene *spaA* vem sendo proposto como alternativa às correntes técnicas existentes para tipificação de *Staphylococcus aureus* (SHOPSIN et al., 2000). Várias metodologias podem ser usadas para tipificação de isolados MRSA, no entanto a que apresenta melhor resultado discriminatório é a técnica de eletroforese por campo pulsátil (PFGE), considerada técnica “padrão ouro”. No entanto, a execução desta técnica é muito laboriosa e a interpretação de resultados gera controvérsias quanto a análises inter-laboratoriais. Moodley e colaboradores (2006) avaliaram o poder discriminatório da análise de poliformismo do gene *spaA* em combinação com a técnica de PFGE quando investigaram a transmissão de cepas epidêmicas de MRSA entre animais de companhia e veterinários de um hospital do Reino Unido. Os autores concluíram que o uso das duas técnicas em combinação proveu melhores escores discriminatórios das cepas de MRSA entre os distintos hospedeiros.

2.6.3. Produção de coagulase (gene *coa*)

A coagulase é um importante fator de virulência, pois tem a capacidade de coagular a fibrina que se deposita ao redor da bactéria oferecendo-lhe proteção (REINOSO, 2004). No processo de formação da fibrina não ocorre atividade proteolítica e é independente de íons de cálcio e fosfolipídeos, diferente do que ocorre na formação da trombina fisiológica. A fibrina, induzida pela estafilotrombina, é mais resistente à ação digestiva da plasmina (SHOPSIN et al., 2000).

A estafilocagulase é produzida por diferentes cepas de estafilococos, distintas em suas propriedades bioquímicas e na habilidade de coagular o plasma, pelo fato de existir uma alta afinidade para induzir a coagulação do plasma de espécie humana ou animal da qual se isolou a cepa (DEMO, 1996). No entanto, “in vitro” podem ser detectados isolados falsos positivos e falsos negativos para produção de enzima coagulase. Os falsos negativos estariam associados à clivagem parcial por proteases (estafiloquinas) e os falsos positivos são observados quando a protrombina é ativada por tripsina ou proteases. A este fenômeno se denomina “pseudocoagulase” (SHOPSIN et al., 2000).

A análise da sequência nucleotídica do gene *coa* clonado a partir de três diferentes isolados de *S. aureus* revelou a existência de um segmento variável dentro da região 3' codificante (KAIDA, 1989; PHONIMDAENG, 1990). Esta região variável constituída de sequências curtas repetidas (SRRs) em “tandem” de 81pb (Figura 2) é utilizada em diversos estudos epidemiológicos para subtipar isolados de *S. aureus* baseado no número de sequências repetidas e pela localização de sítios de restrição para endonucleases específicas, permitindo aumentar o poder discriminatório da técnica (GOH et al., 1992).

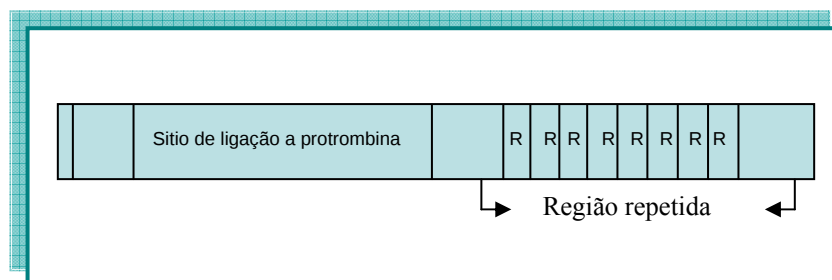


Figura 5. Diagrama esquemático do gene *coa*. R: unidade de sequência repetida de 81pb. (figura adaptada de COELHO, 2008).

2.6.4. Propriedades hemolíticas (genes *hla* e *hlb*)

As hemolisinas são agentes citotóxicos cuja ação pode auxiliar no poder invasivo das bactérias. Chapman e colaboradores (1934) demonstraram a atividade hemolítica dos estafilococos sobre ágar contendo sangue de coelho e correlacionaram à patogenicidade das cepas.

Alguns tipos de hemolisinas induzem mudanças pró-inflamatórias nas células, inativam o sistema imune por efeito citotóxico direto, e degradam tecidos (PROJAN; NOVICK, 1997).

As quatro citolisinas estafilocócicas são diferentes entre si de acordo com ação lítica sobre os eritrócitos de diferentes espécies, mas as do tipo beta e delta apresentam uma maior importância na patogênese das infecções (DEMO, 1996).

A alfa citolisina é uma proteína cristalizada que possui peso molecular que varia de 22000 a 39000 dependendo do método de isolamento e purificação. Esta citolisina produz danos aos tecidos posteriormente ao estabelecimento do foco da infecção. É

citotóxica e citolítica para uma variedade de tipos celulares, além de dermonecrótica e neurotóxica (LINEHAN et al., 2003). Em ágar sangue produz uma ampla zona de completa hemólise ao redor da colônia.

Esta toxina causa formação de poros nas membranas celulares explicando a sua capacidade de causar lise nos eritrócitos. A sensibilidade dos eritrócitos a lise pela ação da alfa toxina varia muito, devido à distribuição de lipídeos e proteínas de membrana, sendo os mais sensíveis os de coelho, seguidos de ovelhas e bovinos (ROGOLSKY, 1979). Em células humanas o efeito citopatogênico não está associado à hemólise. O principal efeito patogênico da alfa-toxina é o dano celular endotelial e a ativação de plaquetas, levando ao comprometimento da microcirculação. A toxina age também nas membranas, induzindo a produção de eicosanóide (prostaglandinas) que resulta em vasoconstrição, em aumento de permeabilidade capilar e em edema. Pode também ativar endonucleases celulares, precipitando a morte da célula. Esta toxina é codificada pelo gene *hla*, sendo encontrada principalmente no *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus haemolyticus*, *Staphylococcus lugdunensis* e *Staphylococcus warneri* (CUNHA, 1998).

A beta toxina é particularmente característica de cepas estafilocócicas, devido ao fato de que a pele e os tecidos glandulares serem extremamente ricos em esfingomielina quando comparados a outras áreas do corpo. Esta toxina age como uma esfingomielinase e destrói membranas celulares ricas em esfingomielina, sendo tóxica para vários tipos celulares, tais como, hemácias, leucócitos, plaquetas, fibroblastos e macrófagos. No entanto, seu papel patogênico em infecções humanas é desconhecido (PARK et al., 2004). A expressão genética desta citolisina pode estar negativamente controlada por dois tipos de conversão fágica. Uma é a dupla conversão fágica, na qual o microrganismo adquire a habilidade de expressar estafiloquinase e perde a habilidade de expressar a toxina. E a segunda conversão, na qual ele perde por lisogenização a habilidade de produzir a citolisina (LINEHAN et al., 2003).

Esta toxina é codificada pelo gene *hly* e já foi isolada e sequenciada em *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus haemolyticus* e *Staphylococcus lugdunensis*. Em ágar contendo sangue ovino, bovino e humano a beta citolisina produz uma zona de hemólise incompleta (CUNHA, 1998).

Christie e Graydon (1941) (*apud* WILLIAMS; HARPER, 2005) relataram que algumas cepas estafilocócicas produziam uma área definida de completa hemólise quando inoculados dentro da zona de efeito beta hemolítico produzido por outros estafilococos. Este método denominado ensaio sinérgico hemolítico (SHA) é devido à ação combinada da beta e delta citolisina que pode ser avaliada em meios de ágar contendo eritrócitos ovinos, bovinos, humanos e equinos. Pelo fato da alfa citolisina não ter efeito sobre eritrócitos humanos e equinos, e a beta e gama citolisina apresentar muito pouco ou nenhum efeito sobre eritrócitos de equinos se deduz que o SHA observado é devido a delta toxina e deve ser observado principalmente em sangue de ovino (HEBERT; HANCOCK, 1985).

2.6.5. Sistema regulador de proteínas (gene *agr*)

A delicada coordenação da expressão dos fatores de virulência usualmente espécie-específicos é crucial para a sobrevivência do patógeno e conseqüente sucesso da invasão no hospedeiro (VOJTOV et al., 2002).

Dentre o sistema de regulação bacteriana, a comunicação existente entre as células, denominada sistema “Quorum Sensing (QS)” vem adquirindo maior atenção da comunidade científica com o passar dos anos. Os sinais do sistema QS são pequenas moléculas denominadas autoindutoras (AIs), que são detectadas em baixas concentrações quando a densidade populacional bacteriana também é baixa. Quando as

células atingem uma determinada densidade populacional e as AIs acumulam, devido a sua grande concentração, um sistema regulador é ativado e controla a expressão de vários genes, incluindo aqueles associados aos fatores de virulência (KONG et al., 2006).

O sistema QS bem caracterizado em *Staphylococcus aureus* é denominado *agr* que apresenta aproximadamente 3.5kb que é co-transcrito pelo RNAIII, o qual controla a expressão de genes alvos de forma desconhecida (VUONG et al., 2000) (Figura 6).

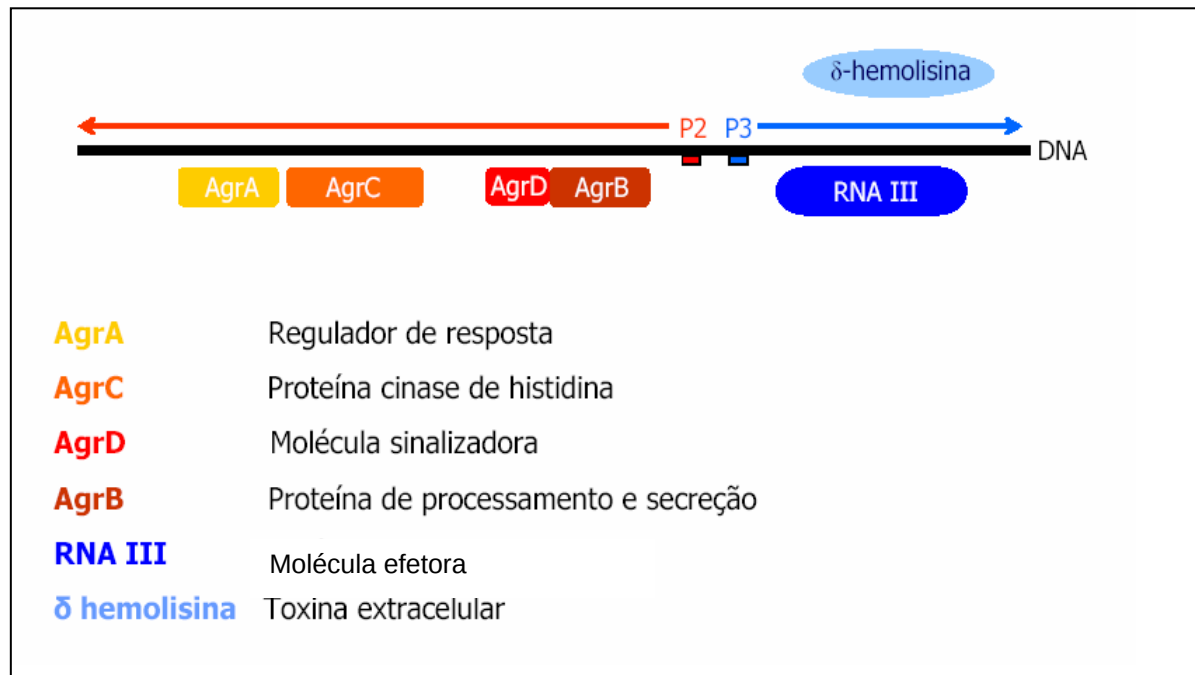


Figura 6. Diagrama esquemático do gene regulatório *agr* (figura adaptada de COELHO, 2008).

O sistema *agr* é ativado durante a transição da fase exponencial para a fase estacionária da curva de crescimento bacteriano por um mecanismo auto-regulatório. O RNAIII é uma molécula reguladora do *agr* que contribui para a não expressão de genes de virulência relacionados a componentes estruturais de *S. aureus* e, à expressão de fatores de virulência secretáveis durante a fase exponencial. O RNA III codifica os quatro genes do operon *agr*, *agrBDCA*. O *agrC* e *agrA* são componentes que se complementam, enquanto que o *agrC* é o sensor, o *agrA* é o regulador e *agrD* e *agrB* participam na produção de um octapeptídeo (AIs) (VUONG; OTTO, 2002). Nos estafilococos, estas moléculas autoindutoras apresentam uma estrutura conservada, mas apresentam diferenças nas seqüências dos aminoácidos.

Análises laboratoriais vêm demonstrando que este gene inativa a produção de exoproteínas envolvidas nos fatores de virulência. Trabalhos confirmam que variações na transcrição do RNAIII de *S. aureus*, induzidas pelo locus *agr*, alteram a expressão de proteína A e hemolisinas (OTTO et al., 2004; TAKEUCHI et al., 2001).

De acordo com a literatura, a perda do sistema *agr* reduz a virulência de *S.aureus* em modelos experimentais. Abdelnour e colaboradores (1993) demonstraram que o sistema *agr* em *S.aureus* é um determinante essencial para a indução e progressão da artrite séptica em camundongos. Em trabalho desenvolvido por Gillaspay e colaboradores (1995) foi possível avaliar que mutações no sistema *agr* reduzem a incidência e grau de severidade da osteomielite em coelhos.

Desde a sua identificação, o sistema *agr* vem sendo caracterizado como parte central do desenvolvimento da patogênese estafilocócica, como adesão e subsequente

infecção. A literatura descreve que a ausência de função do sistema *agr* facilita a adesão inicial dos estafilococos às superfícies, presumidamente devido à expressão positiva de moléculas de adesão e negativa de fatores de formação do biofilme, que são liberados no final da fase estacionária (VUONG et al., 2000).

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo geral:

Avaliar os principais agentes bacterianos envolvidos na etiologia de processos infecciosos de animais de companhia e seu respectivo perfil de suscetibilidade antimicrobiana. Detectar feno-genotipicamente marcadores de resistência à azitromicina e oxacilina, e os principais fatores de virulência expressos em *Staphylococcus* spp. provenientes desses casos de infecção.

3.2. Objetivos específicos:

- Identificar através de provas fenotípicas as espécies bacterianas envolvidas nos processos infecciosos de animais de companhia;
- Avaliar a suscetibilidade fenotípica dos principais agentes bacterianos identificados frente aos antimicrobianos de eleição;
- Detectar a resistência à azitromicina através de distintos testes fenotípicos em *Staphylococcus* spp. e Bastonetes Gram-negativos detectados em infecções de animais de companhia;
- Amplificar os genes de resistência à macrolídeos *ermA*, *ermB*, *ermC* e *mef* em *Staphylococcus* spp. isolados de infecções de animais de companhia;
- Detectar a resistência à oxacilina através de distintos testes fenotípicos em *Staphylococcus* spp. isolados de infecções de animais de companhia;
- Amplificar os genes de resistência à oxacilina *mecA*, *mecI*, *mecR1*, genes reguladores da produção de β -lactamases, *blaZ*, *blaI* e *blaI* e o gene *femA* em *Staphylococcus* spp. isolados de infecções de animais de companhia;
- Detectar através de provas fenotípicas os fatores de virulência: coagulase, “slime”, hemolisinas e sinergismo hemolítico em todos os isolados de *Staphylococcus* spp.;
- Traçar o perfil da virulência através da amplificação dos genes de virulência *hla* e *hly* (α e β -hemolisinas, respectivamente), *icaA* e *icaD* (“slime”) em todos os isolados de *Staphylococcus* spp.;
- Traçar o perfil da virulência através da amplificação dos genes de virulência *spaA* (proteína A), *coa* (coagulase) e *agr* (controle da produção de exoproteínas) em *S. aureus* e em outras espécies de *Staphylococcus* para verificar sua prevalência e perigo epidemiológico.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Origem das amostras

Para alcançar o objetivo proposto, foram obtidos 225 espécimes clínicos provenientes de 191 cães e 34 gatos, através do acompanhamento da rotina de atendimento clínico do Hospital Veterinário de Pequenos Animais da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (UFRRJ), do Departamento de Clínica Médica de Pequenos Animais da Universidade Estácio de Sá. Também foram coletadas amostras através de visitas periódicas ao canil do Instituto Veterinário Municipal Jorge Waitsman e da Polícia Militar do Estado do Rio de Janeiro (PMERJ). Todas as amostras foram encaminhadas sob refrigeração ao Laboratório de Bacteriologia Veterinária situado no Instituto de Veterinária da UFRRJ para realização dos procedimentos de identificação bacteriológica e testes de suscetibilidade aos antibióticos de eleição.

4.2. Coleta das Amostras

4.2.1. Quadros de otite externa canina

Foram obtidos 66 espécimes do conduto auditivo externo de cães otopatas com o auxílio de “swabs” estéreis. Durante o exame clínico, os animais foram submetidos a otoscopia para avaliação da mucosa auricular e de alterações patológicas como edema, hiperemia, secreção e pesquisa de parasitos. Também foi realizado exame citológico para observação das características do exsudato auricular tais como, celularidade, presença de bactérias, leveduras e parasitos.

4.2.2. Quadros de infecção de pele

Foram obtidos 42 espécimes de 34 cães e oito gatos com lesões e secreções da pele com o auxílio de “swabs” estéreis. Durante a anamnese e exame clínico foram investigados sinais como característica da lesão (pustular, exsudativa, purulenta, hemorrágica, crostosa, miíases e outras), localização e distribuição das lesões, áreas de alopecia, presença de prurido, além de exames citológicos para detecção de parasitos, bactérias e leveduras e observação de alterações do pêlo.

4.2.3. Quadros de infecção urinária

Foi obtido o total de 60 espécimes provenientes de 34 de cães e 26 de gatos clinicamente suspeitos de infecção urinária. Durante a anamnese e exame clínico foram investigados sinais como poliúria, hematúria, anúria, obstrução uretral (principalmente em felinos), dor durante a micção e outros, além das informações a respeito da conduta terapêutica e antibioticoterapia. A coleta das amostras foi realizada através das técnicas de cistocentese, sonda uretral, ou a partir da micção espontânea dependendo do estado clínico do animal e da exigência do diagnóstico. As amostras foram enviadas para o Laboratório de Patologia Clínica da Universidade Estácio de Sá para avaliação dos Elementos Anormais e Sedimentoscopia (EAS), e após centrifugação pequenas alíquotas do sedimento e sobrenadante foram transferidas para tubos coletores estéreis.

4.2.4. Quadros de infecção uterina em cadelas

Foram obtidos espécimes de oito cadelas que apresentaram lesões e alterações comportamentais relacionadas ao trato reprodutivo. As principais alterações analisadas durante exame ginecológico das fêmeas foram: presença de secreção vaginal, vulvovaginite, alterações do ciclo estral, piometra (detectada por ultra-sonografia) dentre outras. A coleta foi realizada por aspiração direta do conteúdo uterino durante cinco

intervenções cirúrgicas (panhisterectomia) realizadas no Departamento de Cirurgia de Pequenos Animais da Universidade Estácio de Sá. Os demais espécimes foram coletados diretamente do sítio infeccioso através de swabs estéreis, fornecidos pelo atendimento clínico do Hospital Veterinário de Pequenos Animais da UFRJ.

4.2.5. Quadros de infecção respiratória

Foram obtidos cinco espécimes de secreções nasais de cinco cães coletados através “swabs” estéreis ou de secreções obtidas por aspiração bronquiolar. Na maioria dos casos, os animais apresentaram sinais de tosse, alterações nos movimentos respiratórios, alterações de ausculta pulmonar, secreções nasais purulentas, inflamação da faringe e linfadenite.

4.2.6. Quadros de infecção da conjuntiva ocular

Foram obtidos 16 espécimes de cães com alterações patológicas da mucosa conjuntival tais como, secreções purulentas e úlceras de córnea. Os espécimes foram coletados por “swabs” estéreis durante o exame clínico oftalmológico dos animais.

4.2.7. Quadros de infecção do tecido ósseo

Foram obtidos quatro espécimes de cães com processos infecciosos ósseos, que compreenderam a osteomielite, fratura femural completa exposta e osteossarcoma. Os espécimes foram coletados a partir de “swabs” estéreis durante o exame clínico e a partir de biópsia.

4.2.8. Quadros de infecção da cavidade oral

Foram obtidos 12 espécimes de cães com alterações patológicas da cavidade oral que incluíram periodontites, lesões pustulares e fistulares provocadas por infecção dos dentes pré-molares e molares superiores. Os espécimes foram coletados por “swabs” estéreis durante a contenção física ou química dos animais.

4.2.9. Quadros de infecção do trato gastrointestinal

Foram obtidos 12 espécimes de fezes de cães que apresentaram processos diarreicos. Os espécimes foram coletados em potes coletores estéreis durante o exame clínico dos animais no Hospital Veterinário de Pequenos Animais da UFRJ e também encaminhados para realização de exame parasitológico diferencial

4.3. Isolamento Primário e Identificação Presuntiva

As amostras clínicas foram inoculadas em ágar sangue (5% de sangue de carneiro) e em meios seletivos e diferenciais de acordo com o tipo e sítio de coleta. As placas foram incubadas a 37°C por 24 horas e posteriormente observadas as características morfológicas das colônias. As colônias isoladas foram submetidas ao método de Gram, teste da catalase e hidróxido de potássio a 3% e processadas de acordo com os testes de identificação específicos para cada grupo bacteriano (KONEMAN et al., 2008).

4.3.1. *Staphylococcus spp.*

O isolamento primário foi efetuado em ágar sangue (AS), posteriormente, as amostras foram repicadas em ágar seletivo manitol vermelho de fenol (MVF). Após a identificação presuntiva das colônias, estas foram submetidas ao método de Gram, para confirmação das suas características morfotintoriais, à prova da catalase e ao teste do

KOH a 3%, onde a não formação de gel viscoso indicou resultado negativo (KONEMAN et al., 2008). A prova da coagulase em tubo foi realizada para diferenciação entre as espécies de *Staphylococcus*. Uma alíquota de 0,1 ml de cada amostra cultivada em caldo BHI (Infuso de Cérebro e Coração), foi adicionada a 0,5 ml de sangue total de carneiro, acrescido de etileno-diamina-tetra-acetato (EDTA-1%) e incubadas a 37°C por 6 horas a fim de obter a visualização do coágulo. As amostras coagulase-positivas tiveram sua identificação comprovada através das provas de Voges-Proskauer (VP), fermentação da maltose e redução do nitrato (KONEMAN et al., 2008) (Anexo I). As amostras coagulase-negativas foram submetidas à prova da resistência a bacitracina para diferenciação entre *Micrococcus* spp., sensíveis, e *Staphylococcus* spp. coagulase-negativos (SCN), resistentes. Para identificação das espécies de SCN foram efetuadas as seguintes técnicas: fermentação de açúcares (xilose, sacarose, trealose, frutose, maltose, lactose e manose), redução de nitratos e produção de urease (KONEMAN et al., 2008) (Anexo II).

4.3.2. *Streptococcus* spp.

A identificação dos isolados de *Streptococcus* spp. foi efetuada através do isolamento primário em AS e posterior repique em meio seletivo para *Streptococcus* spp. (ágar Azida). Após incubação, a 37°C por 24 horas em microaerofilia, utilizando sistema GASPAC, foram observadas as características morfológicas das colônias e o padrão de hemólise em AS. As provas de identificação realizadas foram: inoculação em leite adicionado de azul de metileno, teste de CAMP e provas de hidrólise de esculina e hipurato (ANVISA, 2005; KONEMAN et al., 2008).

4.3.3. Enterobactérias

Além do isolamento primário em AS, as amostras também foram repicadas em meios seletivos como ágar Mac Conkey (MC) e Eosina Azul de Metileno (EMB). Após a identificação presuntiva das colônias, estas foram submetidas ao método de Gram, teste da catalase e prova do KOH a 3%, onde a formação de gel viscoso indicou resultado positivo. As seguintes provas de identificação foram realizadas: comportamento em ágar triplice açúcar-ferro (TSI), motilidade em tubo, produção do Indol, produção de ácidos a partir da glicose, fermentação de açúcares, redução do nitrato, produção de gelatinase, produção de urease, degradação do citrato e do malonato, e outros diferenciais de acordo com o microorganismo envolvido (KONEMAN et al., 2008).

4.3.4. Bastonetes Gram-negativos não-fermentadores

O mesmo padrão de isolamento primário, identificação presuntiva e testes fenotípicos realizados para as amostras suspeitas de enterobactérias foram utilizados para os bastonetes Gram-negativos não-fermentadores, diferenciados através da prova de comportamento em ágar TSI, pela não fermentação dos açúcares lactose, glicose e sacarose. Para a identificação confirmatória, as amostras suspeitas foram submetidas às provas de redução de nitrato, prova da oxidase e teste de fermentação e oxidação da glicose a 1% em caldo vermelho de fenol. As amostras suspeitas de *Pseudomonas* spp., ou seja, negativas em todos os testes citados anteriormente, foram repicadas em ágar Müeller Hinton (MH) para observação de pigmento fluorescente (pioverdina) a luz ultravioleta característico de *Pseudomonas* spp. Grupo *Fluorescens* (KONEMAN et al., 2008).

4.3.5. Bastonetes Gram-positivos

As bactérias dos gêneros *Corynebacterium* spp. e *Listeria* spp. foram identificadas a partir da triagem inicial pela técnica de cloração de Gram que permitiu a

identificação de bastonetes Gram-positivos, retos ou ligeiramente curvos com a forma de clava, que apresentavam arranjos característicos em paliçada ou letras chinesas. Posteriormente os isolados bacterianos foram inoculados em ágar MH para obtenção de colônias puras e a diferenciação entre estes gêneros bacterianos foi realizada segundo resultados obtidos a partir das seguintes provas bioquímicas: prova da catalase, motilidade, indol, H₂S, uréia, hidrólise da esculina, crescimento em NaCl 6,5%, gelatina e isolamento em ágar sangue para análise do padrão de hemólise.

As bactérias identificadas como sendo do gênero *Bacillus* spp. apresentaram características morfotintoriais de bastonetes Gram-positivos esporulados, com formato de bastonetes grandes, retos, isolados ou em cadeias. A produção de esporos em condições de cultivo em aerobiose e prova de catalase positiva permitiu a caracterização deste gênero.

4.4. Teste de suscetibilidade aos antimicrobianos de eleição

Após identificação os isolados foram submetidos ao teste de difusão em disco para determinar o perfil de suscetibilidade microbiana. Os isolados foram inoculados em caldo BHI, durante 24 horas a 37°C e, posteriormente, diluídos a concentração de 0,5 da escala de Mc Farland, equivalente a $1,5 \times 10^6$ células/mL, segundo os padrões estabelecidos pelo CLSI, 2008. Os isolados foram mantidos sob congelamento em caldo MH acrescido de 4% de glicerol para posterior realização de outras metodologias.

4.4.1. Antimicrobianos

A escolha dos antimicrobianos (SENSIFAR-CEFAR[®]) para a realização dos ensaios de difusão em disco foi realizada segundo as indicações terapêuticas para cada um dos sítios de infecção de acordo com os dados disponíveis pela literatura atual. Para o gênero *Staphylococcus* spp. foram testados os seguintes antimicrobianos: ampicilina (10µg), penicilina G (10UI), oxacilina (1µg), ampicilina + sulbactam (10µg/10µg), amoxicilina + ácido clavulânico (20µg/10µg), cefoxitina (30µg), cefalotina (30µg), ceftriaxona (30µg), azitromicina (15µg), eritromicina (15µg), clindamicina (2µg), ciprofloxacina (5µg), enrofloxacina (10µg), norfloxacina (10µg), tobramicina (10µg), gentamicina (10µg), vancomicina (30µg), sulfametoxazol + trimetopim (1,25 µg /23,75µg), linezolida (30µg), tetraciclina (30µg) e imipenem (10µg). Para Enterobacteriaceae e *Pseudomonas* spp. foram testados os seguintes antimicrobianos: ceftriaxona (30µg), cefalotina (30µg), ciprofloxacina (5µg), enrofloxacina (10µg), norfloxacina (10µg), gentamicina (10µg) e tetraciclina (30µg).

4.4.2. Técnica da Difusão em Disco

Uma alíquota de 0,1 mL da suspensão bacteriana foi distribuída por toda a superfície da placa contendo ágar MH com o auxílio da alça de Drigalski. Os discos foram depositados sobre a superfície do meio de cultura, já contendo o inóculo, e após incubação por 24 horas a 37°C os diâmetros formados na zona de inibição ao redor dos discos de antibiótico foram observados e medidos em milímetros de acordo com padrões estabelecidos pelo CLSI, 2009. A cepa padrão de *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923) foi obtida junto ao Instituto Nacional de Controle de Qualidade/INCQS/FIOCRUZ e utilizada como controle do teste.

O anexo III contém os critérios interpretativos adotados para os halos de inibição antimicrobiana de bactérias do gênero *Staphylococcus* spp. e o Anexo IV para Enterobacteriaceae e Pseudomonadaceae.

4.5. Avaliação *in vitro* do Perfil de Atividade da Azitromicina dos isolados bacterianos provenientes de infecções em animais de companhia

4.5.1. Avaliação do perfil de suscetibilidade bacteriana a azitromicina através da técnica de Difusão em Disco

A avaliação da suscetibilidade a azitromicina através da técnica de difusão em disco foi realizada em separado, utilizando a metodologia já preconizada pelo CLSI, 2008. Os discos de azitromicina (SENSIFAR-CEFAR[®]) de 15µg foram depositados sobre a superfície do meio de cultura, já contendo o inóculo, e após incubação por 24 horas a 37°C, os diâmetros formados na zona de inibição ao redor dos discos, foram observados e medidos, em milímetros (CLSI, 2009). Os diâmetros acima ou iguais a 18 mm indicavam a sensibilidade da amostra ao antibiótico. Cada isolado foi testado novamente, em intervalo de uma semana, para avaliação da reprodutibilidade do teste. A cepa padrão de *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923) foi utilizada como controle do teste.

4.5.2. Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) para azitromicina através da técnica de Microdiluição em Caldo

O método da microdiluição em caldo permitiu a avaliação da menor concentração de azitromicina (PFIZER[®]) capaz de impedir o crescimento bacteriano. Para isso, uma solução estoque de azitromicina (5,12mg/mL) foi diluída em diferentes concentrações em caldo MH, que variaram de 1,0µg/mL; 2,0µg/mL; 4,0µg/mL; 8,0µg/mL; 16,0µg/mL; 32,0µg/mL; 64,0µg/mL; 128,0µg/mL; 256,0µg/mL; até 512,0µg/mL. As suspensões bacterianas crescidas por 24hs a 37°C em caldo BHI, foram diluídas até 10⁻³ em caldo MH, a fim de obter-se uma quantidade final de, aproximadamente, 10⁶UFC/mL da escala de Mc Farland. Para cada amostra, a suspensão bacteriana foi adicionada aos poços da microplaca contendo caldo MH e as concentrações distintas de azitromicina, sendo posteriormente incubadas a 37°C por 24 horas. O resultado foi obtido através do grau de turvação observado nos tubos. Qualquer indício de turvação foi considerado crescimento bacteriano, portanto resistente à concentração do antibiótico presente no caldo MH. Logo, o valor da concentração do caldo anterior ao primeiro que não apresentou turvação, foi considerado como sendo a concentração inibitória mínima para azitromicina (CLSI, 2009). O CLSI (2009) estabeleceu valores de CIM ≥ 8,0µg/mL para classificar isolados de *Staphylococcus* spp. resistentes, mas não recomendou o uso de azitromicina para Bastonetes Gram-negativos. Portanto, para BGN foi adotado valores de CIM ≥ 8,0µg/mL segundo recomendações da literatura (NEU, 1990; DEBIA et al., 1990). As cepas padrão de *S. aureus* sensível (ATCC 25923) e resistente à oxacilina (ATCC 29213) foram obtidas junto ao Instituto Nacional de Controle de Qualidade/INCQS/FIOCRUZ e utilizadas como controle dos testes. Para avaliar uma possível contaminação durante o preparo da técnica foi utilizado caldo MH com antibiótico sem o inóculo.

4.5.3. Determinação da CIM para azitromicina através da técnica de Diluição em Ágar

O método de diluição em ágar também permite a avaliação da menor concentração de azitromicina (PFIZER[®]) capaz de impedir o crescimento bacteriano e utiliza o ágar MH como substrato para realização das diluições. O desenvolvimento desta técnica se fez através uma concentração inicial de 5,12mg/mL de azitromicina que foi diluída em ágar MH às concentrações de 1,0µg/mL; 2,0µg/mL; 4,0µg/mL; 8,0µg/mL; 16,0µg/mL; 32,0µg/mL; 64,0µg/mL; 128,0µg/mL; 256,0µg/mL; até 512,0µg/mL. As diluições foram despejadas em placas de Petri contendo um volume final de 20mL de ágar MH e em cada placa pode ser inoculada até 30 estirpes, utilizando-se ponteiros

estéreis para cada uma dessas. Após incubação a 37°C por 24hs, o crescimento de colônias indicou resistência à concentração e a CIM foi considerada como a primeira concentração que não apresentou crescimento (MANN; MARKHMAN, 1998). Isolados que cresceram em ágar MH contendo valores de CIM maior ou igual a 8,0µg/mL foram considerados resistentes (CLSI, 2009). As cepas padrão de *S. aureus* sensível (ATCC 25923) e resistente à oxacilina (ATCC 29213) foram obtidas junto ao Instituto Nacional de Controle de Qualidade/INCQS/FIOCRUZ e utilizadas como controle dos testes.

4.5.4. Detecção do fenótipo MLS_B em *Staphylococcus* spp. isolados de infecções de animais de companhia

Para a detecção do fenótipo MLS_B os isolados de *Staphylococcus* spp. foram submetidos ao teste de duplo disco para caracterização dos fenótipos de resistência à macrolídeos, sendo o disco de eritromicina (15µg) aplicado a 15mm de distância ao de clindamicina (2µg), assim como o de azitromicina (15µg). O fenótipo MLS_B foi caracterizado como constitutivo (cMLS_B) quando isolados resistentes apresentam halos de inibição reduzidos ao redor dos discos ou indutivo (iMLS_B) quando halo de inibição ao redor do disco de clindamicina sofre uma constrição de diâmetro próximo ao disco de eritromicina ou azitromicina. Já no fenótipo M foi caracterizado pela resistência apenas a eritromicina ou azitromicina. A cepa padrão de *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923) foi utilizada como controle do teste.

4.6. Avaliação da Resistência Cruzada em *Staphylococcus* spp. Resistentes à Oxacilina e Azitromicina isolados de infecções em animais de companhia

Para a avaliação da resistência cruzada em *Staphylococcus* spp. foi determinado o perfil fenotípico de resistência à azitromicina e oxacilina, e avaliação genotípica da resistência à oxacilina, para posteriormente determinar quantos isolados apresentaram resistência aos dois antibióticos. Os métodos mais utilizados para detecção da resistência à oxacilina, contam com modificações das condições de cultura para aumentar a expressão da resistência. A avaliação fenotípica dessa resistência foi realizada pelas técnicas de difusão em disco, difusão em disco modificada, microdiluição em caldo (KOHNER et al., 1999) e em ágar (MANN; MARKHMAN, 1998). Para a realização dos testes de suscetibilidade à oxacilina, o antibiótico foi diluído a uma concentração estoque de 1,0mg/mL, em água destilada estéril. As cepas padrão de *S. aureus* sensível (ATCC 25923) e resistente à oxacilina (ATCC 29213) foram obtidas junto ao Instituto Nacional de Controle de Qualidade/INCQS/FIOCRUZ e utilizadas como controle dos testes.

4.7. Avaliação fenotípica da resistência à oxacilina em *Staphylococcus* spp.

4.7.1. Teste de difusão em disco simples para detecção do perfil de suscetibilidade à oxacilina e aos antibióticos β-lactâmicos

Para a realização dos testes de suscetibilidade aos β-lactâmicos, foi realizado o teste de difusão em disco para os antibióticos apresentados no Anexo III. As colônias bacterianas crescidas em ágar sangue foram diluídas até 10⁻³ em caldo MH, a fim de obter-se uma quantidade final de, aproximadamente, 10⁶UFC/mL. A suspensão bacteriana (0,1mL) foi distribuída por toda a superfície das placas contendo ágar MH (Merck) com o auxílio da alça de Drigalski. Os discos foram depositados sobre a superfície do meio de cultura, já contendo o inóculo (KOHNER et al., 1999). Após incubação por 24 horas a 37°C, os diâmetros formados na zona de inibição ao redor do

depósito dos fármacos, foram observados e medidos, em milímetros (CLSI, 2009). As cepas padrão de *S. aureus* sensível (ATCC 25923) e resistente à oxacilina (ATCC 29213) foram obtidas junto ao Instituto Nacional de Controle de Qualidade/INCQS/FIOCRUZ e utilizadas como controle dos testes.

4.7.2. Difusão em Disco Modificada

Nesta técnica de difusão em disco, foi utilizado ágar MH suplementado com 4% de NaCl. A suspensão bacteriana (0,1mL) foi distribuída por toda a superfície das placas contendo meio sólido e após incubação por 24 horas a 37°C, os diâmetros formados na zona de inibição ao redor do disco de oxacilina, foram observados e medidos em milímetros. Os diâmetros acima de 14 mm indicavam a sensibilidade da amostra ao antibiótico (KOHNER et al., 1999). As cepas padrão de *S. aureus* sensível (ATCC 25923) e resistente à oxacilina (ATCC 29213) foram utilizadas como controle dos testes.

4.7.3. Ágar Screen

O desenvolvimento desta técnica se fez através da diluição da oxacilina (1,0mg/mL) a uma concentração final de 6µg de antibiótico por mililitro de ágar MH, suplementado com 4% de NaCl. As placas de Petri foram divididas em quatro partes iguais e sobre cada linha foi possível a inoculação de uma suspensão, ou seja, para cada placa foi possível a inoculação de quatro suspensões bacterianas distintas, semeadas com o auxílio da alça de platina. Após 24 horas de incubação a 37°C a resistência das cepas bacterianas ao antibiótico foi avaliada, onde qualquer colônia crescida na superfície do meio de cultura foi considerada resistente (KOHNER et al., 1999). As cepas padrão de *S. aureus* sensível (ATCC 25923) e resistente à oxacilina (ATCC 29213) foram utilizadas como controle dos testes.

4.7.4. Determinação da CIM para oxacilina através da Técnica da Microdiluição em Caldo

O método da microdiluição em caldo permitiu a avaliação da menor concentração de oxacilina capaz de impedir o crescimento bacteriano. Para isso, a solução estoque de oxacilina (1,0mg/mL) foi diluída a diferentes concentrações que variaram de 0,25µg/mL; 0,5µg/mL; 1,0µg/mL; 2,0µg/mL; 4,0µg/mL até 8,0µg/mL em caldo MH suplementado com 2% de NaCl. As suspensões bacterianas crescidas por 24hs a 37°C em caldo BHI, foram diluídas até 10^{-3} em caldo MH, a fim de obter-se uma quantidade final de, aproximadamente, 10^6 UFC/mL. Para cada amostra, 0,1 mL de suspensão bacteriana foi adicionada a 0,9 mL de caldo MH contendo as concentrações distintas do antibiótico e incubadas a 37°C por 24 horas. O resultado foi obtido através do grau de turvação observado nos tubos. Qualquer indício de turvação foi considerado crescimento bacteriano, portanto resistente à concentração da droga presente no caldo MH. Logo, o valor da concentração do caldo anterior ao primeiro que apresentou turvação, foi considerado como sendo a concentração inibitória mínima da oxacilina (KOHNER et al., 1999). As cepas padrão de *S. aureus* sensível (ATCC 25923) e resistente à oxacilina (ATCC 29213) foram utilizadas como controle dos testes. Isolados que cresceram em caldos contendo valores de CIM maior ou igual a 4,0µg/mL foram considerados resistentes.

4.7.5. Determinação da CIM para oxacilina através da Técnica de Diluição em Ágar

A determinação da CIM para oxacilina pelo método de diluição em ágar seguiu os mesmos critérios descritos para a metodologia realizada para avaliação da azitromicina. O desenvolvimento desta técnica se fez através uma concentração inicial de

1mg/ml de oxacilina que foi diluída em ágar MH às concentrações de 0,25µg/mL; 0,5µg/mL; 1,0µg/mL; 2,0µg/mL; 4,0µg/mL até 8,0µg/mL. O resultado foi obtido pela avaliação do crescimento de colônias que indicou resistência à concentração e a CIM foi considerada como a primeira concentração de oxacilina que não apresentou crescimento. Como controle positivo foi utilizado ágar MH sem antibiótico (MANN; MARKHMAN, 1998). Isolados que cresceram em ágar contendo valores de CIM maior ou igual a 4,0µg/mL foram considerados resistentes. As cepas padrão de *S. aureus* sensível (ATCC 25923) e resistente à oxacilina (ATCC 29213) foram utilizadas como controle dos testes.

4.8. Teste de suscetibilidade à cefoxitina

A suspensão bacteriana (0,1mL), realizada segundo protocolo apresentado em item anterior, foi distribuída por toda a superfície das placas contendo ágar MH (Merck) com o auxílio da alça de Drigalski. O disco de cefoxitina (30 µg) foi depositado sobre a superfície do meio de cultura, já contendo o inóculo. Após incubação por 24 horas a 37°C, os diâmetros formados na zona de inibição ao redor do depósito dos fármacos, foram observados e medidos, em milímetros (KOHNER et al., 1999). Diâmetro acima de 21 mm indicou sensibilidade ao antibiótico. As cepas padrão de *S. aureus* sensível (ATCC 25923) e resistente à oxacilina (ATCC 29213) foram utilizadas como controle dos testes.

4.9. Testes de detecção da produção de β-lactamases em *Staphylococcus* spp.

4.9.1. Teste de fita para detecção da produção de β-lactamases

É um teste cromogênico que detecta a capacidade da β-lactamase hidrolisar o anel β-lactâmico através de uma cefalosporina cromogênica, ocorrendo uma mudança de cor quando houver ruptura do anel β-lactâmico (REIS et al., 2001). A metodologia foi realizada segundo as recomendações técnicas do fabricante, na qual um fragmento de cada colônia foi colocado na superfície da fita e a coloração branca indicou prova positiva e consequente produção de β-lactamase (Probac do Brasil). A cepa padrão de *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923) foi utilizada como controle do teste.

4.9.2. Teste de nitrocefina para detecção da produção de β-lactamases

É um teste cromogênico que detecta a produção da β-lactamase, ocorrendo uma mudança de cor quando houver ruptura do anel β-lactâmico. Este método é recomendado pelo CLSI (2009) para confirmação de microrganismos portadores de enzimas β-lactamase. A metodologia foi realizada segundo as recomendações técnicas do fabricante (Sigma®), na qual fragmentos de várias colônias isoladas são colocados na superfície de um disco previamente umedecido com água destilada e a coloração rosa indicou prova positiva e consequente produção de β-lactamase. A cepa padrão de *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923) foi utilizada como controle do teste.

4.10. Detecção Fenotípica dos Fatores de Virulência em *Staphylococcus* spp. isolados de infecções em animais de companhia

4.10.1. Produção de “slime” em microplaca

Os isolados foram semeados em ágar AS por 24hs a 37°C e as colônias foram diluídas até 10⁻³ em caldo MH, a fim de obter-se uma quantidade final de,

aproximadamente, 10^6 UFC/mL e posteriormente inoculadas em microplacas de 96 poços contendo caldo tripticase soja (Britania) a 0,24% de glicose, e novamente incubadas sem agitação para permitir a sedimentação. Após descarte do caldo vertendo-se a microplaca, os poços foram lavados com água destilada e corados com fucsina em temperatura ambiente. A produção de “slime” foi observada visualmente como uma película aderida à parede do fundo (CHRISTENSEN et al., 1985). Os resultados foram avaliados segundo escala: ausente (-), fraco (+), moderado (++) e forte (+++). A cepa padrão de *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923) foi utilizada como controle do teste.

4.10.2. Produção de “slime” em ágar Vermelho Congo

As placas de ágar Vermelho Congo foram preparadas através da adição de 0,8g de Vermelho Congo e 36g de sacarose (Sigma) a cada 1L de caldo BHI (Britania). Todos os isolados foram semeados na superfície do ágar e após 24hs a 37°C a coloração das colônias foi avaliada. Os isolados que produziram colônias coradas em preto intenso foram consideradas produtoras de “slime” enquanto que colônias vermelhas foram classificadas como não produtoras (ARCIOLA et al., 2001). A cepa padrão de *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923) foi utilizada como controle do teste.

4.10.3. Produção de Hemolisinas

Os isolados foram inoculados em placas de ágar sangue (5% de sangue de carneiro desfibrinado) e incubados a 37°C durante 24hs. A presença de zonas de hemólise parcial, total ou ambas rodeando as colônias indicou o tipo de hemolisina, neste caso, β -hemolisina, α -hemolisina ou ambas, respectivamente (DEVRIESE, 1984). Os isolados foram submetidos à refrigeração (4°C) por 24h para melhor observação das características hemolíticas. A cepa padrão de *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923) foi utilizada como controle do teste.

4.10.4. Sinergismo Hemolítico (SHA)

Os isolados foram semeados através de estrias radiais em AS para avaliação da produção de halos de hemólise após 24hs a 37°C.

O SHA foi avaliado através do inóculo de *S. aureus* produtor de beta hemolisina em AS e os isolados foram semeados próximos a este. Uma zona de hemólise total dentro da zona parcial de beta hemolisina foi considerada como SHA positivo (DEMO, 1996). A cepa padrão de *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923) foi utilizada como controle do teste.

4.11. Técnica de Reação em Cadeia de Polimerase (PCR) para a amplificação dos genes de resistência e virulência em *Staphylococcus* spp. isolados de infecções em animais de companhia

Todos os experimentos de amplificação dos genes foram realizados no Laboratório de Biologia Molecular situado no Departamento de Parasitologia e Sanidade Animal do Instituto de Veterinária, da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (UFRRJ).

4.11.1. Extração do DNA bacteriano

A parede celular de bactérias Gram positivas é formada por uma espessa camada de peptidoglicano que dificulta a extração do gene bacteriano (PRESCOTT et al., 1996), fazendo-se necessária a utilização de enzimas específicas. Porém novos protocolos de

extração vêm sendo propostos no intuito de simplificar, otimizar e diminuir os custos da técnica de PCR.

No presente trabalho foram desenvolvidos os protocolos de extração segundo Pacheco e colaboradores (1997) e Coelho e colaboradores (2007), protocolos que aplicavam métodos de fervura e proteinases, respectivamente, porém em ambas as técnicas não foram obtidas quantidade e qualidade de DNA adequadas. Portanto foi realizada a extração do DNA segundo protocolo de Senna e colaboradores (2002) onde cada colônia crescida em ágar Trypticaseína de Soja (Merck®) foi repicada em 10 mL de caldo BHI (Britania®). Após 12hs a 37°C, uma alíquota de 1,0 mL do caldo contendo o inóculo foi transferida para microtubos que foram centrifugados a 12.000 rpm por 2 min. Após três lavagens com tampão TE (10mM Tris-HCl e 1mM EDTA – pH 8.0) foram adicionadas 4U de lisostafina (Sigma®) a 100µl de TE contendo o precipitado. Após incubação à 37°C por 30 minutos, os microtubos foram levados ao banho-maria a 100°C por 10 minutos, e após a centrifugação, o sobrenadante foi descartado e o precipitado ressuspensionado em 500 µl de tampão (SENNA et al., 2002).

4.11.2. Amplificação dos genes através da técnica de PCR

As concentrações utilizadas em todas as reações de PCR foram Tampão 10X (10 mM TrisHCl, pH 9.0; 50 mM KCl, and 0.1% Triton X-100), 1,25 mM de ClMg₂, 1mM de cada iniciador (Bioneer- Seul®, Coréia do Sul), 0,2 mM de dNTP (Fermentas-Burlington, Canadá) e 2 U de TAQ polimerase (Fermentas- Burlington, Canadá) em um volume total de reação de 20µl contendo 5µl do DNA extraído (SAMBROOK et al., 2002).

Os amplicons foram avaliados por eletroforese em gel de agarose, seguido por coloração em brometo de etídeo (0,5 mg/mL), visualizado em transiluminador ultravioleta e documentados pelo programa QuantiOne (BioRad), utilizando marcadores de peso molecular de 100 pb (Fermentas®) e 50 pb (Fermentas®).

4.11.2.1. Genes de identificação das espécies de *Staphylococcus* spp. coagulase-positivos

Todos os isolados foram submetidos à técnica de PCR para identificação genotípica das espécies *S. aureus* (DNAr) (STRAUB et al., 1999), *S. intermedius* (nuc 3 e 4) e *S. hyicus* (nuc 1 e 2) (SILVA et al., 2003), independente dos resultados obtidos através das provas fenotípicas anteriormente realizadas (Quadro 1).

Quadro 1. Iniciadores e ciclos empregados para amplificação dos genes de identificação das espécies de *Staphylococcus* spp. coagulase-positivos.

Gene (fragmento)	Espécies	Iniciadores (5' - 3')	Ciclos*
DNAr (930 pb)	<i>S. aureus</i>	ACG GAG TTA CAA AGG ACG AC AGC TCA GCC TTA ACG AGT AC	1
<i>nuc3</i> e 4 (431pb)	<i>S. intermedius</i>	GCC CCT GCA ATG AGA GG CGG ACC ACT TTC CGT C	2
<i>nuc1</i> e 2 (330 pb)	<i>S. hyicus</i>	CGC CGT TCT CTC TTT GG CGC CTC TCA CAT CCG	2

*1. (94°C 40s., 64°C 1 min., 72°C 1 min 12s.) x 30 ; 2. (95°C 50s., 42°C 2 min., 72°C 4 min) x 40 e 72°C 1 m

4.11.2.2. Genes de resistência à macrolídeos de *Staphylococcus* spp.

Foi realizada a técnica de PCR para amplificação dos genes *ermA*, *ermB*, *ermC* e *mefA* (SUTCLIFFE et al., 1996) em todos os *Staphylococcus* spp. isolados de processos infecciosos de animais de companhia (Quadro 2).

Quadro 2. Iniciadores e ciclos empregados para amplificação dos genes de resistência à macrolídeos de *Staphylococcus* spp.

Gene (fragmento)	Iniciadores (5' - 3')	Ciclos
<i>ermA</i> (421pb)	GTT CAA GAA CAA TCA ATA CAG AG GGA TCA GGA AAA GGA CAT TTT AC	1
<i>ermB</i> (639pb)	GAA AAG GTA CTC AAC CAA ATA AGT AAC GGT ACT TAA ATT GTT TAC	1
<i>ermC</i> (572pb)	GCT AAT ATT GTT TAA ATC GTC AAT TCC GGA TCA GGA AAA GGA CAT TTT TAC	1
<i>mefA</i> (348pb)	AGT ATC ATT AAT CAC TAG TGC TTC TTC TGG TAC AAA AGT GG	1

*1. 95°C 5min. (95°C 30s, 54°C 30s, 72°C 1 min) x 35 e 72°C 5min.

4.11.2.3. Genes de resistência à oxacilina de *Staphylococcus* spp.

Foi realizada a técnica de PCR para amplificação dos genes *mecA* (COELHO et al., 2007), *mecI(A)*, *mecI(B)*, *mecR1* (ROSATO et al., 2003) e *femA* (ZOCHE et al., 2006) em todos os *Staphylococcus* spp. isolados no presente estudo (Quadro 3).

Quadro 3. Iniciadores e ciclos empregados para a amplificação dos genes do sistema *mec* de *Staphylococcus* spp.

Gene (fragmento)	Iniciadores (5' - 3')	Ciclos*
<i>mecA</i> (513pb)	AAA ATC GAT GGT AAA GGT TGG C AGT TCT GCA GTA CCG GAT TTG C	1
<i>mecIA</i> (639pb)	CCG GAA TTC GCA TAT GAT GGT TCG TAG GTT	1
<i>mecIB</i> (348pb)	CGG AAT TCG ACT TGA CGG ATC CGA AAT GGA	2
<i>mecRI</i> (234pb)	CCA AAC CCG ACA ACT AC CGT GTC AGA TAC ATT TCG	2
<i>femA</i> (132)	AAA AAA GCA CAT AAC AAG CG GAT AAA GAA GAA ACC AGC AG	3

*1. (94°C 30s, 55°C 30s, 72°C 1 min) x 40 e 72°C 5min. 2. (95°C 1min, 55°C 1 min, 72°C 2 min) x 30. 3. 95°C 5min (95°C 1min, 45°C 1min, 72°C 1min) x 37 e 72°C 105min.

4.11.2.4. Genes de relacionados à produção de β -lactamases de *Staphylococcus* spp.

Foi realizada a técnica de PCR para a amplificação dos genes do sistema *bla* que regulam a produção de β -lactamases em *Staphylococcus* spp. (ROSATO et al., 2003) (Quadro 4).

Quadro 4. Iniciadores e ciclos empregados para amplificação dos genes *bla* de *Staphylococcus* spp.

Gene (fragmento)	Iniciadores (5' - 3')	Ciclos
<i>blaIA</i> (513pb)	CCC AAT GGG TGT TTT AAT GGT TAT TTT CTG	1
<i>blaIB</i> (513pb)	ATG TCT CGC AAT TCT TCA A CTA TGG CTG AAT GGG AT	1
<i>blaZA</i> (639pb)	TAC AAC TGT AAT ATC GGA GG CAT TAC ACT CTT GGC GGT TT	1
<i>blaZB</i> (737pb)	TCT ATC TCA ATG ACA TAT AG GAG GCT TCA ATG ACA TAT AG	1
<i>BlaRI</i> (209pb)	GGT ATC TAA CTC TTC TTG C CAT CTG ATA GTG TAG C	1

*1. 94°C 5min. (94°C 30s, 55°C 30s, 72°C 30s) x 35 e 72°C 5min.

4.11.2.5. Genes de virulência de *Staphylococcus* spp.

Foi realizada a técnica de PCR simples para a amplificação dos genes envolvidos na produção de “slime”, *icaA* e *icaD* (VASUDEVAN et al., 2003) e PCR multiplex para os genes de produção de hemolisinas, *hla* e *hly* (NILSSON et al.,1999) em todos os *Staphylococcus* spp. coagulase-positivos (Quadro 5).

Quadro 5. Iniciadores e ciclos empregados para amplificação dos genes de virulência de *Staphylococcus* spp..

Gene (fragmento)	Iniciadores (5' - 3')	Ciclos*
<i>hla</i> (210pb)	CTG ATT ACT ATC CAA GAA ATT CGA TTG CTT TCC AGC CTA CTT TTT TAT CAG T	1
<i>hly</i> (300pb)	GTG CAC TTA CTG ACA ATA GTG C GTT GAT GAG TAG CTA CCT TCA GT	1
<i>icaA</i> (1315pb)	CCT AAC TAA CGA AAG GTA G AAG ATA TAG CGA TAA GTG C	2
<i>icaD</i> (381pb)	AAA CGT AAG AGA GGT GG GGC AAT ATG ATC AAG ATA C	2

*1. 94°C 5min. (94°C 1min, 50°C 1 min., 72°C 1 min) x 30 e 72°C 7min ; 2. (92°C 45s, 49°C 45s., 72°C 1 min) x 30 e 72°C 7min.

4.11.2.6. Genes de virulência com padrão polimórfico de *Staphylococcus* spp.

Foi realizada a técnica de PCR para a amplificação do gene de coagulase, *coa* (KARAHAN; CETINKAYA, 2006), de proteína A, *spaA* (REINOSO, 2004) e de regulação de exoproteínas, *agr* (RNA III) (REINOSO, 2004) (Quadro 6).

Quadro 6. Iniciadores e ciclos empregados para amplificação dos genes de virulência de *Staphylococcus* spp. coagulase-positivos

Gene (fragmento)	Iniciadores (5' - 3')	Ciclos*
<i>agr</i> (v**)	CAT AGC ACT GAG TCC AAG GA CAA TCG GTG ACT TAG TAA AAT G	1
<i>spaA</i> (v)	CAA GCA CCA AAA GAG GAA GGC TTG TTG TTG TCT TCC TC	2
<i>coa</i> (v)	ATA GAG ATG CTG GTA CAG G GCT TCC GAT TGT TCG ATG C	3

*1. 94°C 3min. (94°C 1min, 55°C 1 min., 72°C 1 min) x 30 e 72°C 5min; 2. 94°C 4min. (94°C 1min, 60°C 1 min., 72°C 1 min) x 30 e 72°C 5min; 3. 94°C 4min. (94°C 1min, 60°C 1 min., 72°C 1 min) x 30 e 72°C 5min.

4.12. Análise estatística

Os perfis de suscetibilidade aos fármacos testados foram expressos em porcentagens que foram analisadas de forma descritiva. O programa Excel (Microsoft®) foi utilizado para confecção dos gráficos com os percentuais dos isolados identificados em diferentes sítios infecciosos e para os gráficos com percentuais de suscetibilidade antimicrobiana.

Para a determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) para azitromicina, os resultados obtidos a partir das técnicas de microdiluição em caldo e ágar, foram submetidos a regressão simples utilizando o modelo cúbico, conforme Pinheiro e colaboradores (2009), utilizando-se o software SPSS (2008), constituído de 4 parâmetros sendo: $F(x) = a + bx + cx^2 + dx^3$. Os coeficientes de sensibilidade gerados foram submetidos a análise de comparação entre proporção estimada e a proporção preestabelecida para a determinação do coeficiente normal padrão (z) segundo Garber (2001), constituído da seguinte equação: $z = \frac{p_1 - p}{\sqrt{p_1(1-p_1)/n}}$. O programa Excel (Microsoft®) foi utilizado para o cálculo da distribuição normal padrão para determinação do intervalo de confiança considerando $p \geq 0,05$, aplicado para determinar a CIM de *Staphylococcus* spp.

Os percentuais de sensibilidade, especificidade, valores preditivos positivos (VPP) e negativos (VPN) dos testes fenotípicos de suscetibilidade à oxacilina foram calculados considerando a presença do gene *mecA* como predição para a resistência à oxacilina, seguindo as fórmulas abaixo:

% Sensibilidade = verdadeiros positivos / (verdadeiros positivos + falsos negativos)

% Especificidade = verdadeiros negativos / (verdadeiros negativos + falsos positivos)

% VPP = verdadeiros positivos / (verdadeiros positivos + falsos positivos)

% VPN = verdadeiros negativos / (verdadeiros negativos + falsos negativos)

A associação entre os testes fenotípicos e genotípicos foi avaliada através do Teste de Qui-quadrado (X^2) e Fisher, com intervalo de confiança de 95% (IC=95%).

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Identificação das Espécies

Do total de 225 espécimes analisados foi possível obter crescimento de colônias bacterianas típicas em 88,9 % (200/225), os demais não apresentaram qualquer tipo de crescimento microbiano (20/225) e em três espécimes clínicos (1,3%, 3/225) foi obtido o isolamento de leveduras (Tabela 01). Dentre os espécimes que apresentaram crescimento bacteriano, os cocos Gram-positivos foram prevalentes em 56,35% (111/197) dos espécimes avaliados. Os Bastonetes Gram-negativos que foram prevalentes em 32,49% (64/197) dos espécimes avaliados. Também foi possível obter o isolamento de Bastonetes Gram-positivos não-esporulados em 6,59% (13/197) e Bastonetes Gram-positivos esporulados do gênero *Bacillus* spp. em 4,57% (9/197) dos espécimes avaliados (Figura 7).

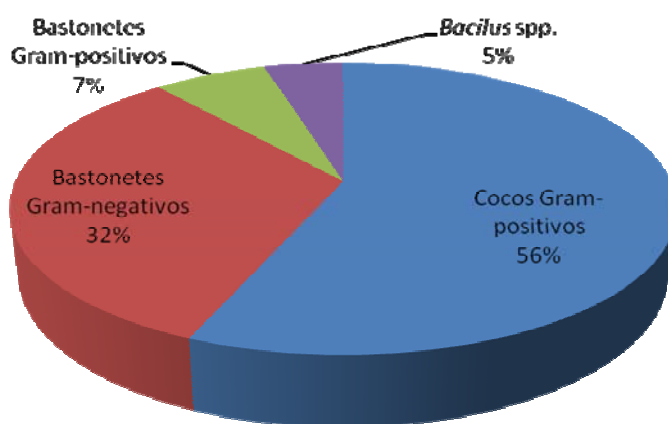


Figura 7. Gráfico apresentando o percentual de isolados bacterianos obtidos a partir das técnicas de isolamento e identificação bacteriológica dos 220 espécimes provenientes de infecções em animais de companhia.

Dentre os Cocos Gram-positivos, o gênero *Staphylococcus* spp. foi prevalente em 90,1% (100/111) dos isolados bacterianos investigados, seguido pelo gênero *Micrococcus* spp. 9% (10/111) e por *Streptococcus* spp. em 1% (1/111). Os Bastonetes Gram-negativos foram representados pelo gênero *Pseudomonas* spp. (17,2%, 11/64) e por diferentes espécies de Enterobacteriaceae (82,8%, 53/64). Os Bastonetes Gram-positivos não-esporulados foram representados pelo gênero *Corynebacterium* spp. (53,8%, 7/13) e *Listeria* spp. (46,2%, 6/13). Os Bastonetes Gram-positivos esporulados corresponderam ao gênero *Bacillus* spp. (100%, 9/9), os quais foram associados a outros agentes, ou foram considerados contaminantes. A Tabela 1 apresenta o percentual de isolados bacterianos obtido nos respectivos sítios infecciosos investigados.

Tabela 1. Percentual de isolados bacterianos obtidos nos respectivos sítios infecciosos investigados.

	Otite	Pele	ITU	ITR	IUC	IMO	IMOC	ITGI	ITOS	
Total de Isolados	72	46	37	5	12	7	9	4	4	200
<i>S. intermedius</i>	13	11	5	-	1	1	2	-	2	35
<i>S. aureus</i> spp. <i>aureus</i>	11	6	1	-	2	1	3	-	-	24
<i>S. hyicus</i>	11	1	1	-	-	-	-	-	-	13
<i>S. aureus</i> spp. <i>anaerobius</i>	-	-	-	-	1	-	-	-	-	1
<i>S. schleiferi</i> spp. <i>coagulans</i>	2	4	-	-	-	-	-	-	-	6
SCP	1	4	3	-	1	-	-	-	-	9
<i>S. xylosus</i>	4	2	-	-	-	1	-	-	-	7
<i>S. hominis</i>	-	2	-	-	1	-	-	-	-	3
<i>S. epidermidis</i>	-	-	-	2	-	-	-	-	-	2
<i>Micrococcus</i> spp.	7	3	-	-	-	-	-	-	-	10
<i>Streptococcus</i> spp.	-	-	-	-	-	1	-	-	-	1
<i>Corynebacterium</i> spp.	1	1	1	1	2	1	-	-	-	7
<i>Listeria</i> spp.	1	-	1	2	-	1	2	-	-	6
<i>Bacillus</i> spp.	-	-	3	-	-	-	-	-	-	9
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	7	1	-	-	1	-	1	-	1	11
<i>E. coli</i>	3	2	7	-	-	-	-	2	-	14
<i>P. mirabilis</i>	3	2	4	-	-	1	-	-	1	11
<i>P. vulgaris</i>	-	1	-	-	-	-	-	-	-	1
<i>S. marcescens</i>	3	3	1	-	1	-	-	-	-	8
<i>S. liquefaciens</i>	-	-	-	-	-	-	1	-	-	1
<i>C. freundii</i>	-	1	3	-	1	-	-	1	-	6
<i>Y. enterocolitica</i>	-	1	2	-	-	-	-	-	-	3
<i>Salmonella</i> spp.	-	-	1	-	-	-	-	1	-	2
<i>Hafnia alvei</i>	1	-	1	-	-	-	-	-	-	2
<i>Enterobacter</i> spp.	2	1	1	-	1	-	-	-	-	4
<i>Edwardsiella tarda</i>	-	-	1	-	-	-	-	-	-	1
levedura	2	-	1	-	-	-	-	-	-	3

*ITU: infecções do Trato Urinário; ITR: infecções do Trato Respiratório; IUC: infecções Uterinas de Cadelas; IMO: infecções da Mucosa Oral; IMOC: infecções da Mucosa Ocular; ITGI: Infecções do Trato Gastro-intestinal; ITOS: infecções do Tecido Ósseo.

5.1.1. Otite externa canina

Os espécimes clínicos que foram obtidos a partir de casos de otite externa foram prevalentes dentre todos os tipos de espécimes clínicos recebidos, perfazendo um total de 29,3% (66/225) dos espécimes avaliados, superando o percentual apontado por Leite (2000) afirmou que os casos de otite externa correspondem a 15% dos casos de atendimento na clínica médica veterinária.

Em 63,7% (42/66) dos espécimes clínicos provenientes de casos de otite externa foi possível determinar infecções do tipo monomicrobianas e em 19,7% (13/66) dos espécimes foi possível detectar infecções do tipo polimicrobianas. Os diferentes agentes etiológicos envolvidos nas infecções polimicrobianas devem ser criteriosamente avaliados por testes de suscetibilidade antimicrobiana a fim de permitir a indicação terapêutica mais efetiva. Muller e colaboradores (1995) encontraram infecções polimicrobianas em 30% dos casos de otite avaliados, e semelhantemente, Oliveira e colaboradores (2005) detectaram 50,5% de infecções monomicrobianas e 49,5% polimicrobianas em 305 amostras de cães com otite externa.

O presente estudo detectou cultura bacteriológica negativa em 16,7% (11/66) dos espécimes de otite externa avaliados.

Um total de 70 isolados bacterianos foi obtido a partir do isolamento de 66 espécimes de cães com otite externa. Foi possível obter o isolamento de leveduras do gênero *Malassezia* spp. em dois espécimes avaliados. Dentre o percentual de isolados bacterianos obtido, espécies de *Staphylococcus* coagulase-positivos (SCP) correspondeu a 54,3% (38/70), seguidas por *Micrococcus* spp. a 10% (7/70) e *Staphylococcus* spp. coagulase-negativos (SCN) a 5,7% (4/70). Foram obtidos 19 isolados de Bastonetes Gram-negativos (27,1%) dos quais, 17,1% (12/70) corresponderam ao grupo das enterobactérias e 10% (7/70) a *Pseudomonas* spp.. Além disso, foram isolados Bastonetes Gram-positivos do gênero *Corynebacterium* spp. (1,4%, 1/70) e *Listeria* spp. (1,4%, 1/70) (Figura 8).

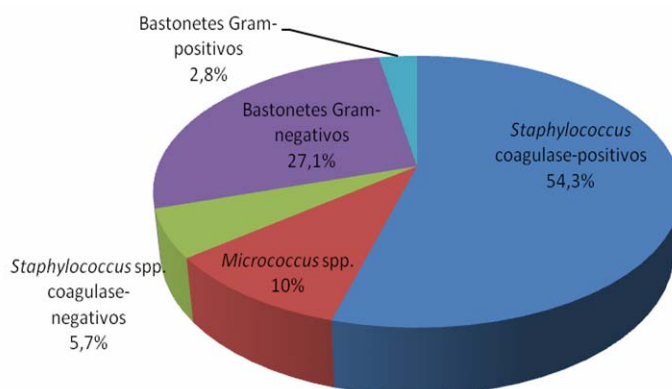


Figura 8. Gráfico apresentando o percentual de isolados bacterianos obtidos a partir das técnicas de isolamento e identificação bacteriológica dos 66 espécimes provenientes de otite externa canina.

A espécie *Staphylococcus intermedius* foi prevalente em 18,3% (13/70) dos SCP avaliados, seguidos *S. aureus* subsp. *aureus* que correspondeu a 15,7% (11/70) e *S. schleiferi* subsp. *coagulans* a 2,9% (2/70). A espécie, *S. hyicus* foi prevalente em 15,7% (11/70) dos espécimes avaliados e só pôde ser identificada a partir da detecção de genes específicos (*nuc 1* e *2*), uma vez que bioquimicamente esta espécie apresenta atividade de enzima coagulase variável. Os resultados do presente estudo corroboram com Hariharan e colaboradores (2006) que, num amplo estudo ao longo de cinco anos, avaliaram a microbiota de 1819 cães e gatos com otite externa e detectaram SCP em 36,3% das amostras, sendo *S. intermedius* a espécie prevalente. Os testes de identificação bioquímica realizados no presente estudo identificaram SCN em 5,7% (4/70) dos espécimes, sendo *S. xylosus* a espécie prevalente. Estes resultados corroboram com os de Oliveira e colaboradores (2006) que ao avaliarem 30 cães com otite média no estado do Ceará, isolaram *S. xylosus* em 6,7% das amostras.

Um total de 12 isolados foi identificado como sendo enterobactérias, dentre estes, *Serratia marcescens*, *Proteus mirabilis* e *Escherichia coli* corresponderam a 4,3% (3/70) e *Hafnia alvei* a (1/70) dos isolados, respectivamente. Dos sete (10%) bastonetes Gram-negativos não-fermentadores isolados, todos foram identificados como *Pseudomonas aeruginosa*. Hariharan e colaboradores (2006) também relataram o isolamento de *P. mirabilis* (9,6%), *E. coli* (9,8%) e *P. aeruginosa* (17,5%). Nobre e colaboradores (2001) ao analisarem a microbiota de 78 cães otópatas e 36 sadios, isolaram *P. aeruginosa* em 10,3% das amostras.

5.1.2. Infecções de pele

Um total de 61,9% (26/42) dos espécimes provenientes de infecções da pele de animais de companhia foi do tipo monomicrobianas, 33,3% (14/42) foram infecções polimicrobianas e duas (4,8%) apresentaram cultura bacteriológica negativa.

Foram obtidos 46 isolados bacterianos, dos quais os cocos Gram-positivos foram prevalentes. A espécie de SCP, *Staphylococcus intermedius* foi prevalente em 23,9% (11/46), seguida por *S. aureus* spp. *aureus* (13%, 6/46). Apenas um isolado (2,2%) foi identificado como sendo a espécie *S. hyicus* e quatro (8,7%, 4/46) espécies coagulase-positivas não foram diferenciadas através da amplificação de genes específicos. Das espécies de SCN, duas (4,3%) corresponderam a *S. xylosus* e outras duas (4,3%) a *S. hominis*.

Foram obtidos 12 (26,1%) isolados de Bastonetes Gram-negativos dos quais, 23,9% (11/46) corresponderam ao grupo das enterobactérias e 2,2% (1/46) a *Pseudomonas aeruginosa*. As espécies de enterobactérias isoladas no presente estudo, corresponderam a *Serratia marcescens* (3/46), *Proteus mirabilis* (2/46), *Escherichia coli* (2/46), *P. vulgaris* (1/46), *Citrobacter freundii* (1/46) e *Yersinia enterocolitica* (1/46). Dentre os Bastonetes Gram-positivos, *Corynebacterium* spp. correspondeu a 2,2% (1/46) dos isolados (Figura 9). Segundo Scott e colaboradores (2001) os microrganismos transitórios da pele do cão incluem *E. coli*, *P. mirabilis*, *Serratia* spp., *Pseudomonas* spp., *Bacillus* spp. e *Corynebacterium* spp..

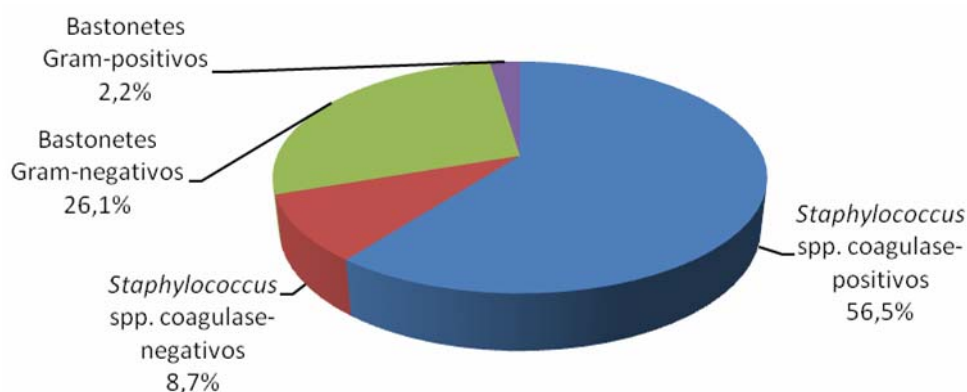


Figura 9. Gráfico apresentando o percentual de isolados bacterianos obtidos a partir dos 42 espécimes provenientes de infecções de pele de animais de companhia.

5.1.3. Infecções do trato urinário

Foram obtidos 36 isolados bacterianos a partir dos espécimes de 34 cães e 15 gatos com sinais clínicos de distúrbio do trato urinário inferior. Foi possível obter o isolamento de uma levedura do gênero *Candida* spp.. Foram avaliados 49 espécimes dentre estes, a cultura bacteriológica foi positiva em 59,2% (29/49), tendo sido observado infecções do tipo monomicrobiana em 89,6% (26/49) dos espécimes e infecções do tipo polimicrobiana em 6,1% (3/49) dos espécimes. Um total de 40,2% (20/49) dos espécimes apresentou cultura bacteriológica negativa.

Dentre os isolados bacterianos identificados bioquimicamente, diferentes espécies de Enterobacteriaceae foram prevalentes em 58,3 % (21/36) dos isolados avaliados. Foi possível também detectar o isolamento de cocos gram-positivos do gênero *Staphylococcus* spp. e Bastonetes Gram-positivos (Figura 10).

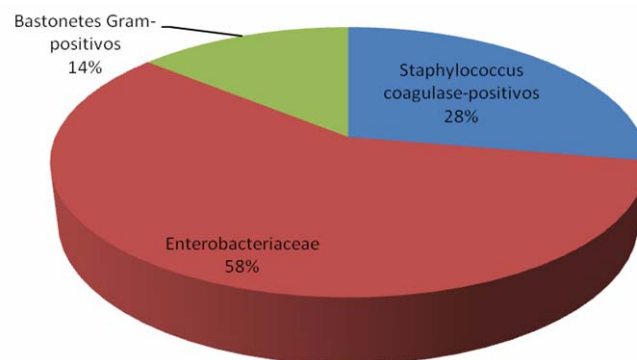


Figura 10. Gráfico apresentando o percentual de isolados bacterianos obtidos a partir dos 49 espécimes provenientes de infecções do trato urinário inferior de animais de companhia.

Dentre as espécies de Enterobacteriaceae, *Escherichia coli* foi prevalente em 19,4% (7/36) dos isolados, seguida por *Proteus mirabilis* em 11,1% (4/36), *Citrobacter freundii* em 8,3% (3/36), *Yersinia enterocolitica* em 5,6% (2/36) enquanto, *Salmonella* spp., *Serratia marcescens*, *Hafnia alvei*, *Enterobacter* spp. e *Edwardsiella tarda* corresponderam a 2,8% (1/36) dos isolados, respectivamente.

Os *Staphylococcus* spp. coagulase-positivos corresponderam a 27,8% (10/36) dos isolados sendo representados pelas espécies, *Staphylococcus intermedius* (5/36), *S. aureus* spp. *aureus* (1/36) e *S. hyicus* (1/36) e três espécies coagulase-positivas (3/36) que não foram diferenciadas através de técnicas moleculares. Os Bastonetes Gram-positivos corresponderam a 13,9% (5/36) representados pelos Bastonetes Gram-positivos não-esporulados, *Corynebacterium* spp. e *Listeria* spp. (2,8%, 1/36), e o gênero de Bastonete Gram-positivo esporulado, *Bacillus* spp. (8,3%, 3/36) dos isolados.

Os resultados apresentados corroboram com Çetin e colaboradores (2003) que examinaram espécimes de urina de 100 cães com infecção do trato urinário inferior e reportaram uma prevalência de crescimento bacteriano em 38% das amostras. Esse estudo relatou que dentre 51 isolados bacterianos, a espécie prevalente foi *Escherichia coli* (23,5%), segundo o autor essa espécie constitui a causa mais comum de doença do trato urinário de cães. O autor também relatou o isolamento de outras espécies de enterobactérias, tais como, *Klebsiella pneumoniae* (7,8%), *P. vulgaris* (5,9%), *C. freundii* (3,9%), *Enterobacter agglomerans* (3,9%), Bastonetes não-fermentadores como, *P. aeruginosa* (3,92%), além de espécies de *Staphylococcus* (9,8%), *Micrococcus* (11,8%), *Streptococcus* (15,7%), *Corynebacterium* (9,8%) e *Acinetobacter* (3,9%). Outro estudo que avaliou 8.354 amostras de urina durante o período de 1969 até 1995 relatou uma prevalência de crescimento bacteriano em 96,3% dos espécimes, dentre esses foram isolados, *E. coli* em 44,1% dos isolados, *Staphylococcus* spp. em 11,6%, *Proteus* spp. em 9,3%, *Klebsiella* spp. em 9,1%, *Enterococcus* spp. 8,0% e *Streptococcus* spp. em 5,4% (LING et al., 2001).

5.1.4. Infecções do trato reprodutivo de cadelas

Foram obtidos 12 isolados bacterianos de oito cadelas com piometra e secreção vaginal. Destes foram observadas infecções polimicrobianas em três (50%) dos oito espécimes coletados e nos outros cinco casos foi detectado apenas um agente. Enterobactérias foram detectadas em 33,3% (4/12) e *Pseudomonas aeruginosa* em 8,3% (1/12) dos isolados. Dentre as espécies de SCP o percentual detectado foi de 33,3% (5/12) dos isolados, representados pelas espécies *Staphylococcus intermedius* (1/12), *S. aureus* (3/12) e uma espécie coagulase-positiva que não foi diferenciada através da amplificação de genes específicos. Dentre os SCN, a espécie prevalente em 8,3% (1/12)

dos isolados foi representada por *S. hominis*. Os Bastonetes Gram-positivos foram detectados em 16,7% (2/12) dos isolados, sendo representados pelo gênero *Corynebacterium* spp..

Esses resultados apontam para importância da determinação da microbiota uterina tanto de animais saudáveis quanto doentes, uma vez que bactérias oportunistas podem tornar-se potencialmente patogênicas em condições favoráveis tais como, estimulação hormonal, trauma pós-parto, migração de bactérias da vagina ou contaminação por fezes. Mishelia e colaboradores (2001) examinaram a microbiota uterina de 41 cadelas saudáveis em diferentes fases do ciclo estral e detectaram 44 isolados bacterianos que corresponderam a *Staphylococcus* spp. (70,5%), *Corynebacterium* spp. (70,5%), *Proteus* spp. (13,6%) e *Klebsiella* spp. (15,9%) e *Streptococcus* spp. (15,9%). O diagnóstico da piometra é baseado em achados radiográficos e ultrassonográficos e a indicação terapêutica frequentemente é cirúrgica. Durante o atendimento clínico veterinário, a rotina ginecológica é baseada apenas no exame físico dos animais e detecção de secreção vaginal e processos inflamatórios, outros exames são indicados somente nos casos onde existe um interesse no potencial reprodutivo da fêmea ou para inseminação artificial. Exames colpocitopatológicos e coleta de amostras para a identificação dos agentes etiológicos poderiam ser medidas auxiliares ao tratamento e prevenção dessa doença.

5.1.5. Infecções da mucosa oral

Dos espécimes coletados da cavidade oral de 12 cães com doença periodontal foram obtidos sete isolados bacterianos. Foram identificados os seguintes agentes: *Corynebacterium* spp., *Listeria* spp., *Staphylococcus intermedius*, *S. xylosus*, *Streptococcus* spp. β -hemolíticos e *Proteus mirabilis* correspondendo à 14,3% (1/7) dos isolados, respectivamente. O presente estudo não empregou metodologia de isolamento realizado para bactérias anaeróbias.

Alguns estudos relataram isolamento de bactérias aeróbias a partir de casos de doença periodontal. Braga e colaboradores (2005) analisaram a microbiota de 12 cães saudáveis e 17 com doença periodontal e isolaram 236 espécies bacterianas aeróbias. Os autores relataram o isolamento de *S. intermedius* em 1,7% dos isolados, SCN em 12,3% e as espécies isoladas foram: *S. xylosus*, *S. saprophyticus*, *S. epidermidis*, *S. homini* e *S. saccharolyticus*. *Corynebacterium* spp. que corresponderam à 5,5% e *Streptococcus* β -hemolíticos à 2,5% dos isolados. Os autores isolaram diversos bastonetes Gram-negativos em 27,7% dos isolados e as espécies identificadas foram *E. coli*, *Klebsiella* spp. e *Proteus* spp..

5.1.6. Infecções do trato respiratório inferior

Todos os cinco espécimes coletados a partir de secreções nasais e punção bronquiolar de cães com pneumonia foram positivos na cultura bacteriológica obtendo-se um total de cinco isolados bacterianos. Em 80% (4/5) desses espécimes foram isolados Bastonetes Gram-positivos e em 20% (1/5) foi isolado *Staphylococcus epidermidis*. Dentre os Bastonetes Gram-positivos, *Corynebacterium* spp. e *Listeria* spp. foram isolados em 40% (2/5) dos espécimes respectivamente, os quais foram provenientes de animais que apresentaram efusão pleural opaca.

Um estudo que avaliou a microbiota nasal de 60 cães aparentemente normais foi identificado 106 isolados bacterianos dos quais, *S. epidermidis* correspondeu a 58,5% dos isolados e *C. xerosis* a 4,7% (AJUWAPE et al., 2006). O envolvimento dessas espécies como patógenos primários do trato respiratório é pouco relatado, uma vez que constituem a microbiota do trato respiratório, porém podem ser considerados agentes oportunistas em casos de perda da barreira de defesa orgânica, ou podem estar associados à contaminação ambiental.

5.1.7. Infecções da conjuntiva ocular

Foram obtidos nove isolados bacterianos a partir de 16 espécimes de cães com alterações patológicas da conjuntiva ocular. Dentre esses, 55,6% (5/9) dos isolados corresponderam à SCP, 22,2% (2/9) dos isolados corresponderam à Bastonetes Gram-positivos, e 22,2% (2/9) dos isolados corresponderam à Bastonetes Gram-negativos.

As espécies de *Staphylococcus* foram representadas por *S. intermedius* (2/8) e *S. aureus* subsp. *aureus* (3/8). Dentre as enterobactérias, foi obtido um isolado identificado como *Serratia liquefaciens* e um isolado correspondeu a *Pseudomonas aeruginosa*. Dentre os Bastonetes Gram-positivos, dois isolados (22,2%) corresponderam à *Listeria* spp..

Em estudo desenvolvido por Andrade e colaboradores (2002) que investigaram a microbiota conjuntival de 46 cães saudáveis, foi relatado o isolamento de *Staphylococcus aureus* em todos os isolados (n=20), *S. intermedius* e *S. epidermidis* em 10% dos isolados (n=2), *Bacillus* spp., *Enterobacter* spp., *Proteus* spp. em 5% dos isolados (n=1). Os autores apontaram para o potencial patogênico dessas espécies bacterianas diante da perda da integridade da mucosa, e para fato de que o uso prolongado de antimicrobianos tópicos pode destruir a microbiota saprófita e proporcionar o crescimento excessivo de bactérias patogênicas.

5.1.8. Infecções do trato gastrointestinal

Foi obtido um total de quatro isolados bacterianos dos 22 espécimes de fezes de cães que apresentaram processos diarreicos, muitos dos quais já apresentavam uso prévio de antibióticos ou apresentavam etiologia associada a distúrbio verminótico. Deste total foram identificadas apenas bactérias do grupo das enterobactérias que corresponderam às seguintes espécies bacterianas: *Escherichia coli* (2/4), *Citrobacter freundii* (1/4) e *Salmonella* spp.

5.1.9. Infecções do tecido ósseo

Foram obtidos quatro isolados bacterianos dos quatro espécimes de cães com processos infecciosos ósseos, tais como, osteomielite, fratura femoral e osteossarcoma. Deste total foram identificadas dois isolados que corresponderam à espécie *Staphylococcus intermedius*, uma espécie que correspondeu à *Pseudomonas aeruginosa* e uma a Enterobacteriaceae, *Proteus mirabilis*.

5.2. Suscetibilidade antimicrobiana das bactérias isoladas de diferentes infecções em animais de companhia

Os testes de identificação das espécies bacterianas e suscetibilidade aos antimicrobianos foram realizados sequencialmente e os resultados eram imediatamente enviados aos médicos veterinários responsáveis pelo atendimento clínico dos animais como forma de auxiliar no diagnóstico e na terapêutica das doenças (Figura 11). Essa conduta visou conscientizar uma pequena parcela da comunidade veterinária a respeito da importância clínica da realização dos testes de identificação e de suscetibilidade, além de gerar entendimento a respeito do impacto provocado pelo uso indevido de antibióticos. O resultado dessa medida foi muito satisfatório, uma vez que contribuiu significativamente para o sucesso de diversos atendimentos e trouxe esclarecimentos a respeito da diversidade de agentes bacterianos envolvidos na etiologia das doenças, desmistificando o conceito do envolvimento apenas de agentes bacterianos clássicos como justificativa para a escolha do antibiótico.

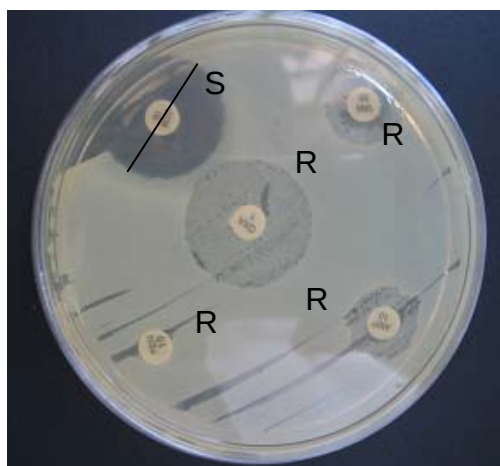


Figura 11. Método de difusão em disco. (S): Halo de inibição avaliado em milímetros (mm); (R): isolado resistente.

5.2.1. Perfil de suscetibilidade antimicrobiana dos *Staphylococcus* spp.

Após o teste de difusão em disco, os percentuais de resistência foram avaliados considerando todos os *Staphylococcus* spp.. A Figura 12 apresenta o gráfico com os percentuais de resistência aos antimicrobianos avaliados e as demais considerações serão apontadas nos itens que se seguem.

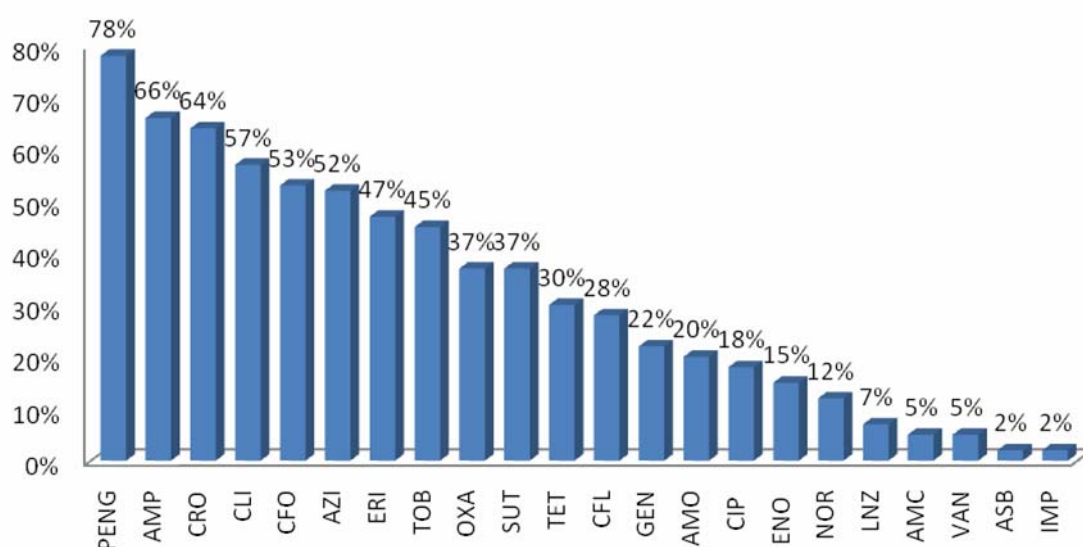


Figura 12. Gráfico apresentando o percentual de resistência dos *Staphylococcus* spp. (n=100) de processos infecciosos de animais de companhia.

*PENG: Penicilina G; AMP: ampicilina; OXA: oxacilina; AMO: amoxicilina; AMC: amoxicilina+ác. clavulânico; ASB: ampicilina+sulbactam; CFO: cefoxitina; CFL: cefalotina; CRO: ceftriaxona; AZI: azitromicina; ERI: eritromicina; CLI: clindamicina; CIP: ciprofloxacina; ENO: enrofloxacina; NOR: norfloxacina; TOB: tobramicina; VAN: vancomicina; GEN: gentamicina; SUT: sulfametoxazol+trimetopim; LNZ: linezolida; TET: tetraciclina; IMP: imipenem.

5.2.1.1. Antibióticos β -lactâmicos e cefalosporinas

O presente estudo detectou um percentual de resistência à penicilina de 78% (78/100). No Brasil, mais de 70% das cepas de *Staphylococcus aureus* mostram-se resistentes às penicilinas, por isso seu uso não é mais indicado em infecções por estes microrganismos (COSTA et al., 1994). Acredita-se que tais achados possam ser atribuídos a provável capacidade de produção da β -lactamase das cepas isoladas (ARCHER et al., 1994; KASZANYITZKY et al., 2004) a frequente utilização destes princípios ativos e ao uso inadequado deste medicamento (LOEFFLER et al., 2005). Semelhantemente, também foi observado um alto percentual de resistência à ampicilina em 66% (66/100) dos isolados avaliados. Já para o antibiótico amoxicilina foi observada resistência em 20% (20/100) dos isolados (Figura 13).

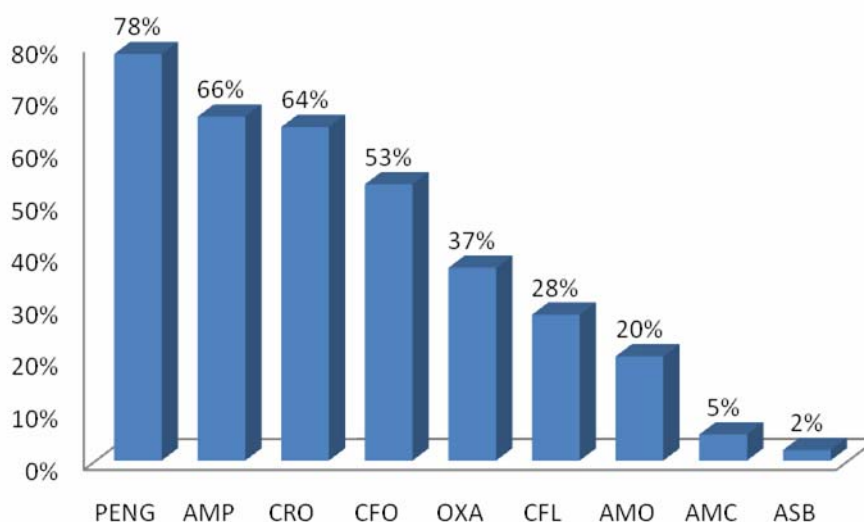


Figura 13. Gráfico apresentando o percentual de resistência de *Staphylococcus* spp. isolados de infecções em animais de companhia frente antibióticos β -lactâmicos e cefalosporinas.

*PENG: Penicilina G; AMP: ampicilina; OXA: oxacilina; AMO: amoxicilina; AMC: amoxicilina+ác. clavulânico; ASB: ampicilina+sulbactam; CFO: cefoxitina; CFL: cefalotina; CRO: ceftriaxona

Este percentual quando comparado retrospectivamente, continua refletindo a baixa atividade destes fármacos. Em estudo anterior foi detectado um percentual de resistência à ampicilina em 78,3% dos *Staphylococcus* spp. provenientes de casos de otite externa e 81% de resistência em casos de piodermatite canino (PEREIRA et al., 2009). Os β -lactâmicos são frequentemente utilizados no tratamento das infecções estafilocócicas em clínica veterinária no Brasil e os antimicrobianos mais utilizados, como a penicilina e ampicilina são os que frequentemente induzem a resistência devido ao uso indiscriminado (COELHO et al., 2007).

Por outro lado, o percentual de resistência as associações de antibiótico β -lactâmico e inibidores de β -lactamase demonstraram uma melhor eficácia. Do total de isolados avaliados foi possível detectar resistência de 2% (2/100) à associação ampicilina e sulbactam e 5% (5/100) à associação amoxicilina e ácido clavulânico. Em trabalho desenvolvido por Calvinho e colaboradores (2002) todos os *Staphylococcus aureus* foram sensíveis à associação de amoxicilina e ácido clavulânico e em estudo realizado por De Oliveira e colaboradores (2000) também foi reportado uma favorável atividade da associação entre ampicilina e ácido clavulânico frente estafilococos. O baixo percentual de resistência a esta associação pode está relacionada a atuação do

composto inibidor de β -lactamases, uma vez que diversos autores relatam que a hiperprodução de β -lactamases é um importante mecanismo de resistência aos β -lactâmicos (ARCHER et al., 1994, ROSATO et al., 2003). Estes resultados preliminares impulsionaram o desenvolvimento de um estudo mais apurado a respeito da atuação das β -lactamases na resistência a antibióticos β -lactâmicos.

O percentual de resistência à oxacilina foi de 37% (37/100). A resistência à oxacilina é um problema cosmopolita e a sua resistência indica que os demais β -lactâmicos também serão de pouca eficácia limitando assim as alternativas de tratamento. Resultados de outros estudos que avaliaram isolados bacterianos provenientes de mastite bovina, também indicam resistência à oxacilina, porém sempre a associam a *Staphylococcus* spp. isolados de humanos e discutem que este não é um problema de grande importância na Medicina Veterinária (DE OLIVEIRA et al., 2000; GENTILINI et al., 2000).

O presente estudo também avaliou o perfil de suscetibilidade dos *Staphylococcus* spp. frente as cefalosporinas: cefalotina, ceftriaxona e cefoxitina que representam indicações terapêuticas em medicina veterinária. O percentual detectado para estes antibióticos foi de: 53% (53/100) dos isolados de *Staphylococcus* spp. para cefoxitina, 64% (64/100) para ceftriaxona e 28% (28/100) para cefalotina. Quando comparado a outros estudos os percentuais de resistência detectados no presente estudo apontam para o crescente aumento da resistência às cefalosporinas em isolados de *Staphylococcus* spp.. Silva (2001) examinou 57 isolados de *Staphylococcus* spp. a partir de otite externa crônica em cães e detectou baixo percentual de resistência a cefalotina (2%). O crescente aumento no percentual de resistência às cefalosporinas pode está relacionado ao fato destas comporem formulações multidrogas que apresentam amplo espectro de ação e que para este fim, incluem fármacos de atividade antibiótica, antimicótica e anti-inflamatória.

Segundo o comitê para antibiograma estabelecido pela SFM (2006) (“Antibiogram Committee of the French Society for Microbiology”), as cepas de *Staphylococcus* spp. resistentes à oxacilina, ou à cefoxitina, ou portadoras do gene *mecA* ou produtoras de PBP2a são interpretadas como resistentes a todos os antibióticos β -lactâmicos, incluindo penicilinas, β -lactâmicos + inibidores de β -lactamases, cefalosporinas e carbapenemas. No entanto, as diferenças quanto ao percentual de resistência entre os antibióticos β -lactâmicos detectados no presente estudo podem ter relação com o padrão de uso desses antibióticos em medicina veterinária que são indicados com frequência diferenciadas em relação à medicina humana. Os antibióticos oxacilina e cefoxitina são alternativas pouco indicadas na clínica de pequenos animais, no entanto antibióticos β -lactâmicos, tais como, ampicilina, amoxicilina, cefalotina e ceftriaxona são os mais indicados na conduta terapêutica e compõem as formulações medicamentosas que são amplamente comercializadas no mercado pet farmacêutico (VIANA, 2003).

O percentual de resistência também foi calculado considerando cada espécie identificada e não foi encontrada diferença significativa entre os percentuais de resistência avaliados em *S. aureus* e *S. intermedius* que foram os agentes do gênero mais comumente envolvidos na etiologia de processos infecciosos em animais de companhia.

5.2.1.2. Antibióticos glicopeptídeos e aminoglicosídeos

No presente estudo foi encontrado um percentual de 5% (5/100) resistência ao antibiótico glicopeptídeo, vancomicina. Uma das principais alternativas no tratamento das infecções causadas por estafilococos resistentes à oxacilina é a utilização da vancomicina. Apesar do teste de difusão em disco ser o mais utilizado para avaliação da

suscetibilidade antimicrobiana é necessário que se estabeleça a concentração inibitória mínima para a confirmação da resistência à vancomicina, pois a emergência mundial de clones bacterianos de origem animal resistentes a glicopeptídeos representa uma ameaça significativa ao futuro da terapia antimicrobiana em humanos e animais (SAHA et al., 2008; CHANG et al., 2003). Considerando o percentual de resistência a vancomicina nos isolados testados, deve-se em etapas futuras aprofundar a avaliação da resistência à vancomicina por distintos métodos fenotípicos, como também pela detecção dos genes *vanA*, *vanB* e *vanC*.

Foi detectado o percentual de 22% (22/100) de resistência ao antibiótico aminoglicosídeo, gentamicina. Este percentual é considerado elevado quando comparado ao trabalho desenvolvido por Langoni e colaboradores (2000) que relataram a gentamicina como sendo o antibiótico que apresentou maior (98,6%) ação “in vitro” sobre os *Staphylococcus aureus*. Resultados semelhantes foram obtidos por Pellerin e colaboradores (1998) que avaliaram o perfil de suscetibilidade de 131 isolados de *S. intermedius* obtidos a partir de amostras de pele de cães saudáveis e com piodermatite e relataram que 95% (124/131) dos isolados foram suscetíveis à gentamicina.

Outro aminoglicosídeo avaliado foi o antibiótico tobramicina que apresentou resistência em 45% (45/100) dos isolados avaliados. Este antibiótico compõe formulações de uso tópico para tratamento de infecções de pele e oftalmológicas amplamente utilizadas na clínica veterinária.

5.2.1.3. Antibióticos fluoroquinolonas

Em relação aos antibióticos fluoroquinolonas foi detectado um percentual de resistência de 15% (15/100) para enrofloxacin, 12% (12/100) para norfloxacin e 18% (18/100) para ciprofloxacina. Esta classe de antimicrobianos é amplamente prescrita em casos de infecções do trato urinário devido a longo período de distribuição do fármaco, e amplo espectro de ação, contra cocos Gram-positivos e Bastonetes Gram-negativos (SLANEY et al., 1990). Em estudo anterior, também foi detectado um semelhante percentual de resistência à enrofloxacin e norfloxacin em isolados bacterianos provenientes de infecções do trato urinário inferior (PEREIRA et al., 2009). Šeol (2005) avaliou o perfil de suscetibilidade de 50 isolados de *Staphylococcus intermedius* a partir de amostras de pioderma e otite externa canina e relatou 2% de resistência às fluoroquinolonas, ciprofloxacina, enrofloxacin e marbofloxacina.

5.2.1.4. Outras classes de Antibióticos avaliadas

O presente estudo avaliou o percentual de resistência a tetraciclina tendo sido possível detectar resistência em 30% (30/100) dos isolados de *Staphylococcus* spp.. A associação sulfametoxazol e trimetopim apresentou resistência em 37% (37/100) dos isolados. Os resultados do presente estudo corroboram com o trabalho desenvolvido por Oliveira e colaboradores (2006) que detectaram o percentual de 22% de resistência à tetraciclina e 33% de resistência à associação sulfametoxazol e trimetopim em 60 isolados de *Staphylococcus aureus* spp. *aureus* provenientes de casos de otite externa canina. Em outro estudo foi investigado o perfil de suscetibilidade de 600 isolados de *Staphylococcus intermedius* provenientes de casos de otite externa canina e foi relatado o percentual de 18% de resistência à associação sulfametoxazol e trimetopim (HARIHARAM et al., 2006).

Já os antibióticos de última geração linezolida e imipenem apresentaram 7% (7/100) e 2% (2/100) de resistência em *Staphylococcus* spp., respectivamente. O alto custo destes fármacos pode atuar como fator limitante para a indicação destes fármacos como alternativa terapêutica em infecções estafilocócicas de animais de companhia o que

pode limitar o desenvolvimento de resistência a esses antibióticos, fato este confirmado pelo baixo percentual de isolados resistentes detectados no presente estudo.

5.2.2. Perfil de suscetibilidade antimicrobiana dos Bastonetes Gram-negativos

Os 64 isolados de Bastonetes Gram-Negativos (BGN) foram testados frente aos seguintes antimicrobianos: ceftioxima, cefalotina, ceftriaxona, enrofloxacin, norfloxacin, ciprofloxacina, gentamicina e tetraciclina para enterobactérias, e ceftioxima, ceftriaxona, ciprofloxacina, norfloxacin e gentamicina para *Pseudomonas* spp. Os respectivos percentuais de resistência estão apresentados na Figura 14 e 15.

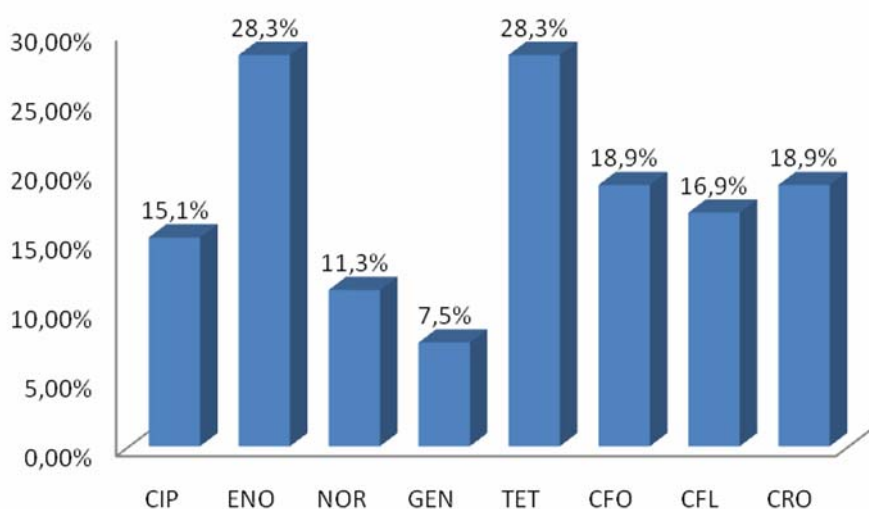


Figura 14. Gráfico dos percentuais de resistência de Enterobacteriaceae (n= 53) isolados de diferentes sítios infecciosos de animais de companhia.

*CIP: ciprofloxacina; ENO: enrofloxacin; NOR: norfloxacin; GEN: gentamicina; TET: tetraciclina. CFO: ceftioxima; CFL: cefalotina; CRO: ceftriaxona.

Em relação às enterobactérias foram detectados os seguintes percentuais de resistência: 7,5% (4/53) para gentamicina, 11,3% (6/53) norfloxacin, 15,1% (8/53) ciprofloxacina, 16,9% (9/53) cefalotina, 28,3% (15/53) ceftriaxona e ceftioxima, respectivamente. Além destes também foram detectados os seguintes percentuais de resistência: 28,3% (15/53) para enrofloxacin e tetraciclina, respectivamente.

Colombini e colaboradores (2000) avaliaram o perfil de suscetibilidade de 18 isolados de *Proteus* spp. a partir de 235 espécimes de otite média canina e detectaram um baixo percentual de resistência à gentamicina (17%). Os autores também relataram que os 18 isolados foram totalmente sensíveis à enrofloxacin. Da mesma forma, Çetin e colaboradores (2003) examinaram amostras de urina de 100 cães com infecção do trato urinário e seus resultados assemelharam-se aos apresentados no presente estudo. Os autores relataram que dos 25 isolados de BGN avaliados, os percentuais de resistência foram: 8% à gentamicina e 24% à enrofloxacin.

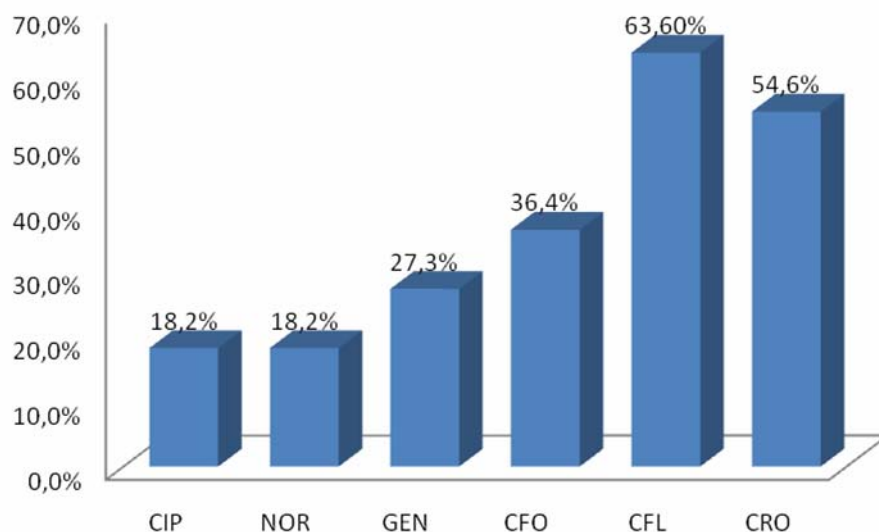


Figura 15. Gráfico dos percentuais de resistência de *Pseudomonas* spp. (n=11) isolados de diferentes sítios infecciosos de animais de companhia.

* CIP: ciprofloxacina; NOR: norfloxacina; GEN: gentamicina; CFO: cefoxitina; CFL: cefalotina; CRO: ceftriaxona.

Em relação à *Pseudomonas* spp. foram detectados os seguintes percentuais de resistência: 27,3% (3/11) para gentamicina, 18,2% (2/11) norfloxacina e ciprofloxacina, respectivamente, 63,6% (7/11) para cefalotina, 54,5% (6/11) para ceftriaxona, e 36,4% (4/11) para cefoxitina. As cepas de *Pseudomonas* spp. apresentam resistência natural a cefalosporinas de 1ª e 2ª geração, o que pode explicar o alto percentual de resistência às cefalosporinas detectado no presente estudo.

Os resultados do presente estudo corroboram com o estudo desenvolvido por Rubin e colaboradores (2008) que testaram 106 cepas de *Pseudomonas aeruginosa* de casos de otite e piodermatite canino frente 32 antibióticos de diferentes classes e relataram 100% de resistência às cefalosporinas cefoxitina e cefalotina, e 39% de resistência à ceftriaxona. Quanto às fluoroquinolonas os autores relataram 31% de resistência à enrofloxacina e 16% à ciprofloxacina, para o aminoglicosídeo, gentamicina foi relatada resistência de 7%. Tejedor e colaboradores (2003) avaliaram os possíveis mecanismos de resistência à fluoroquinolonas em 54 cepas de *Pseudomonas aeruginosa* isoladas de casos de otite externa canina e relataram 18,5% de resistência à ciprofloxacina.

Esses resultados apontam para o fato de que o desenvolvimento de resistência em cepas bacterianas associadas a infecções animais de companhia torna indispensável a realização de testes de suscetibilidade antes da indicação de determinados antimicrobianos como opção terapêutica veterinária.

5.3. *Staphylococcus* spp. em processos infecciosos de animais de companhia

No presente estudo as espécies de *Staphylococcus* foram prevalentes em 50% (100/200) dos isolados bacterianos identificados em processos infecciosos de animais de companhia, tendo sido prevalentes nos casos de otite externa canina e piodermatite. Os *Staphylococcus* spp. são importantes causadores de doenças em animais por possuírem a habilidade de desenvolver uma série de mecanismos de virulência e também por serem portadores de genes capazes de torná-los refratários a ação de antibióticos.

Existem diversos grupos de pesquisa, que mundialmente, buscam identificar e compreender tais mecanismos de patogênese associados às enfermidades estafilocócicas, tanto humanas quanto animais, com o intuito de reduzir falhas de conduta terapêutica. Nos últimos anos o Laboratório de Bacteriologia Veterinária da UFRRJ tem desenvolvido uma linha de pesquisa que busca investigar os principais mecanismos de virulência e resistência em *Staphylococcus* spp. provenientes de espécimes clínicos de diferentes reservatórios animais. Portanto, tem-se buscado uma padronização de testes e protocolos que seguem metodologias estabelecidas por entidades regulamentadoras internacionais e que foram adotadas no desenvolvimento deste trabalho.

5.3.1. Testes bioquímicos de identificação fenotípica

A identificação primária dos espécimes foi realizada a partir do isolamento direto em ágar sangue e posteriormente ao período de incubação os isolados típicos bacterianos foram identificados fenotipicamente através de provas bioquímicas (Anexo I e II). A técnica de coloração de Gram permitiu a identificação das características morfológicas: de cocos Gram-positivos e o teste da catalase com resultado positivo permitiu a definição dos isolados relacionados à família *Micrococaceae*. Dentre o total de isolados bacterianos obtido, cocos Gram-positivos catalase-positivos corresponderam a 51,3% (100/195).

A identificação prosseguiu com repiques em ágar manitol vermelho de fenol, para obtenção de colônias puras e pela realização da prova de coagulase que permitiu diferenciar os gêneros *Staphylococcus* spp. coagulase-positivos (SCP) dos coagulase-negativos. As espécies de SCP foram fenotipicamente definidas a partir das seguintes provas: Fermentação da maltose, redução de nitratos e produção de acetoina. Essas provas identificaram as seguintes espécies: *S. intermedius* (60%), *S. aureus* spp. *aureus* (20%), *S. aureus* spp. *anaerobius* (2%) e *S. schleiferi* spp. *coagulans* (4%). A literatura indica que é necessária a execução de mais testes fenotípicos para identificação de estafilococos. Em função disso é importante reconhecer que não existe uma técnica de tipificação que permite uma diferenciação definitiva (com exceção do sequenciamento do genoma completo). Portanto é de fundamental importância o estabelecimento de critérios de utilização destes métodos para que os resultados obtidos sejam reprodutíveis e precisos (CHRISTENSEN et al., 1985; REINOSO, 2004).

As amostras coagulase-negativas foram submetidas à prova da resistência a bacitracina para diferenciação entre *Micrococcus* spp., sensíveis, e *Staphylococcus* coagulase-negativos (SCN), resistentes. Para identificação das espécies de SCN foram efetuadas as seguintes técnicas: fermentação de açúcares (xilose, sacarose, trealose, frutose, maltose, lactose e manose), redução de nitratos e produção de urease (KONEMAN et al., 2008). Essas provas diferenciaram as seguintes espécies: *S. xylosus* (7%, 7/100), *S. hominis* (3%, 3/100), *S. epidermidis* (2%, 2/100).

Micrococcus spp. foram prevalentes em 10% (10/110) dos isolados e na maioria destes estava associado a infecções do tipo polimicrobianas. Os membros deste gênero

são encontrados comumente no meio ambiente (KONEMAN et al., 2008) e como habitantes normais da pele e mucosas. Na maioria das vezes, são reportados como contaminantes em isolados clínicos (GAHRN-HANSEN, 1987), embora possam desenvolver infecções oportunistas em indivíduos imunossuprimidos (BROOKS et al., 2000). No entanto, alguns autores sugerem que *Micrococcus* spp. pode atuar como agente secundário em casos de proliferação de outros agentes bacterianos, principalmente *S. intermedius* (SCOTT et al, 1995).

5.3.2. Identificação genotípica

Após a etapa bioquímica de identificação, os isolados foram mantidos congelados em caldo MH acrescido de glicerol à 4% para posterior realização das análises genéticas. Para a amplificação dos genes de identificação das espécies de *Staphylococcus* foi utilizado o iniciador que amplifica para *DNAr* de *S. aureus* (STRAUB et al., 1999), e os iniciadores que amplificam para o gene *nuc*, sendo *nuc* 3 e 4 para espécie, *S. intermedius* e *nuc* 1 e 2 para *S. hyicus* (SILVA et al., 2003) (Figura 16).

Através da identificação genotípica das espécies, foi encontrado um total de 35% (35/100) de *S. aureus* e 22% de *S. intermedius* (22/100) que foram correlacionados com os testes bioquímicos realizados na identificação fenotípica. Somente a detecção genética permitiu a identificação da espécie *S. hyicus* que foi prevalente em 13% (13/100) dos isolados, uma vez que fenotipicamente estes isolados apresentam atividade de coagulase variável. Do total de isolados 18% foram classificados como *Staphylococcus* spp. coagulase-positivos, pois não amplificaram para os genes específicos utilizados.

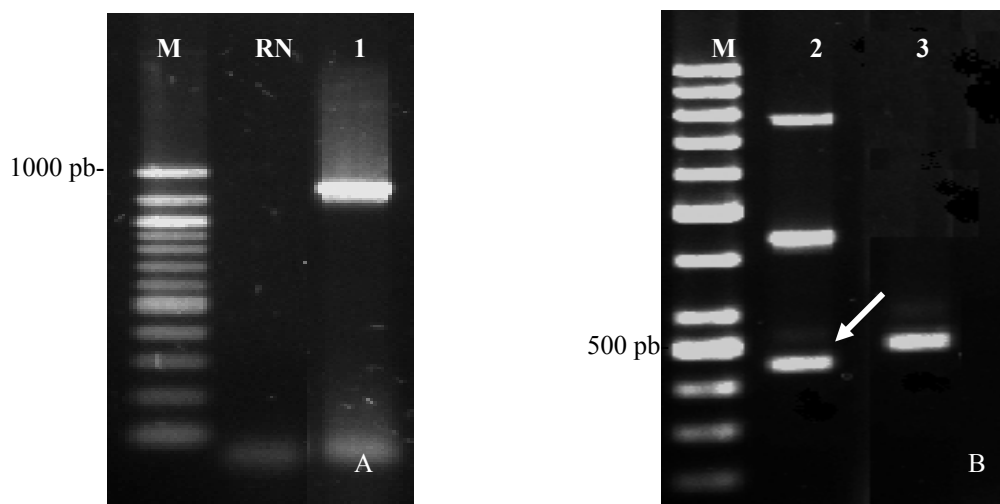


Figura 16. Genes de identificação das espécies *Staphylococcus aureus*, *S. intermedius* e *S. hyicus* isolados de infecções de animais de companhia em gel de agarose 1,5%. (A)-1: isolado positivo para gene *DNAr* de *S. aureus* (930pb). M: marcador de peso molecular (100pb), RN: Reação negativa, (B)- 2: isolado positivo para gene *nuc* 1 e 2 de *S. hyicus* (330 pb), indicado pela seta; 3: isolado positivo para gene *nuc* 3 e 4 de *S. intermedius* (431 pb).

O gene *nuc* de *S. hyicus* amplificou mais de um fragmento, porém apresentou a banda esperada de 330pb corroborando com os resultados obtidos por Silva e colaboradores (2003), que também encontrou tal perfil. Temperaturas de anelamento menores que 50°C podem possibilitar amplificações inespecíficas e, como a enzima *Taq*

DNA polimerase apresenta uma velocidade de catálise média de 1000 bases por minuto, o tempo de extensão utilizado neste estudo também poderia estar acima do necessário para a síntese dos fragmentos propostos, o que possibilitaria que a enzima atuasse de forma inespecífica. Outra explicação para esta alta variabilidade seria que o gene alvo para os *primers* NUC1 e NUC2 (gene *nuc*) apresenta sequências de bases nitrogenadas repetitivas, que permitiriam o anelamento dos “primers” em mais de um ponto, originando fragmentos amplificados com tamanhos diferentes (SILVA et al., 2003).

5.4. Perfil de suscetibilidade à Azitromicina

5.4.1. Ensaios de Difusão em Disco

Primeiramente foi realizado o teste de difusão em disco para a avaliação do perfil de suscetibilidade dos isolados frente à azitromicina. Essa técnica é aplicada rotineiramente em laboratórios de microbiologia para análises de suscetibilidade devido ao seu baixo custo, fácil e rápida execução, além de apresentar resultados confiáveis. A literatura relata que diversos autores utilizaram essa metodologia como avaliação preliminar do perfil de atividade da azitromicina (PETERS et al., 1992; BLONDEAU, 2002; HANSEN et al., 2002). Retsema (1999) utilizou a técnica de difusão em disco como triagem para detectar isolados resistentes à azitromicina e avaliar o desenvolvimento de resistência a diferentes macrolídeos, dentre estes a azitromicina. A sensibilidade é avaliada segundo o diâmetro da zona de inibição do crescimento bacteriano. De acordo com o padrão estabelecido pelo CLSI (2009), os halos de inibição da azitromicina correspondem a diâmetros ≤ 13 mm para isolados resistentes, ≥ 18 mm para sensíveis e o intervalo de 14-17 mm para isolados com grau de inibição intermediário. Esses dados resultaram de estudos realizados a partir de amostras humanas, desse modo, houve a necessidade da avaliação da suscetibilidade à azitromicina em isolados animais a fim de se obter um resultado coerente e que reflita valores reais para padronização dos limites interpretativos.

O presente estudo avaliou 100 isolados de *Staphylococcus* spp. e detectou 55% (55/100) de resistência através da técnica de difusão em disco. Foi possível detectar que, o percentual de resistência em *S. intermedius* correspondeu a 57,1% (20/35), em *S. aureus* foi de 63,3% (14/22), em *S. hyicus* foi de 38,5% (5/13), em SCP foi de 46,7% (7/15), em SCN 75% (9/12). Para Bastonetes Gram-negativos foi analisado um total de 64 isolados de diferentes espécies de enterobactérias e *Pseudomonas* spp. e este grupo apresentou o percentual de 53,1% (34/64).

Limitando a avaliação do perfil de suscetibilidade dos isolados provenientes dos diferentes processos infecciosos ao ensaio de difusão em disco, seria possível concluir que a azitromicina apresentou melhor percentual de atividade em relação à *Staphylococcus* spp. provenientes de casos de otite externa canina e para bastonetes Gram-negativos isolados de casos de doença do trato urinário.

O perfil de suscetibilidade dos *Staphylococcus* spp. frente antibióticos macrolídeos tem sido alvo de investigações desde 2005, quando teve início as pesquisas em isolados bacterianos de infecções animais em paralelo ao lançamento do antibiótico azitromicina em sua formulação destinada ao mercado pet. Desde então tem sido observado que o aumento crescente da prescrição deste antimicrobiano de amplo-espectro em clínica veterinária foi acompanhado de significativos percentuais de resistência “in vitro” em isolados bacterianos provenientes de diferentes tipos de infecções de animais de companhia. Em comparação com os resultados obtidos em 2005, o percentual de resistência à azitromicina em *Staphylococcus* spp. foi de 52% (PEREIRA et al., 2009). Estes resultados motivaram a ampliação das análises

fenotípicas a partir de outros testes mais específicos e também a detecção de marcadores genéticos dessa resistência utilizando-se a técnica de PCR.

5.4.2. Ensaio de Microdiluição em Caldo

O teste de microdiluição em caldo é considerado um padrão ouro para detecção fenotípica da resistência, sendo a metodologia mais utilizada em investigações que avaliaram a atividade “in vitro” e perfil de resistência de isolados bacterianos frente a azitromicina. O CLSI (2008) preconiza a utilização desse teste para predição de resistência e estabeleceu limites de CIM $\geq 8\mu\text{g/mL}$ de azitromicina para inibição do crescimento de alguns microrganismos, entre estes, *Staphylococcus* spp.. Esses limites interpretativos são preconizados como padrão de escolha do antimicrobiano ideal para o tratamento de infecções humanas, assim os isolados provenientes de animais também foram submetidos a essa técnica e os limites interpretativos tomados de acordo com o padrão do CLSI (2008) (Figura 17).

Dessa maneira, no presente estudo, um total de 57% (57/100) dos isolados de *Staphylococcus* spp. foram resistentes à concentrações acima de $8\mu\text{g/mL}$ azitromicina. Deste total 57,1% (20/35) dos isolados de *S. intermedius* foram resistentes, 44% (11/25) de *S. aureus*, 61,5% (8/13) de *S. hyicus*, 53,3% (8/15) dos SCP e 66,7% (8/12) dos SCN. Em relação aos Bastonetes Gram-negativos, 90,5% (57/63) destes apresentaram valores de CIM superiores ou iguais ao limite de resistência padronizado.

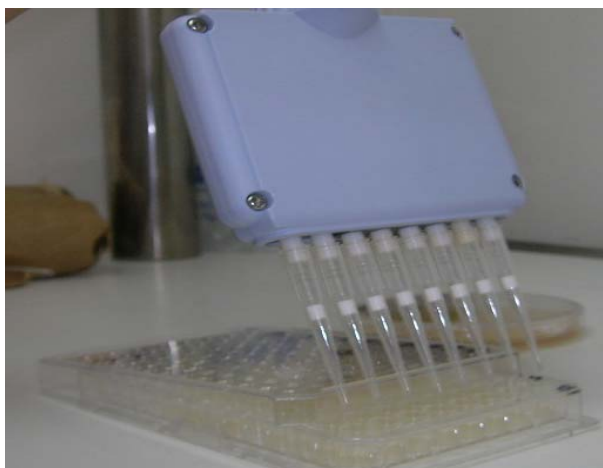


Figura 17. Teste de microdiluição em caldo.

Em relação aos isolados de estafilococos avaliados, os percentuais de resistência obtidos foram superiores aos encontrados na literatura, e contradizem a idéia de elevada eficácia da azitromicina frente a este gênero bacteriano (MASKELL et al., 1990; SLANEY et al., 1990; NEU, 1991; RETSEMA, 1999). A maioria dos estudos, por avaliar isolados humanos, considera *S. aureus* como patógeno modelo para a determinação da CIM e não avalia o perfil de atividade dessa droga em relação a outras espécies desse gênero. No presente estudo, *S. aureus* esteve presente em apenas 22% dos isolados, sendo *S. intermedius* a espécie que prevaleceu em 35% dos isolados e as espécies *S. hyicus* e SCN em 13% e 12%, respectivamente, ressaltando a importância de outras espécies de *Staphylococcus* spp. na etiologia de infecções de animais de companhia e para a determinação do perfil de atividade antimicrobiana diferenciado entre as espécies.

O expressivo percentual de resistência observados nos BGN pode estar diretamente relacionado à baixa eficácia do antibiótico frente a microrganismos reconhecidamente resistentes, como *Pseudomonas* spp., *Proteus mirabilis*, *Serratia marcescens*, *Citrobacter freundii* e *Enterobacter* spp., (NEU, 1991; RETSEMA, 1999) que no presente estudo, corresponderam as espécies mais prevalentes.

5.4.3. Ensaio de Diluição em Ágar

Outra metodologia aplicada para a determinação “in vitro” do perfil de atividade da azitromicina foi a técnica da diluição em ágar. Neste teste o antimicrobiano é incorporado ao ágar em diferentes concentrações, sendo possível a análise de até 30 isolados em apenas uma placa de Petri (NCCLS/CLSI, 2003) (Figura 18). Portanto, tal técnica representa uma alternativa prática e de baixo custo para a avaliação do perfil de suscetibilidade antimicrobiana, desde que seus resultados permitam uma boa correlação com a técnica da diluição em caldo, já citada como padrão neste tipo de análise. Maskel e colaboradores (1990) também utilizaram este procedimento para avaliação da atividade “in vitro” da azitromicina e eritromicina contra cocos Gram-positivos, *Haemophilus influenzae* e anaeróbios. Terasawa (2006) também utilizou a técnica de diluição em ágar para determinar o perfil de resistência de isolados de SCN frente diversos antimicrobianos, incluindo antimicrobianos da classe dos macrolídeos.

Os mesmos valores da CIM para a técnica de microdiluição em caldo foram utilizados como parâmetro para avaliação do percentual de isolados resistentes. Os resultados obtidos apresentaram percentuais de resistência expressivos, tendo sido detectado 65% (65/100) de isolados de *Staphylococcus* spp. resistentes à azitromicina. Deste total 68,6% (24/35) dos isolados de *S. intermedius* foram resistentes, 56% (14/25) dos *S. aureus*, 61,5% (8/13) para *S. hyicus*, 60% (9/15) dos SCP e 76,9% (10/12) dos SCN. O percentual de resistência dos Bastonetes Gram-negativos permaneceu inalterado, em relação ao teste de microdiluição em caldo.

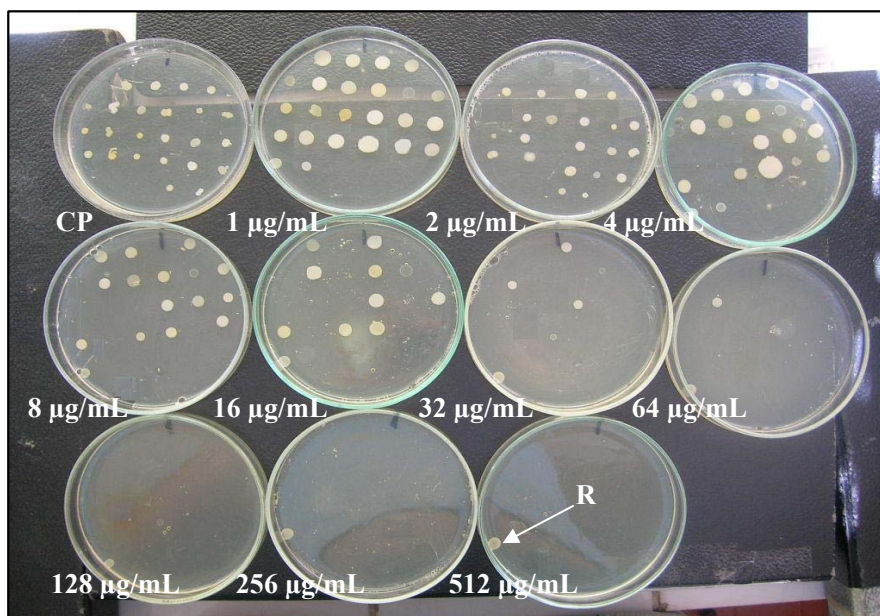


Figura 18. Teste de diluição ágar. CP: Controle positivo, R: Resistente.

5.4.4. Determinação da CIM para azitromicina

Diversos estudos avaliaram a CIM_{50/90} em isolados obtidos a partir de processos infecciosos humanos, porém existem poucos dados em relação a isolados obtidos de animais. Essa questão merece maior atenção uma vez que a azitromicina é uma alternativa terapêutica e para tanto requer dados confiáveis que justifiquem sua aplicação de forma a evitar a emergência de resistência em animais de companhia. O presente estudo utilizou o método estatístico de regressão simples segundo o modelo cúbico para determinar a CIM dos isolados bacterianos submetidos à concentrações crescentes de azitromicina. Dessa maneira, os valores de resistência obtidos pelas técnicas de microdiluição em caldo e diluição em ágar foram utilizados como variáveis para determinar o coeficiente de regressão seguindo um modelo dose-resposta (concentração de azitromicina x inibição bacteriana) (Figura 19).

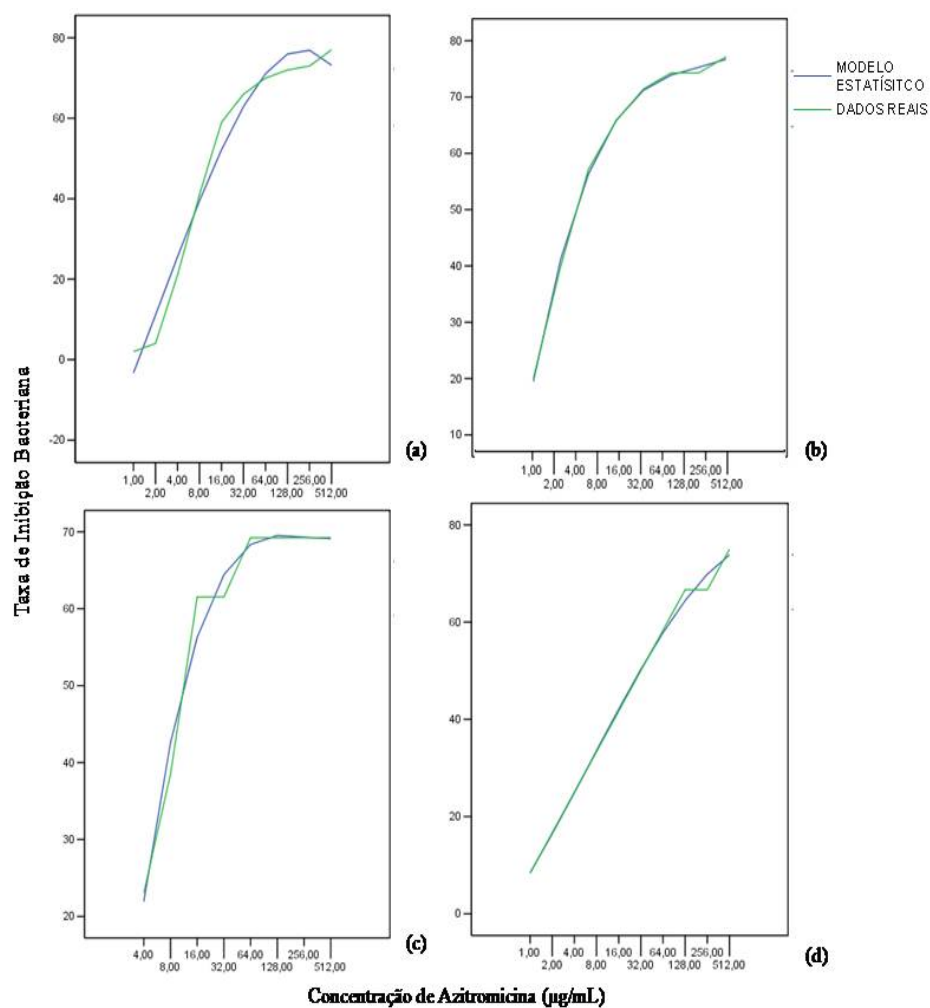


Figura 19. Gráfico do perfil de atividade da azitromicina segundo resultados obtidos no teste de microdiluição em caldo.

*Modelo dose-resposta (concentração de azitromicina x Taxa de inibição bacteriana) dos isolados, (a) *S. aureus*, (b) *S. intermedius*, (c) *S. hyicus*, (d) SCN, avaliados através do teste de microdiluição em caldo.

A determinação da CIM₅₀ para azitromicina obtida a partir da técnica de microdiluição em caldo apresentou valores de 16,0 µg/mL quando considerado *Staphylococcus* spp. e quando avaliados em separado também foram obtidos valores de 16,0 µg/mL para os isolados de *S. aureus* e *S. intermedius*. Para os isolados de *S. hyicus* e para SCN foram obtidos valores superiores a 32 µg/mL, porém o tamanho da amostra não permitiu o cálculo da significância estatística desses valores. A CIM₉₀ apresentou valores de 64 µg/mL quando considerado *Staphylococcus* spp. e valores de 128,0 µg/mL para *S. aureus* e 512 µg/mL para *S. intermedius* (Figura 19) (Anexo VII).

O perfil de atividade da azitromicina apresentado pelas espécies de *Staphylococcus* spp. revelou que um pequeno aumento da concentração do antibiótico foi capaz de aumentar significativamente a atividade inibitória da azitromicina (taxa de morte).

A diferença entre os valores da CIM entre isolados humanos e animais aponta para o fato de que o perfil de atividade dessa droga varia entre espécies bacterianas e seus hospedeiros, destacando a importância da prévia identificação do agente etiológico, na prevenção das falhas de tratamento e desenvolvimento da resistência. Outra consideração importante pode ser observada em relação aos valores da CIM entre as diferentes espécies de *Staphylococcus* spp., visto que muitas indicações terapêuticas consideram *S. aureus* como agente etiológico das infecções e adotam valores de CIM correspondentes aos dessa espécie.

A CIM_{50/90} também foi avaliada através da técnica de diluição em ágar. Quando considerado *Staphylococcus* spp. a CIM_{50/90} correspondeu a valores de 32µg/mL e 256µg/mL. Quando considerado as espécies em separado foram obtidos os seguintes valores: 16µg/mL e 256µg/mL para *S. aureus*, 32µg/mL e 128µg/mL para *S. intermedius*. O perfil inibitório da azitromicina manteve-se semelhante ao observado na técnica de microdiluição em caldo, porém no caso de *S. intermedius* pôde-se observar que a partir de uma determinada concentração de azitromicina a taxa de inibição permanece constante (Figura 20).

Em relação aos Bastonetes Gram-negativos os resultados da CIM_{50/90} detectados pela técnica de microdiluição em caldo e diluição em ágar foram de 256µg/mL e >512µg/mL, respectivamente (Figura 21). De acordo com o comportamento apresentado pelos BGN concentrações muito altas foram necessárias para uma atividade inibitória satisfatória, sendo que a taxa de morte bacteriana aumentou proporcionalmente com o aumento da concentração de azitromicina. Os altos valores observados podem estar relacionados à prevalência de enterobactérias e *Pseudomonas* spp. reconhecidamente resistentes a azitromicina (Anexo VII).

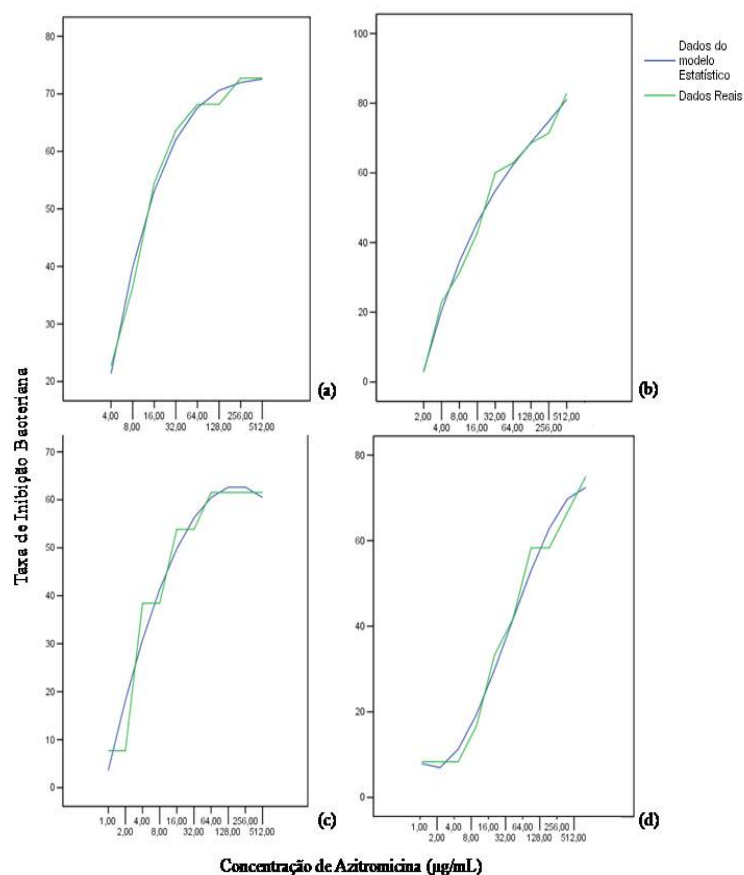


Figura 20. Gráfico do perfil de atividade da azitromicina segundo resultados obtidos no teste de diluição em ágar.

*Modelo dose-resposta (concentração de azitromicina x Taxa de inibição bacteriana) dos isolados, (a) *S. aureus*, (b) *S. intermedius*, (c) *S. hyicus*, (d) SCN.

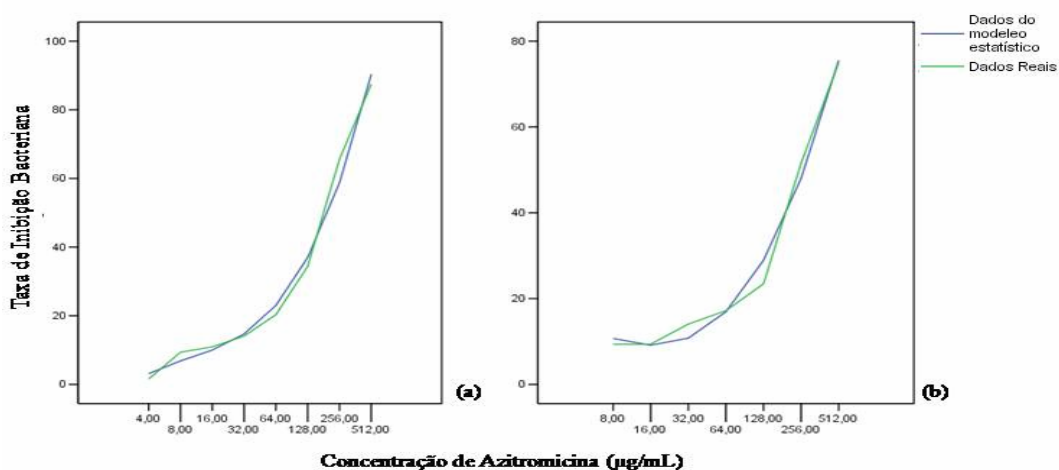


Figura 21. Gráfico do perfil de atividade da azitromicina frente os BGN.

*Modelo dose-resposta (concentração de azitromicina x Taxa de inibição bacteriana): (a) teste de microdiluição em caldo, (b) teste de diluição em Agar.

5.4.5. Teste de duplo disco para detecção do fenótipo de resistência em antibióticos MLS_B em *Staphylococcus* spp.

O total 100 *Staphylococcus* spp. foram submetidos ao teste de duplo disco para caracterização dos fenótipos de resistência à macrolídeos, sendo o disco de eritromicina (15µg) aplicado a 15mm de distância ao de clindamicina (2µg), assim como o de azitromicina (15µg). O fenótipo MLS_B foi caracterizado como constitutivo (cMLS_B) quando isolados resistentes apresentam halos de inibição reduzidos ao redor dos discos ou indutivo (iMLS_B) quando halo de inibição ao redor do disco de clindamicina sofre uma constrição de diâmetro próximo ao disco de eritromicina ou azitromicina. Já no fenótipo M ocorre resistência apenas a eritromicina ou azitromicina. Um total de 52% (52/100) dos *Staphylococcus* spp. foram resistentes à azitromicina, destes, 14 (14/52) isolados apresentaram o fenótipo cMLS_B e quatro (4/52) fenótipo M. Dos 47% (47/100) isolados resistentes à eritromicina, cinco (5/47) apresentaram fenótipo cMLS_B e três (3/47) fenótipo M. Já em 57% de isolados resistentes à clindamicina, cinco (5/57) apresentaram resistência induzida.

5.4.6. Detecção de marcadores genéticos da resistência à macrolídeos em *Staphylococcus* spp.

Posteriormente as análises fenotípicas foram investigadas os possíveis marcadores genéticos da resistência à macrolídeos em *Staphylococcus* spp. isolados de infecções em animais de companhia. Os mecanismos bioquímicos envolvidos na resistência aos macrolídeos compreendem a alteração do sítio alvo, através produção de metiltransferases, codificadas pelo gene *erm*, que reduzem a afinidade aos MLS_B ou por bombas de efluxo, codificadas pelo gene *mef* (LECLERCQ, 2002; LIM et al., 2002). A reação em cadeia de polimerase (PCR) foi aplicada para a detecção dos genes *ermA*, *ermB*, *ermC* e *mef* implicados na resistência à macrolídeos (Figura 22). O total de 12% dos isolados *Staphylococcus* spp. foram positivos para o gene *ermA*, 3% foram positivos para o gene *ermB*, 24% para o gene *ermC*, enquanto o gene *mef* não foi detectado nestes isolados, sustentando a hipótese a respeito da implicação das metiltransferases na resistência à macrolídeos.

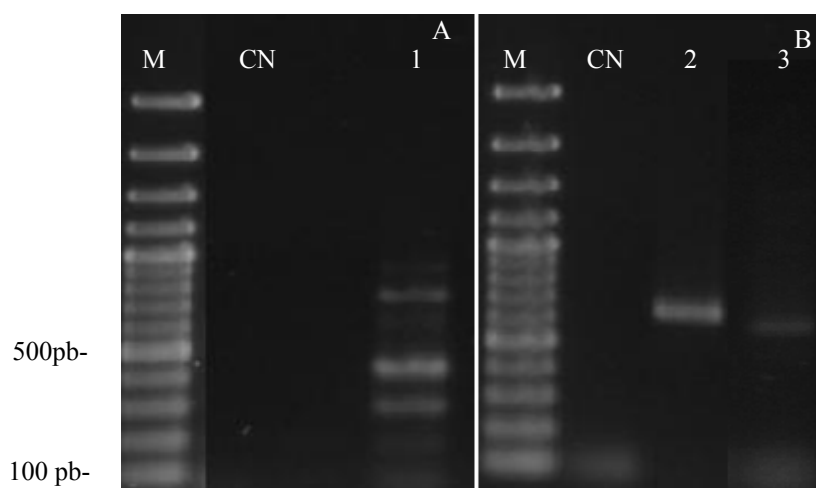


Figura 22. Genes *ermA* (A) (421 pb), *ermB* (B) (639 pb) e *ermC* (512 pb) (B) de *Staphylococcus* spp. isolados de animais de companhia em gel de agarose (1,5%). M: marcador de peso molecular (100pb); 1: isolados *ermA*-positivo, 2: isolados *ermB*-positivo; 3: isolados *ermC*-positivo; CN: controle negativo.

Um total de 37% (37/100) dos isolados de *Staphylococcus* spp. foram positivos a pelo menos um dos genes *erm*. A maioria dos isolados positivos para os genes *erm* foi fenotipicamente resistente à azitromicina, com a exceção de três isolados que foram positivos para os genes *erm* e foram fenotipicamente sensíveis à azitromicina. A comparação dos resultados obtidos nos testes fenotípicos e genotípicos que avaliaram o perfil de suscetibilidade à azitromicina permitiu detectar a expressão de 13 perfis de resistência distintos que estão apresentados na Tabela 2.

Tabela 2. Perfis de suscetibilidade à azitromicina dos *Staphylococcus* spp. positivos para genes *erm* (n=37).

Perfis (n de isolados)	Testes Fenotípicos			Testes Genotípicos		
	DDS	MC	DA	<i>ermA</i>	<i>ermB</i>	<i>ermC</i>
1(9)	R	R	R	-	-	+
2(6)	S	R	R	-	-	+
3(4)	R	R	R	+	-	-
4(4)	S	R	R	+	-	-
5(3)	R	S	S	-	-	+
6(2)	R	S	S	+	-	-
7(2)	R	S	R	-	-	+
8(2)	S	S	S	-	-	+
9(1)	R	R	R	+	-	+
10(1)	R	R	R	-	+	-
11(1)	S	R	S	+	-	-
12(1)	S	R	R	-	+	+
13(1)	S	S	S	-	+	-

*DDS : Teste de difusão em disco simples ; MC : Testes de microdiluição em caldo ; DA : Teste de diluição em ágar.

Dos 14 isolados de *Staphylococcus* spp. avaliados pelo teste de duplo disco que apresentaram fenótipo de resistência constitutiva (cMLS_B) à azitromicina, sete (50%, 7/14) foram positivos para genes *erm*, dentre estes três (3/7) foram positivos para o gene *ermA* e *ermC*, respectivamente e apenas um (1/7) isolado foi positivo para o gene *ermB*. Em outros cinco isolados de *Staphylococcus* spp. que expressaram fenótipo de resistência induzida (iMLS_B), apresentando o efeito chamado “zona D” próximo ao disco de clindamicina, um total de quatro (4/5) isolados foram positivos para os genes *erm*, sendo três (3/4) isolados positivos para o gene *ermA* e um (1/4) positivo para o gene *ermC*.

Estudos científicos têm investigado os mecanismos genéticos de resistência à macrolídeos em diferentes espécies bacterianas e em diferentes reservatórios animais. Kimpe e colaboradores (2004) avaliaram 68 isolados de *Enterococcus columbae* e *Streptococcus gallolyticus* da microbiota intestinal de 50 pombos e relataram a presença do gene *ermB* em 58 isolados de *E. columbae* e em quatro isolados de *S. gallolyticus*, e o gene *mefA* em cinco isolados de *E. columbae*. Martel e colaboradores (2003) avaliaram 33 isolados de *Enterococcus* spp. e *Streptococcus* spp. provenientes de espécimes intestinais de porcos, e relataram a prevalência do gene *ermB* em isolados que apresentaram fenótipo de resistência constitutiva aos MLS_B e do gene *mefA* em isolados com o fenótipo M. Lühje e Schwarz (2006) avaliaram 31 isolados de diferentes espécies de *Staphylococcus* spp. coagulase-negativa provenientes de quadros de mastite bovina e detectaram três isolados positivos para o gene *ermC* com fenótipo constitutivo de resistência aos MLS_B, cinco isolados positivos para o gene *ermC* com fenótipo indutivo,

e quatro isolados positivos para o gene *ermB*. No Brasil, Duarte e colaboradores (2004) avaliaram 66 isolados de *Streptococcus agalactiae* de quadros de mastite bovina e detectaram o gene *ermB* em nove (10,5%) isolados. Embora estes resultados apresentem percentuais de prevalência que se diferenciam dos encontrados no presente estudo, estes corroboram com a idéia de que a circulação de genes de resistência à macrolídeos, como os genes *erm*, esteja ocorrendo em reservatórios animais e que estes representam risco de transmissão para o homem.

5.5. Detecção de marcadores da resistência à oxacilina em *Staphylococcus* spp.

A resistência à oxacilina pode estar associada tanto a hiperprodução de β -lactamase, quanto por um mecanismo diretamente relacionado a alterações da PBP2a, em isolados que possuem o gene *mecA* expresso. A transferência horizontal do gene *mecA* em *Staphylococcus* spp. resultou na disseminação mundial de clones oxacilina e multidroga-resistentes. Tendo como base estes conceitos, o presente estudo determinou o perfil fenotípico e genotípico da resistência à oxacilina em isolados de *Staphylococcus* spp..

5.5.1. Avaliação fenotípica da resistência à oxacilina em *Staphylococcus* spp.

A detecção da resistência à oxacilina pela utilização de métodos fenotípicos apresenta problemas devido a expressão heterogênea do gene *mecA*, visto que muitos isolados resistentes à oxacilina em testes fenotípicos podem não apresentar esse gene. Por isso, várias metodologias estão sendo desenvolvidas e outras modificadas para aumentar a detecção de isolados verdadeiramente resistentes à oxacilina. Diferentes testes de suscetibilidade à oxacilina foram avaliados dentre estes: difusão em disco simples e modificada, Ágar screen, microdiluição em caldo e diluição em ágar.

O teste de difusão em disco simples detectou resistência à oxacilina em 37% (37/100) dos *Staphylococcus* spp. avaliados, enquanto a difusão em disco modificada detectou 23% (23/100) e o teste Ágar “screen” 57% (57/100) de resistência à oxacilina. No entanto, os testes de microdiluição em caldo e diluição em ágar detectaram expressivos percentuais de resistência, 77% (77/100) e 78% (78/100), respectivamente.

De acordo com os resultados dos cinco testes fenotípicos de avaliação da suscetibilidade à oxacilina realizados, os isolados apresentaram 24 perfis de suscetibilidade (Tabela 3), confirmando a heterogeneidade da resistência dos *Staphylococcus* spp. à oxacilina.

O reconhecimento desta heterorresistência vem sendo um problema, devido às diferenças de características de crescimento. Possivelmente uma população heterorresistente contenha tanto organismos suscetíveis que exibam crescimento atípico de estafilococos não-heterorresistentes, quanto organismos resistentes que cresçam mais lentos, ou em condições distintas de temperatura e concentração de NaCl (AARESTRUP et al., 1995).

Tabela 3. Perfis de suscetibilidade à oxacilina dos isolados de *Staphylococcus* spp. (n=100) nos distintos testes fenotípicos.

Perfil (n de isolados)	Testes fenotípicos				
	MC	DA	AS	DDM	DDS
1(30)	R	R	S	S	S
2(18)	R	R	R	S	S
3(7)	S	S	S	S	S
4(7)	R	R	S	R	R
5(5)	R	S	S	S	S
6(5)	R	R	R	R	R
7(3)	S	S	S	R	R
8(3)	S	R	S	S	S
9(2)	S	R	R	S	S
10(2)	S	S	R	S	S
11(2)	R	R	S	S	R
12(2)	R	S	S	S	R
13(2)	R	R	R	R	S
14(2)	R	S	R	S	S
15(1)	S	S	R	R	S
16(1)	S	S	R	R	R
17(1)	S	R	S	R	R
18(1)	S	R	R	S	R
19(1)	S	R	R	R	R
20(1)	S	R	S	S	R
21(1)	R	S	R	R	R
22(1)	R	R	S	S	R
23(1)	R	R	R	R	S
24(1)	S	S	S	S	R

*MC: Testes de microdiluição em caldo; DA: Teste de diluição em ágar; AS: Teste ágar “screen”; DDM: Teste de difusão em disco modificada; DDS: Teste de difusão em disco simples.

5.5.2. Detecção do gene *mecA* em *Staphylococcus* spp.

Após os testes fenotípicos, os isolados foram avaliados quanto à presença do gene *mecA* através da técnica de PCR e um total de 25% (25/100) dos isolados foi positivo (Figura 23). Dentre à espécie *Staphylococcus aureus* 36,4% (8/22) foram positivos para o gene *mecA*, para *S. intermedius* foram 22,8% (8/35) dos isolados e para a espécie *S. hyicus* foram 23,1% (3/13). Em relação aos *Staphylococcus* spp. coagulase-negativos, 50% (6/12) dos isolados foram positivos para o gene *mecA*, correspondendo as espécies: *S. xylosus* (3/6), *S. epidermidis* (2/6) e *S. hominis* (1/6).

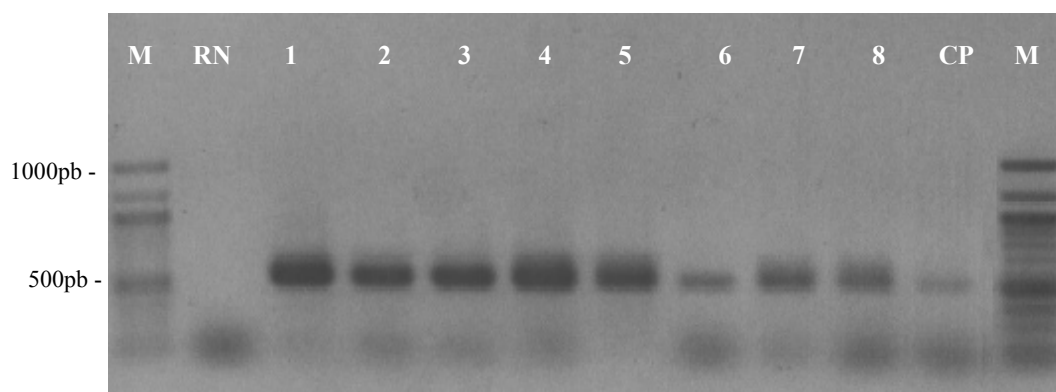


Figura 23. Gene *mecA* (513 pb) de oito isolados de *Staphylococcus intermedius*, provenientes de infecções de animais de companhia em gel de agarose a 1,5%. M: marcador de peso molecular (100pb); 1-8: isolados positivos; CP: controle positivo; RN: reação negativa.

Estudos desenvolvidos em todo o mundo apontam para o aumento de casos de MRSA e do envolvimento de outras espécies de staphylococci portadoras do gene *mecA* associados a casos de mastite bovina e doenças de cães e equinos. Murakami e colaboradores (1991) detectaram o gene *mecA* em *S. epidermidis*, *S. haemolyticus*, *S. sciuri*, *S. saprophyticus* e *S. caprae* isolados a partir de espécimes animais. Um estudo desenvolvido em hospitais veterinários da Itália relatou 52,5% (32/61) de prevalência de MRSA em isolados de ovinos, bovinos e caninos (CUTERI et al., 2005). Outro estudo desenvolvido na Coreia investigou diferentes processos infecciosos de 77 cães, tendo sido relatada a prevalência de 22% de MRSA e também a detecção do gene *mecA* em *S. intermedius* e *S. epidermidis* (KWON et al., 2006). Walther e colaboradores (2008) analisaram espécimes clínicos de 32 cães e de 11 gatos obtidos em hospitais da Alemanha e relataram a prevalência de MRSA em 5,4% e 7,4% dos isolados de origem canina e felina, respectivamente.

No Brasil, Lilenbaum e colaboradores (1998) descreveram a ocorrência de resistência a oxacilina e presença do gene *mecA* em isolados de *S. intermedius* e *Staphylococcus* spp. coagulase-negativos obtidos a partir de gatos saudáveis. Coelho e colaboradores (2007) avaliaram 29 amostras de mastite bovina e 30 amostras de otite canina e detectaram presença do gene *mecA* em *S. intermedius* e *S. aureus*. Outro estudo reportou que 6,6% dos isolados de *Staphylococcus* spp. provenientes de casos de otite externa canina, foram resistentes à oxacilina e apresentaram o gene *mecA*. (COELHO et al., 2005).

Estes resultados apontam para importância de se avaliar a ocorrência de cepas estafilocócicas portadoras do gene *mecA* em reservatórios animais, como forma de monitorar sua disseminação e criar medidas de controle em saúde pública.

5.5.3. Avaliação da resistência à múltiplos antimicrobianos em *Staphylococcus* spp. *mecA*-positivos

Foi possível detectar que 88% (22/25) dos *Staphylococcus* spp. *mecA*-positivos foram resistentes a pelo menos um dos antibióticos β -lactâmico avaliados. Porém a maioria dos isolados foi sensível a associação β -lactâmico+inibidor de β -lactamase (ampicilina+sulbactam e amoxicilina + ácido clavulânico) (Tabela 4).

Tabela 4. Perfil de resistência a antibióticos β -lactâmico de *Staphylococcus* spp. *mecA*-positivos (n= 25).

Perfis (n de isolados)	<i>mecA</i>	OXA	CFO	AMP	AMO	PENG	AMC	ASB
1(7)	+	R	R	R	S	R	S	S
2(6)	+	R	R	S	S	R	S	S
3(5)	+	R	R	R	R	R	S	S
4(3)	+	R	S	S	S	S	S	S
5(1)	+	R	R	R	S	S	S	S
6(1)	+	R	R	R	S	R	S	R
7(1)	+	R	S	S	S	R	S	S
8(1)	+	R	R	S	S	R	R	S

*OXA: oxacilina; CFO: cefoxitina; AMP: ampicilina; AMO: amoxicilina; PENG: penicilina G; AMC: amoxicilina + ácido clavulânico; ASB: ampicilina+ sulbactam.

A maioria dos *Staphylococcus* spp. *mecA*-positivos (n= 25) apresentou perfil de resistência a diferentes classes de antimicrobianos, dentre estas as fluoroquinolonas, cefalosporinas, macrolídeos, lincosamida, glicopeptídeos e aminoglicosídeos. Um total de 68% (17/25) isolados apresentou o perfil de multirresistência, uma vez que foram resistentes a pelo menos três classes diferentes de antibióticos. Dentre estes isolados 41,2% (7/17) correspondeu a espécie *Staphylococcus aureus*, 35,3% (6/17) à *S. intermedius* e 23,5% (4/17) à SCN (Tabela 5).

Tabela 5. Perfil de resistência a diferentes classes de antibióticos de *Staphylococcus* spp. *mecA*-positivos (n= 25).

Perfis (n)	<i>mecA</i>	ENO	CIP	NOR	CFL	CFO	CRO	ERI	AZI	CLI	VAN	GEN	LNZ
1(4)	+	S	S	S	R	R	R	R	R	R	S	S	S
2(3)	+	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	S	S
3(3)	+	S	S	S	S	R	R	R	R	R	S	S	S
4(2)	+	S	S	S	S	S	S	R	S	S	S	S	S
5(2)	+	S	S	S	S	R	R	R	R	R	R	S	S
6(1)	+	R	S	S	R	R	R	R	S	S	S	S	S
7(1)	+	R	S	S	S	R	R	S	R	R	S	S	S
8(1)	+	R	R	S	S	R	R	S	R	R	S	S	S
9(1)	+	S	S	S	S	S	R	R	R	R	S	R	S
10(1)	+	S	S	S	R	R	R	S	S	S	S	S	S
11(1)	+	S	S	S	S	R	R	S	S	S	S	S	S
12(1)	+	S	S	S	R	R	S	R	R	R	S	S	S
13(1)	+	S	S	S	S	S	R	S	S	S	S	S	S
14(1)	+	S	R	S	S	R	R	S	S	S	S	S	S
15(1)	+	S	S	R	S	R	R	S	S	S	S	S	S
16(1)	+	R	S	S	S	R	R	S	S	S	S	S	S

* ENO: enrofloxacin; CIP: ciprofloxacina; NOR: norfloxacina; CFO: cefoxitina; CFL: cefalotina; CRO: ceftriaxona; AZI: azitromicina; ERI: eritromicina; CLI: clindamicina; VAN: vancomicina; GEN: gentamicina; LNZ: linezolida; n= número de isolados.

O surgimento de amostras de *Staphylococcus* spp. multirresistentes nas últimas décadas foi relacionado com a pressão seletiva exercida pelo uso indiscriminado de antimicrobianos em medicina veterinária (FAGUNDES; OLIVEIRA, 2004). Esta resistência proporciona aos *Staphylococcus* spp. uma vantagem seletiva para a colonização e infecção, limitando a ação terapêutica da maioria dos antimicrobianos disponíveis para o tratamento destas infecções (STRUELLEN et al., 1992; SHLAES et al., 1997).

5.5.4. Avaliação dos testes fenotípicos para detecção da suscetibilidade à oxacilina em *Staphylococcus* spp.

De acordo com os resultados obtidos nas cinco técnicas foi calculado a sensibilidade e especificidade para determinar a acurácia dos testes na detecção fenotípica da resistência à oxacilina em relação a expressão do gene *mecA* detectado pela técnica de PCR. Esta análise permite avaliar quais técnicas são realmente capazes de detectar os isolados verdadeiramente resistentes (sensibilidade) e sensíveis à oxacilina (especificidade). A Tabela 6 apresenta os valores encontrados após a análise estatística considerando todos os isolados de *Staphylococcus* spp..

Tabela 6. Percentual de sensibilidade, especificidade, valor preditivo positivo e negativo dos testes de suscetibilidade à oxacilina em *Staphylococcus* spp. (n=100)

	DDS*	DDM*	AS*	MC*	DA*
Sensibilidade	54%	27%	100%	80%	73%
Especificidade	67%	77%	85%	24%	22%
Valor preditivo positivo	33%	30%	70%	26%	25%
valor preditivo negativo	82%	75%	100%	78%	70%

*Testes de suscetibilidade à oxacilina = DDS: difusão em disco simples; DDM: difusão em disco modificada; AS: ágar “screen”; MC: microdiluição em caldo; DA: microdiluição em ágar.

De acordo com os resultados obtidos, o teste “ágar screen” apresentou sensibilidade de 100%, o teste de microdiluição em caldo apresentou sensibilidade de 80%, ao passo que as outras técnicas apresentaram sensibilidade baixa e igual a 27% para difusão em disco modificada, 54% para a técnica de difusão em disco simples e 73% para a diluição em ágar. A sensibilidade das técnicas fenotípicas como método preditivo da presença do gene *mecA* é dada pelos isolados que são resistentes nos testes fenotípicos e que possuem o gene. Em relação à especificidade, o teste “Agar screen” apresentou valores em torno de 85%, o teste de difusão em disco modificada apresentou valores de 77%, o teste de difusão em disco simples 67%, e a CIM em caldo e em ágar, apresentaram 24% e 22%, respectivamente. A especificidade é o poder de distinguir os isolados sensíveis aos testes fenotípicos e que não apresentam o gene *mecA* (PEREIRA, 1995). De acordo com os resultados obtidos, o teste “Agar screen” apresentou sensibilidade significativa, sendo o mais fidedigno na detecção da resistência à oxacilina em isolados positivos para o gene *mecA* (Figura 24).

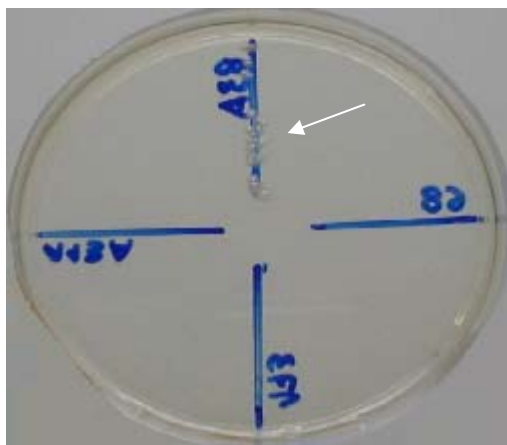


Figura 24. Resistência à oxacilina avaliada através do teste de ágar “screen”. A seta indica as colônias crescidas em meio contendo oxacilina (6µl/mL).

Muitos trabalhos vêm validando este teste como sendo capaz de detectar isolados de *Staphylococcus* spp. resistentes à oxacilina e positivos para o gene *mecA* (SWENSON et al., 2005). Este é um teste simples e bastante econômico quando comparado aos testes de avaliação da concentração inibitória mínima, mas que deve ser executado de forma cuidadosa, onde cada colônia crescida, mesmo que pequena, deve ser considerada resistente. Deve-se também averiguar corretamente o tempo e temperatura de incubação do inóculo, bem como em todos os testes.

A detecção do gene *mecA*, é considerada o método padrão ouro para confirmação de isolados oxacilina resistentes. No entanto, relatos da literatura são controversos no que diz respeito a estabilidade do gene *mecA*. Sakoulas e colaboradores (2001) afirmaram que espécies estafilocócicas *mecA* positivas apresentam instabilidade genética e, podem perder o gene resultando em subpopulações sensíveis ao antibiótico o que explicaria o perfil heterogêneo de resistência à oxacilina que vem sendo detectado. Por outro lado, Lowy (2003) afirma que em uma população bacteriana heteroresistente, todos os indivíduos são portadores do gene *mecA* e que condições ambientais e próprias de cada população seriam determinantes na expressão da resistência. Tal idéia é corroborada com estudos como o de Aarestrup e colaboradores (2001) que preconizam a adição de NaCl ao meio de cultivo para indução do fenótipo de resistência. Esta medida foi implementada pelo CLSI com o objetivo de aumentar a acurácia na detecção fenotípica da resistência à oxacilina. Tais incongruências devem ser utilizadas como base para uma avaliação criteriosa pela comunidade científica para a escolha de testes fenotípicos que sejam mais conclusivos na predição da resistência à oxacilina e no estabelecimento de populações sensíveis ou resistentes a este antibiótico.

A resistência à oxacilina em isolados que não apresentam o gene *mecA*, pode ser explicada pela hiperprodução de β -lactamase ou ainda pode está associada à modificação de afinidade a outras “PBPs”, principalmente a PBP3 e PBP4 (BROWN et al., 2001; McKINNEY et al., 2001; PETINAKI et al., 2001).

5.5.5. Teste de suscetibilidade à cefoxitina e gene *mecA*

O teste de difusão em disco utilizando-se cefoxitina detectou 53% de isolados resistentes. O teste de difusão utilizando o disco de cefoxitina foi mais sensível na detecção da resistência em isolados *Staphylococcus* spp. *mecA*-positivos, que o disco de oxacilina frente a todos os 100 isolados de *Staphylococcus* spp. avaliados (Tabela 7).

Tabela 7. Percentual de sensibilidade, especificidade, valor preditivo positivo e negativo dos testes de difusão com disco de oxacilina e cefoxitina em *Staphylococcus* spp. *mecA*-positivos (n=100).

	Sensibilidade	Especificidade	VPP	VPN
Oxacilina	54%	67%	33%	82%
Cefoxitina	92%	61%	45%	96%

*VPP: valor preditivo positivo, VPN: valor preditivo negativo.

Recentemente o CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute, 2008), padronizou o uso do disco de cefoxitina, uma cefalosporina de segunda geração, para correlação com a presença do gene *mecA* por ser um forte indutor de seu sistema regulatório. Segundo Murakami e colaboradores (1991), a cefoxitina induz a produção de PBP2a e têm provavelmente uma afinidade elevada para PBP2 estafilocócica.

Estudos têm relatado maior eficácia em testes de difusão em disco com cefoxitina correlacionado com a presença do gene *mecA*, em relação ao uso da oxacilina (DANCER, 2001). Skov e colaboradores (2003) e Cauwelier e colaboradores (2004), obtiveram 100% de sensibilidade e especificidade utilizando o teste de difusão em disco com cefoxitina. No entanto, Hussain e colaboradores (2000), encontraram resultados muito semelhantes para a sensibilidade e especificidade da difusão em disco de oxacilina e cefoxitina. Palazzo e Darini (2006) afirmaram que o método de difusão em disco com cefoxitina e oxacilina podem ser utilizados como testes iniciais para determinação da suscetibilidade à meticilina em isolados de *Staphylococcus* spp., mas ressaltaram o fato de que a combinação dos dois métodos pode minimizar erros.

5.5.6. Detecção de Genes reguladores do sistema *mec* em *Staphylococcus* spp.

A técnica de PCR foi aplicada para a detecção de genes reguladores do sistema *mec* (*mecI-mecR1*), com o objetivo de verificar o perfil fenotípico de heterorresistência à oxacilina (Tabela 8).

No presente estudo 56% (14/25) dos isolados positivos para o gene *mecA* foram negativos para o gene *mecI* e fenotipicamente resistentes à oxacilina na maioria dos testes. Estes resultados corroboram com trabalho desenvolvido por Lee (2006) que relatou que a produção constitutiva da PBP2A, mediada pelo gene *mecA*, ocorre quando a atividade repressora do gene *mecI* for alterada por mutações e deleções.

O gene *mecI* foi detectado em 8% (8/100) dos *Staphylococcus* spp., tendo sido considerado positivo o isolado que amplificou para ao menos um dos genes avaliados (*mecIA*:639pb; *mecIB*: 348pb). Do total de 25 isolados *mecA* positivos, quatro (4/25) *Staphylococcus* spp. foram positivos também para o genes *mecI* e apresentaram fenótipo de sensibilidade à oxacilina na maioria dos testes realizados. Este resultado corrobora com Archer e colaboradores (1995) que relataram a atividade repressora do gene *mecI* como sendo a responsável pela expressão de fenótipos de sensibilidade à oxacilina em isolados de *Staphylococcus* spp. *mecA*-positivos.

Tabela 8. Genes do sistema regulatório *mec* e fenótipo de resistência à oxacilina em *Staphylococcus* spp. (n=100)

Perfil (n de isolados)	Fenótipo de resistência à oxacilina						Genes do sistema regulatório <i>mec</i>		
	DDM	DDS	AS	MC	DA	CFO	<i>mecA</i>	<i>mecI</i>	<i>mecR1</i>
1(14)	S	S	S	R	R	S	-	-	-
2(13)	S	S	S	R	R	R	-	-	-
3(12)	R	R	R	S	R	S	-	-	-
4(10)	S	S	R	R	R	S	-	-	-
5(8)	R	S	R	S	S	S	-	-	-
6(6)	S	R	S	R	R	R	-	-	-
7(4)	S	S	S	S	S	S	-	-	-
8(3)	R	R	R	R	R	R	+	-	-
9(3)	S	S	R	R	R	R	+	-	-
10(3)	S	S	R	R	R	R	+	-	+
11(3)	S	S	S	S	S	S	+	+	-
12(2)	S	R	R	R	R	R	+	-	+
13(2)	S	S	S	R	R	S	-	+	-
14(2)	S	S	R	R	S	R	+	-	-
15(1)	S	S	R	S	S	R	+	-	+
16(1)	S	S	R	S	S	R	+	-	+
17(1)	R	S	S	S	S	S	-	-	+
18(1)	S	S	S	S	R	R	-	-	-
19(1)	S	S	R	S	S	S	+	+	-
20(1)	R	R	R	R	S	S	+	-	-
21(1)	R	R	R	S	S	R	+	-	-
22(1)	R	S	R	R	R	R	+	-	-
23(1)	S	S	R	S	R	R	+	-	-
24(1)	S	S	R	R	R	S	+	-	-
25(1)	S	R	R	R	R	R	+	-	-
26(1)	S	S	R	R	R	S	+	+	+
27(1)	S	S	R	S	R	R	+	+	+
28(1)	S	R	R	R	S	R	+	+	+
29(1)	S	R	R	R	R	R	+	+	+

*DDM: difusão em disco modificada; DDS: difusão em disco simples; AS: ágar “screen”; MC: microdiluição em caldo; DA: microdiluição em Agar; CFO: difusão em disco com cefoxitina.

O gene *mecR1* foi detectado em 12% (12/100) dos isolados, deste total sete (7/12) isolados também foram positivos para o gene *mecA* e apresentaram fenótipo de resistência à oxacilina em pelo menos dois testes realizados. Este resultado corrobora com a teoria relatada por McKinney e colaboradores (2001) a respeito do controle exercido pelos genes *mecR1* e *mecI* sobre o gene *mecA*. Segundo os autores o produto do gene *mecI* reprime a expressão do *mecA* ao se ligar ao operador. Esta repressão pode ser revertida pela presença de oxacilina ou qualquer outro β -lactâmico no meio (mecanismo de indução). Já a proteína MecR1 (produto do gene *mecR1*) é uma proteína de membrana envolvida em um sistema de transdução de sinal, qual reconhece a presença de β -lactâmicos através de seu domínio extracelular. Seu domínio citoplasmático apresenta atividade de protease e degrada a MecI, permitindo assim a transcrição do gene *mecA* e consequentemente o fenótipo de resistência à oxacilina.

No presente estudo foram detectados quatro (4/25) isolados com todos os genes do sistema *mec* (*mecA-mecI-mecR1*) e estes apresentaram resistência à oxacilina na

maioria dos testes fenotípicos. Estes resultados não corroboram com os trabalhos de Hiramatsu (1995) e Kuwahara-Arai e colaboradores (1996) que detectaram em cepas de *Staphylococcus aureus*, cujos genes estavam intactos, o fenótipo de sensibilidade à oxacilina, devido a forte repressão do gene *mecI* sobre o gene *mecA*. Estes autores classificaram estas cepas de pré-MRSA e segundo Lee (2005), em estudo com *S. aureus* isolados de bovinos, suínos e aves, foi encontrada prevalência dessas cepas em animais comparadas às humanas.

No presente estudo, três isolados apresentaram resultados convergentes quanto a detecção dos genes deste sistema. A literatura aponta para o fato de que podem ocorrer mudanças nos genes do sistema regulatório *mec* desencadeadas por mutações, fagos, plasmídeos e transposons gerando perfis genéticos diferenciados. Katayama e colaboradores (2001) relataram a existência de cinco classes diferentes de complexo *mec*. A classe A, que contém o complexo *mecR1* e *mecI* intacto. A classe B, que contém o gene *mecI* e o domínio citoplasmático do gene *mecR1* truncados por uma IS1272. A classe C que subdivide-se em, C1 que contém o domínio citoplasmático do gene *mecR1* e todo o gene *mecI* truncados pela IS431 e C2 que possui tanto o domínio citoplasmático quanto o transmembrana do gene *mecR1* e todo o gene *mecI* truncados pela IS43. Na classe D o gene *mecI* está deletado e o domínio transmembrana do *mecR1* está truncado pela IS431. Esta diversidade de classes do complexo *mec* podem explicar em parte a disparidade de perfis encontrados no presente estudo, quando foram avaliados o genótipo e fenótipo de resistência à oxacilina. Este fato aponta para a necessidade de futuras avaliações de sequenciamento genético dos isolados de *Staphylococcus* spp. para se traçar uma correlação efetiva entre o genótipo e o fenótipo de resistência à oxacilina.

Outros trabalhos científicos baseados em sequenciamento genético também detectaram a ocorrência de isolados que não apresentam todos os genes do sistema *mec* e associaram este fato a possíveis deleções genéticas. Petinaki e colaboradores (2001) realizaram sequenciamento do sistema *mec* relataram que de um total de 49 cepas de *Staphylococcus aureus mecA*-positivos, 13 cepas apresentaram os genes *mecR1-mecI* intactos. Os autores relataram que 11 cepas *Staphylococcus aureus mecA*-positivos carregavam apenas o gene *mecR1* e apresentaram deleção no gene *mecI*, e que sete (7/49) não carregavam os genes desse sistema regulatório. Os autores também detectaram deleções do sistema regulatório *mec* em diferentes espécies de *Staphylococcus* coagulase-negativos e em *S. epidermidis*. Rosato e colaboradores (2003) avaliaram 73 isolados de *S. aureus* e detectaram os genes *mecA*, *mecR1*, *mecI* intactos em 56 isolados, os outros 17 isolados apresentaram deleções no gene *mecI*.

5.5.7. Produção de β -lactamases por *Staphylococcus* spp.

5.5.7.1. Testes fenotípicos de detecção da produção de β -lactamases

Um total de 58% dos isolados foi positivo para produção de β -lactamases a partir do teste detecção em fita. O teste nitrocefina detectou 38% (38/100) de isolados positivos para a produção de β -lactamases, sendo este o teste recomendado pelo CLSI (2008). De Oliveira e colaboradores (2000), ao testar 811 isolados de *S. aureus* detectaram 57% de positividade para a produção da enzima.

A Tabela 9 apresenta o perfil de suscetibilidade a alguns antibióticos β -lactâmicos dos 38 isolados *Staphylococcus* spp. positivos para β -lactamases pelo teste de nitrocefina.

Tabela 9. Perfil de suscetibilidade a alguns antibióticos β -lactâmicos dos *Staphylococcus* spp. produtores de β -lactamase (n=38) detectada através do teste de nitrocefina.

Perfil(n* isolados)	AMP	AMO	PENG	ASB*	AMC*	Teste de Nitrocefina
1(10)	R	S	R	S	S	+
2 (8)	S	S	S	S	S	+
3 (7)	S	S	R	S	S	+
4 (6)	R	R	R	S	S	+
5 (5)	R	R	R	R	S	+
6 (2)	R	R	R	S	R	+

*AMP: ampicilina; AMO: amoxicilina; PENG: penicilina G; ASB: ampicilina + sulbactam; AMC: amoxicilina + ácido clavulânico; n: número de isolados.

Foi possível detectar que 34,2% (13/38) dos isolados positivos para produção de β -lactamases também apresentaram resistência aos três antibióticos β -lactâmicos avaliados: penicilina G, ampicilina e amoxicilina (perfis 4, 5 e 6). O perfil 1 apresentou resistência à penicilina G e ampicilina (26,3%, 10/38), e o perfil 3 apenas à penicilina G (18,4%, 7/38). O perfil 5 apresentou resistência de 13,1% (5/38) à associação ampicilina + sulbactam e o perfil 6 de 5,2% (2/38) à amoxicilina + ácido clavulânico. Os isolados nitrocefina-negativos, foram em sua maioria sensíveis às associações, antibiótico β -lactâmico + inibidores de β -lactamase (97,8%, 60/62).

5.5.7.2. Detecção dos genes do sistema *blaZ* em *Staphylococcus* spp.

A literatura relata que a produção de β -lactamases em *Staphylococcus* spp. é regulada pelos genes do sistema regulatório *blaZ* (*blaZ*, *blaI* e *blaR1*). Estes genes foram detectados em *Staphylococcus* spp. de origem animal por Olsen e colaboradores (2006) que investigaram 187 *Staphylococcus* spp. de casos de mastite bovina e relataram uma prevalência de 76,5% na detecção dos genes do sistema *blaZ*.

No presente estudo os genes do sistema *blaZ* (*blaZ-blaI-blaR1*) que regulam a produção de β -lactamases foram investigados através da técnica de PCR nos 100 isolados de *Staphylococcus* spp. identificados (Figura 25) (Tabela 10).

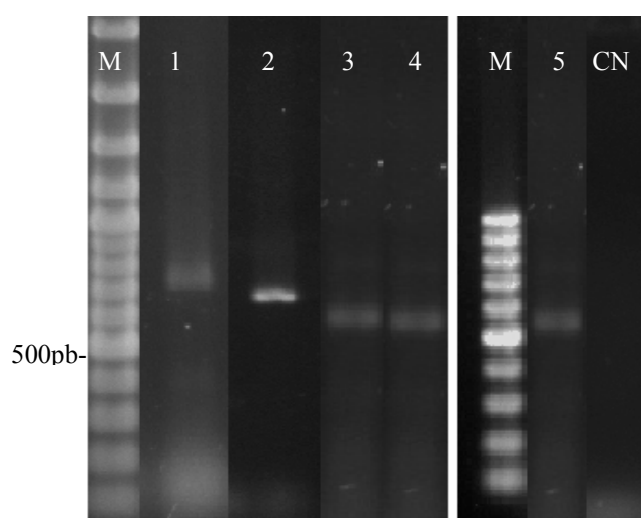


Figura 25. Genes *blaZ* dos *Staphylococcus* spp. de infecções de animais de companhia em gel de agarose a 1,5%. M: marcador de peso molecular (100pb); 1- isolado positivo para Gene *blaZB* (737pb); 2- positivo para gene *blaZA* (639pb); 3- positivo para gene *blaIA* (513pb); 4- positivo para gene *blaIB* (513pb); 5- positivo para gene *blaRI* (PB); CN: controle negativo.

Uma vez que a resistência à oxacilina pode também está relacionada à produção de enzimas β -lactamases inativadoras deste antibiótico, a tabela 10 apresenta os dados de resistência à oxacilina e detecção dos genes do sistema *blaZ*.

Tabela 10. Detecção dos genes *blaZ* e resistência à oxacilina em *Staphylococcus* spp. (n=32).

Perfil (n de isolados)	Resistência à OXA						Genes do sistema <i>blaZ</i>			
	DDM	DDS	AS	MC	DA	CFO	<i>mecA</i>	<i>blaZ</i>	<i>blaI</i>	<i>blaR1</i>
1(4)	S	S	S	S	S	S	-	+	+	-
2 (3)	R	S	R	S	S	S	-	+	-	-
3 (3)	S	S	S	R	R	S	-	+	+	-
4 (2)	S	S	S	R	R	R	-	+	-	-
5 (2)	S	S	S	S	S	R	+	+	+	-
6 (2)	S	S	R	S	S	R	+	+	+	-
7 (2)	R	R	R	S	R	S	-	+	+	-
8 (2)	R	R	R	S	R	S	-	+	-	-
9 (2)	S	S	R	R	R	S	-	+	+	+
10 (1)	S	S	S	S	S	S	+	+	+	-
11 (1)	S	S	S	R	R	R	-	+	+	-
12 (1)	S	S	R	R	R	S	-	+	+	-
13 (1)	S	S	R	S	S	S	+	+	+	-
14 (1)	R	S	R	S	S	S	-	+	+	-
15 (1)	R	S	S	S	S	S	-	+	+	-
16 (1)	R	R	S	R	R	R	-	+	-	-
17 (1)	R	S	S	R	R	R	-	+	-	-
18 (1)	S	R	S	R	R	R	-	+	+	+
19 (1)	S	S	S	R	R	S	-	-	+	-

*OXA: oxacilina; DDS: difusão em disco simples; DDM: difusão em disco modificada; AS: ágar “screen”; MC: microdiluição em caldo; DA: microdiluição em ágar; CFO: difusão em disco com cefoxitina.

No presente estudo foram detectados 32% (32/100) isolados positivos para os genes de sistema *blaZ*.

Foi possível detectar que 28,1% (9/32) dos isolados foram positivos apenas para o gene *blaZ* (indutor). Estes isolados foram *mecA*-negativos e apresentaram-se fenotipicamente resistentes à oxacilina, corroborando com a teoria do envolvimento de β -lactamases como possível mecanismo de resistência à oxacilina em *Staphylococcus* spp..

O sistema completo *blaZ-blaI- blaR1* foi detectado em 9,4% (3/32) dos isolados, que foram negativos para o gene *mecA* e fenotipicamente resistentes à oxacilina. Este resultado encontra suporte em trabalhos científicos que definem o papel dos genes *blaI* e *blaR1* como componente reguladores da síntese da β -lactamase. O gene *blaI* está localizado em uma região entre os genes reguladores *blaR1* e *blaZ*. A ligação do antibiótico β -lactâmico ao componente de membrana *BlaR1* promove um sinal que é transmitido através da membrana para o citoplasma da célula. Este sinal é responsável pela remoção do componente repressor (*blaI*) localizado na região entre os genes *blaR1* e *blaZ*, permitindo assim a transcrição do gene *blaZ* e consequentemente da enzima β -lactamase determinando o fenótipo de resistência (LEWIS; DIKE, 2005).

Foi possível detectar a presença dos genes *blaZ-blaI* em 59,3% (19/32) dos *Staphylococcus* spp. avaliados. Deste total 28,6% (4/14) *Staphylococcus* spp. *mecA*-

negativos foram fenotipicamente sensíveis à oxacilina, confirmando a atividade inibitória da porção *blaI* sobre a expressão da produção de β -lactamase.

Foi possível também detectar a presença dos genes *blaZ-blaI* em 18,7% (6/32) *Staphylococcus* spp. *mecA*-positivos e fenotipicamente sensíveis à oxacilina. Este resultado corrobora com dados de estudos anteriores baseados no sequenciamento completo do gene *mecA*. Este estudo relata a existência de homologia entre a sequência “upstream” do gene *mecA* com a sequência “upstream” do gene *blaZ*. Essa sequência divergente comum especifica as proteínas sinalizadoras MecI e MecR1, que são similares as BlaI e BlaR1. A resistência à oxacilina em *Staphylococcus* spp. pode então ser controlada pelo sistema regulador *blaI* e *blaR1*. Logo o sistema BlaI regulado pelo gene *blaI* pode inibir a síntese tanto da β -lactamase quanto da PBP2a (MCKINNEY et al., 2001).

Outros 28,1% (9/32) dos *Staphylococcus* spp. *mecA*-negativos, foram positivos para os genes *blaZ-blaI* e fenotipicamente resistentes à oxacilina. Este resultado aponta para o envolvimento de outros mecanismos de resistência, tais como, outras classes de PBPs (por exemplo, PBP3 e PBP4).

5.5.7.3. Detecção de genes do sistema regulatório *blaZ* em *Staphylococcus* spp. resistentes a múltiplos antibióticos β -lactâmicos

O presente estudo buscou correlacionar a presença de genes reguladores da produção de enzimas β -lactamases (genes *blaZ*) com o fenótipo de resistência aos antibióticos β -lactâmicos de *Staphylococcus* spp. provenientes de processos infecciosos de animais de companhia com o intuito de verificar a ocorrência desse possível mecanismo de resistência antimicrobiana (Tabela 11).

Foi detectado apenas o gene *blaZ* em 9% (9/100) dos isolados de *Staphylococcus* spp. que foram positivos para o teste nitrocefín e resistentes pelo menos a penicilina G, implicando uma possível atividade indutora do gene *blaZ* sobre a produção de β -lactamases. Destes 9 isolados, 2 foram *mecA* positivos (22,2%), podendo ter ocorrido também a expressão de PBP2a. Os demais 7 isolados *blaZ* positivos (7/9, 77,8%) foram *mecA* negativos e resistentes a pelo menos um antibiótico β -lactâmico. Todos os isolados *blaZ* positivos expressaram resistência a pelo menos um antibiótico β -lactâmico e foram positivos no teste de nitrocefín, independente da presença do gene *mecA*, o que parece implicar este gene na mediação desta resistência.

Um total de 19% (19/100) dos isolados foi positivo para os genes *blaZ* e *blaI*. A ação inibitória da expressão do gene *blaI* sobre o gene *blaZ* implicaria na ausência da produção de β -lactamases nestes isolados acarretando um fenótipo de sensibilidade. Dois isolados (10,5%) apresentaram sensibilidade a todos os β -lactâmicos avaliados, no entanto, foi observado que 36,8% dos isolados (7/19) foram resistentes a pelo menos um antibiótico β -lactâmico e positivos para o gene *mecA*, que pode estar implicado no fenótipo de resistência detectado através da expressão da PBP2a. Os demais 10 isolados (52,6%) foram negativos para o gene *mecA* porém expressaram alguma resistência, o que deve ocorrer por outros mecanismos não elucidados neste estudo. Destes, 5 isolados (50%) foram positivos para detecção de β -lactamases através do teste de nitrocefín, o que pode indicar a expressão destas enzimas por meio de outros genes que não os do sistema *BlaZ*.

Tabela 11. Perfis de resistência à antibióticos β -lactâmicos e a presença de genes *blaZ* de *Staphylococcus* spp. (n=100).

n de isolados	<i>blaZ</i>	<i>blaI</i>	<i>blaRI</i>	AMP	AMO	PENG	AMC	ASB	Testes de Nitrocefina	<i>mecA</i>
Isolados positivos para gene <i>blaZ</i> (n=9)										
4	+	-	-	S	S	R	S	S	+	-
3	+	-	-	R	S	R	S	S	+	-
2	+	-	-	R	S	R	S	S	+	+
Isolados positivos para os genes <i>blaZ</i> e <i>blaI</i> (n=19)										
3	+	+	-	R	R	R	S	S	-	+
2	+	+	-	R	R	R	S	S	-	+
1	+	+	-	S	S	R	S	S	-	+
1	+	+	-	R	S	S	S	S	-	+
4	+	+	-	R	S	R	S	S	-	-
2	+	+	-	S	S	S	S	S	-	-
1	+	+	-	S	S	R	S	S	-	-
3	+	+	-	R	S	R	S	S	+	-
1	+	+	-	S	S	R	S	S	+	-
1	+	+	-	R	R	R	S	S	+	-
Isolados positivos para os genes <i>blaZ</i>, <i>blaI</i> e <i>blaRI</i> (n=3)										
1	+	+	+	R	R	R	R	S	+	-
1	+	+	+	R	R	R	S	R	+	-
1	+	+	+	R	S	R	S	S	+	-
Isolado positivo para gene <i>blaI</i> (n=1)										
1	-	+	-	S	S	R	S	S	-	-
Isolados negativos para os genes do sistema <i>blaZ</i>										
6	-	-	-	R	S	R	S	S	-	+
4	-	-	-	S	S	S	S	S	-	+
1	-	-	-	R	R	R	S	S	-	+
1	-	-	-	S	S	R	S	S	-	+
2	-	-	-	S	S	R	S	S	+	+
2	-	-	-	R	R	R	S	S	+	+
7	-	-	-	R	S	R	S	S	+	-
4	-	-	-	R	R	R	S	S	+	-
3	-	-	-	S	S	R	S	S	+	-
1	-	-	-	R	R	R	R	S	+	-
1	-	-	-	R	R	R	R	S	+	+
1	-	-	-	R	R	S	S	R	+	+
16	-	-	-	R	S	R	S	S	-	-
9	-	-	-	S	S	S	S	S	-	-
5	-	-	-	R	R	R	S	S	-	-
2	-	-	-	S	S	R	R	S	-	-
1	-	-	-	S	S	R	S	S	-	-
1	-	-	-	S	S	R	R	S	-	-
1	-	-	-	R	S	S	S	S	-	-

*AMP: ampicilina; AMO: amoxicilina; PENG: penicilina G; AMC: amoxicilina + ácido clavulânico; ASB: ampicilina + sulbactam.

Em apenas 3% (3/100) dos *Staphylococcus* spp. foi possível detectar todos os genes do sistema *blaZ*, *blaI* e *blaRI*. Estes isolados foram positivos no teste de nitrocefina e resistentes a três antibióticos β -lactâmicos (penicilina, ampicilina e amoxicilina) e negativos para o gene *mecA* confirmando a forte ação regulatória do gene

blaRI sobre o *blaI*. Da mesma forma, Yazdankhah e colaboradores (2009) avaliaram 11 isolados de *Staphylococcus* spp. de casos de mastite bovina e detectaram oito (8/11, 72,7%) isolados positivos para os genes *blaZ*, *blaI* e *blaR1* que foram resistentes a penicilina e produtores de β -lactamases.

O teste do nitrocefim foi avaliado quanto à sensibilidade, especificidade, valor preditivo negativo e positivo para avaliar sua capacidade em detectar a produção de β -lactamases regulada pelo gene *blaZ*, considerando o fato de que uma vez positivo para o teste do nitrocefim o isolado deveria apresentar o gene *blaZ*.

A Tabela 12 apresenta os valores encontrados após a análise estatística considerando os 100 isolados de *Staphylococcus* spp..

Tabela 12. Percentual de sensibilidade, especificidade, valor preditivo positivo e negativo do teste de nitrocefim com a detecção do gene *blaZ*.

Teste de Nitrocefim	
Sensibilidade	100%
Especificidade	70%
VPP*	31%
VPN*	100%

*VPP: valor preditivo positivo; VPN: valor preditivo negativo

5.5.8. *Staphylococcus* spp. e gene *femA*

A literatura descreve que o gene *femA* (132 pb) como um marcador da específico de *Staphylococcus aureus*. No presente estudo este gene foi detectado em 31,8% (7/22) dos *S. aureus* avaliados (Figura 26).

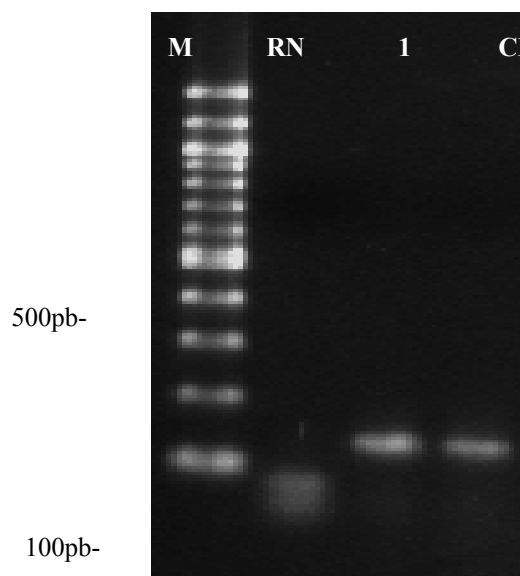


Figura 26. Gene *femA* (132 pb) de *Staphylococcus aureus* isolados de infecções de animais de companhia em gel de agarose (1,5%). M: marcador de peso molecular (100pb), RN: reação negativa, 1: isolado positivo (1), CP: controle positivo.

Em trabalho desenvolvido por Iamafuku e colaboradores (1994), o gene *femA* também não foi detectado em todos os *Staphylococcus aureus* e os autores relataram uma maior correlação entre este gene e a presença do gene *mecA* e consequente resistência à meticilina. No presente trabalho, de todos os *S. aureus* positivos para o gene *femA*, um total de 63,6% (7/11) também apresentou o gene *mecA* (Tabela 13). Segundo Vannuffel e colaboradores (1995) o gene *femA* auxilia o gene *mecA* a expressar um alto nível de resistência aos β -lactâmicos. Estudos revelaram que a inativação do gene *femA* aumenta a suscetibilidade à meticilina em *S. aureus*. Este gene vem sendo associado a uma possível alteração na formação da cadeia de pentaglicina, alvo de alguns β -lactâmicos (MAIDHOF et al., 1991).

Tabela 13. Detecção dos genes *femA* e *mecA* em *Staphylococcus* spp. isolados de infecções em animais de companhia.

	<i>S. aureus</i> (n=22)			<i>S. intermedius</i> (n=35)				<i>S. hyicus</i> (n=13)				SCN (n=12)		
<i>mecA</i>	+	+	-	+	+	-	-	+	+	-	-	+	+	-
<i>femA</i>	+	-	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	-
n isolados	7	5	10	1	7	8	19	2	1	5	5	1	6	5

O presente estudo também detectou o gene *femA* em outras espécies de *Staphylococcus*, que não *S. aureus*. Foi possível detectar o gene *femA* em 53,8% (7/13) dos *S. hyicus* e em 25,7% (9/35) dos *S. intermedius* e em uma espécie de SCN (8,3%, 1/12), *S. epidermidis* (Tabela 13). Estes resultados contrariam relatos a respeito da especificidade desse gene em relação aos *S. aureus*, e apontam para o fato de que a transferência interespecífica de genes pode está ocorrendo em bactérias que compõe a microbiota de sítios orgânicos em animais de companhia.

5.6. Avaliação da possível resistência cruzada entre azitromicina e oxacilina em *Staphylococcus* spp. isolados de infecções em animais de companhia

Estudos relatam a possibilidade de resistência cruzada entre oxacilina e azitromicina em isolados de *Staphylococcus* spp. através da transferência horizontal do gene *mecA* (MASKEL et al., 1990; NEU, 1991; PETERS et al., 1992). Neu (1991) observou que a CIM_{50/90} calculada de azitromicina para isolados de *S. aureus* suscetíveis à oxacilina foi de 0,5 e 1,0 $\mu\text{g/mL}$, porém os valores aumentaram consideravelmente em relação aos MRSA (CIM_{50/90} >128 $\mu\text{g/mL}$). O presente estudo correlacionou a presença do gene *mecA* com o perfil fenotípico e genotípico de resistência à azitromicina (Tabela 14).

Foi observado que 60% (15/25) dos *Staphylococcus* spp. *mecA*-positivos foram fenotipicamente resistentes à azitromicina em pelo menos um teste e positivos para os genes *erm* (Tabela 15). Corroborando com estudos que apontam para o desenvolvimento de casos de resistência e a circulação de genes de resistência à macrolídeos, tais como genes *erm* e *mef* em isolados de *Staphylococcus* spp. portadores do gene *mecA* (SCHMITZ et al., 2000).

Tabela 14. Genótipo e fenótipo de resistência à azitromicina em *Staphylococcus* spp. *mecA*-positivos. (n=25 isolados).

Perfil (n isolados)	Genótipo de resistência à oxacilina	Genótipo de resistência à azitromicina			Fenótipo de resistência à azitromicina		
	<i>mecA</i>	<i>ermA</i>	<i>ermB</i>	<i>ermC</i>	DD	MC	DA
1(4)	+	-	-	+	R	R	R
2(3)	+	-	-	+	S	R	R
3(3)	+	-	-	-	S	S	S
4(2)	+	-	-	-	R	R	R
5(2)	+	-	-	-	S	S	S
5(2)	+	-	-	-	S	R	R
6(1)	+	+	-	-	R	R	R
7(1)	+	+	-	-	R	S	S
8(1)	+	+	-	-	S	R	S
9(1)	+	-	+	+	S	R	R
10(1)	+	-	-	+	R	S	S
11(1)	+	+	-	-	R	S	S
12(1)	+	-	-	+	R	R	R
13(1)	+	-	-	-	R	S	R
14(1)	+	-	-	-	R	S	S

*DD: teste de difusão em disco; MC: teste de microdiluição em caldo; DA: teste de diluição em Agar.

O gene *ermC* foi detectado em 28% (7/25) dos *Staphylococcus* spp. *mecA*-positivos e apresentou-se prevalente em relação aos genes *ermA* presente em 16% (4/25) e *ermB* em 4% (1/25) dos isolados, respectivamente, ao contrário do que é apontado pela literatura. Schmitz e colaboradores (2000) e Lim e colaboradores (2002) relataram a prevalência de isolados MRSA *ermA*-positivos, no entanto, estes autores discutem que o gene *ermA* esteve associado à resistência à macrolídeos até a década de 70, e que o gene *ermC* tornou-se prevalente em *Staphylococcus aureus* recentemente.

Os resultados detectados apontam para o fato de que a expressão da em isolados de *Staphylococcus* spp. *mecA*-positivos pode reduzir a eficiência da azitromicina quando estes agentes estão envolvidos na etiologia de processos infecciosos de animais de companhia.

5.7. Correlação entre a presença de genes do sistema *blaZ* e a resistência a azitromicina em *Staphylococcus* spp. isolados de infecções em animais de companhia

A emergência de resistência a azitromicina pode estar associada com a presença de genes que codificam proteínas alteradas como também com a expressão de β -lactamases (PETERS et al., 1992; BINGEN et al., 2002; HANSEN et al., 2002; LOW, et al., 2002). O presente estudo também avaliou a possível relação entre o mecanismo de resistência antimicrobiana determinado pela produção de enzimas β -lactamases com perfil fenotípico e genotípico de resistência à azitromicina (Tabela 15).

Tabela 15. Perfil de resistência à azitromicina e a presença de genes *blaZ* de *Staphylococcus* spp. (n=100).

n de isolados	Genes do sistema <i>blaZ</i>			Fenótipo e genótipo da Resistência à azitromicina					
	<i>blaZ</i>	<i>blaI</i>	<i>blaR1</i>	DDS	MC	DA	<i>ermA</i>	<i>ermB</i>	<i>ermC</i>
Isolados positivos para os genes <i>blaZ</i> e <i>blaI</i> (n=19)									
1	+	+	-	R	S	R	-	-	+
2	+	+	-	S	R	R	-	-	+
2	+	+	-	R	R	R	+	-	-
1	+	+	-	S	S	R	-	+	-
2	+	+	-	S	R	R	-	-	-
4	+	+	-	S	S	S	-	-	-
3	+	+	-	R	R	R	-	-	-
3	+	+	-	R	S	S	-	-	-
1	+	+	-	R	S	R	-	-	-
Isolados positivos para os genes <i>blaZ</i> (n=9)									
2	+	-	-	R	R	R	-	-	+
2	+	-	-	S	R	R	-	-	+
1	+	-	-	S	R	R	+	-	-
2	+	-	-	R	R	R	-	-	-
2	+	-	-	S	S	R	-	-	-
Isolados positivos para genes <i>blaZ</i>, <i>blaI</i> e <i>blaR1</i> (n=3)									
1	+	+	+	R	R	R	-	-	+
1	+	+	+	S	R	R	-	-	-
1	+	+	+	R	R	R	-	-	-
Isolado positivo para o gene <i>blaI</i> (n=1)									
1	-	+	-	S	S	S	-	-	-
Isolados negativos para os genes do sistema <i>blaZ</i> (n=68)									
2	-	-	-	R	R	R	+	-	+
1	-	-	-	S	R	R	-	+	+
4	-	-	-	R	R	R	+	-	-
2	-	-	-	R	S	S	+	-	-
1	-	-	-	S	R	S	+	-	-
2	-	-	-	S	R	R	+	-	-
1	-	-	-	R	R	S	-	+	-
6	-	-	-	R	R	S	-	-	+
3	-	-	-	S	R	R	-	-	+
1	-	-	-	R	S	R	-	-	+
4	-	-	-	R	R	S	-	-	+
12	-	-	-	S	S	S	-	-	-
13	-	-	-	R	R	R	-	-	-
12	-	-	-	S	S	R	-	-	-
3	-	-	-	R	S	S	-	-	-
3	-	-	-	R	S	R	-	-	-
1	-	-	-	S	R	S	-	-	-

*DD: teste de difusão em disco; MC: teste de microdiluição em caldo; DA: teste de diluição em Agar.

Os nove isolados *blaZ* positivos foram resistentes a azitromicina em pelo menos um dos testes realizados, onde quatro isolados (44,5%) foram negativos para os genes *erm*, indicando uma possível atuação de β -lactamases. Os outros 5 (55,5%) foram positivos também para os genes *erm*, podendo ocorrer o envolvimento dos dois mecanismos de resistência.

Dos 19 isolados *blaZ* e *blaI* positivos, apenas quatro isolados (21,1%) *erm*-negativos, foram sensíveis a azitromicina em todos os testes. Outros seis isolados (31,6%) foram positivos para os genes *erm* e fenotipicamente resistentes à azitromicina, indicando a atuação destes genes no mecanismo de resistência através da produção de metiltransferases. Outros nove isolados *blaZ* e *blaI* positivos foram negativos para os genes *erm* e resistentes em pelo menos um dos testes fenotípicos, podendo neste caso estar envolvidos outros mecanismos de resistência.

Nos 3% (3/100) dos *Staphylococcus* spp. que apresentaram todos os genes do sistema *blaZ*, *blaI* e *blaR1* foi detectada resistência a azitromicina. Apenas 1 isolado também apresentou o gene *erm*.

5.8. Fatores de virulência

5.8.1. Produção de “slime” e genes *icaA* e *icaD*

Foi detectada produção de “slime”, em diferentes escalas (Tabela 16), em 81% (81/100) dos *Staphylococcus* spp. avaliados pela técnica de microplaca (Figura 27).

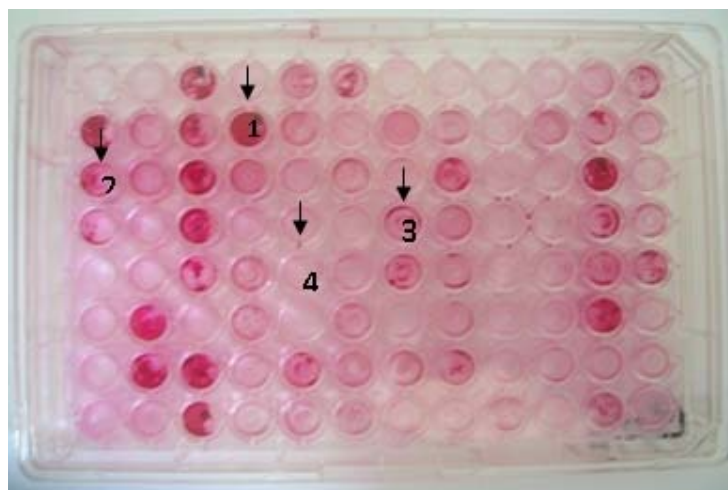


Figura 27. Técnica da microplaca revelando a produção de “slime”, por *Staphylococcus* spp. isolados de infecções em animais de companhia. 1- isolado forte produtor (+++), 2- isolado produtor moderado (++), 3- isolado fraco produtor (+), 4- isolado não produtor (-).

Tabela 16. Níveis de produção de “slime” dos 100 isolados de *Staphylococcus* spp. provenientes de infecções em animais de companhia.

Espécies	Produção de “slime”			
	-	+	++	+++
<i>S. aureus</i>	27,3% (6/22)	31,8% (7/22)	18,2%(4/22)	22,7% (5/22)
<i>S. intermedius</i>	17,2% (6/35)	22,9%(8/35)	22,9%(8/35)	37,1%(13/35)
<i>S. hyicus</i>	7,7% (1/13)	53,8% (7/13)	15,3%(2/13)	23,1% (3/13)
SCP	27,8%(5/18)	38,9% (7/18)	11,1%(2/18)	22,2%(4/18)
SCN	0%	25%(3/12)	41,7%(5/12)	33,3%(4/12)

*(-): ausente; (+): fraco; (++) : moderado; (+++): forte.

Quanto às espécies de *Staphylococcus* a maioria foi produtora de “slime”, dentre estas a totalidade de isolados de *Staphylococcus* spp. coagulase-negativos (n=12), apontando para uma importante estratégia de patogenicidade destas espécies. No presente estudo estas espécies estiveram associadas à infecções de pele, conduto auditivo externo e mucosa oral, e este fator pode ter favorecido a colonização destes sítios. Para as espécies coagulase-positivas foi detectado percentual de produção de “slime” de 72,7% (16/22) e 82,8% (29/35) em *Staphylococcus aureus* e *S. intermedius*, respectivamente, que foram as espécies prevalentes nos casos de piodermatite, otite externa e infecções urinárias. Quanto à espécie *S. hyicus* foi detectado um expressivo percentual de produção de “slime” (92,3%) nestes isolados, alertando para o fato de que embora esta espécie tenha sido pouco associada a infecções em animais, a expressão desse fator de virulência aponta para seu potencial patogênico.

Quanto à presença dos genes *icaA* (1315pb) e *icaD* (381pb) (Figura 28), foi encontrado um percentual de 15% (15/100), respectivamente. O percentual encontrado de *Staphylococcus* spp. positivos para ambos os genes foi de 2% (2/100). A baixa taxa de detecção destes genes comparada ao elevado percentual de detecção de “slime” através da técnica da microplaca (81%) sugere o envolvimento de outros genes que não foram amplificados ou a intensidade da produção do “slime” pode estar relacionada às características fenotípicas próprias dos estafilococos (ARCIOLA et al., 2001).

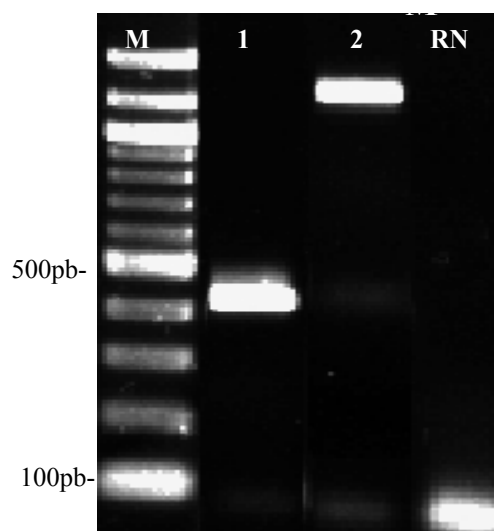


Figura 28. Genes *icaD* e *icaA* em *Staphylococcus* spp. de infecções de animais de companhia, em gel de agarose a 1,5%. M: marcador de peso molecular (100pb); 1: isolado positivo para o gene *icaD* (381 pb); 2: isolado positivo para o gene *icaA* (1315pb). RN: reação negativa;

Na técnica do ágar Vermelho Congo (Figura 29) foi observado um crescimento de colônias produtoras de “slime” apresentando duas tonalidades (cinza escuro e negra), que totalizaram 62% (62/100) dos *Staphylococcus* spp..

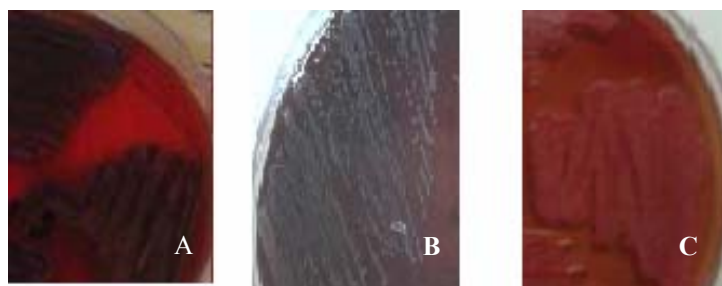


Figura 29. Colônias de *Staphylococcus* spp. isolados de infecções em animais de companhia crescidas em ágar Vermelho Congo. A: Colônia produtora de “slime” (muito negra); B: Colônia fracamente produtora de “slime” (cinza) e C: Colônia negativa para a produção de “slime” (vermelha)

A produção de “slime” avaliada por esta técnica também foi elevada em comparação à presença dos genes *icaAD* (Tabela 17).

Tabela 17. Presença dos genes *icaAD* e característica de coloração em ágar vermelho congo por *Staphylococcus* spp.

Nº de isolados	Genes		Vermelho Congo
	<i>icaA</i>	<i>icaD</i>	
32	-	-	Vermelho
27	-	-	Preto
13	-	-	Bordô
8	-	+	Preto
7	+	-	Preto
5	-	+	Bordô
3	+	-	Vermelho
3	+	-	Vermelho
2	+	+	Preto

* -: negativo; +: positivo.

Existem dados na literatura, que associam a presença de ambos os genes com as variações de coloração das colônias crescidas em ágar Vermelho Congo, mostrando que nem sempre que há a presença dos genes há concomitante produção de “slime” e consequente coloração negra da colônia (ARCIOLA et al., 2001). No presente trabalho esta associação ocorreu em apenas 17% (17/100) dos isolados, os quais ou apresentaram um dos genes ou foram positivos para ambos os genes *icaA* e *icaD* e apresentaram coloração negra.

No entanto, 11% (11/100) dos isolados foram positivos para o gene *icaA* ou para o gene *icaD* e não apresentaram a coloração negra típica de isolados positivos para produção de “slime”. Os testes estatísticos não detectaram correlação entre a presença dos genes *ica* e a produção de “slime” em ágar Vermelho Congo (Anexo XI). A avaliação das características coloniais neste ágar não é quantitativa e muito subjetiva, uma vez que existem inúmeras variações de coloração que podem ocorrer desde a cor preta até a vermelha, como foi encontrado no presente trabalho (colônia cinza e bordô). O fato da não expressão do fenótipo positivo para “slime” nos isolados positivos para os genes pode está envolvida com as condições de cultivo as quais foram submetidos,

sendo possivelmente necessária uma maior concentração de açúcar no ágar ou maior tempo de incubação.

5.8.2. Produção de hemolisinas e genes *hla* e *hlb*

Dos isolados *Staphylococcus* spp. testados, 43% (43/100) foram hemolíticos, destes 22% (22/100) foram produtores de hemólise parcial, 15% (15/100) apresentaram hemólise total e 6% (6/100) foram produtores de ambas as hemolisinas (Figura 30). Logo, de todos os isolados produtores, 48,3% (21/43) apresentaram a β -hemolisina corroborando com autores que observaram que os estafilococos de origem animal se caracterizam por produzir principalmente esta hemolisina (DEMO, 1996). Os *Staphylococcus* spp. produtores de β -hemolisina foram frequentes nos casos de otite externa canina, piodermatite e infecção do trato urinário. A membrana desses tecidos orgânicos possui esfingomielina, que pode ser degradada pela β -hemolisina segundo sua atividade de esfingomielinase, apontando para importância desse fator de virulência na patogênese destas infecções.

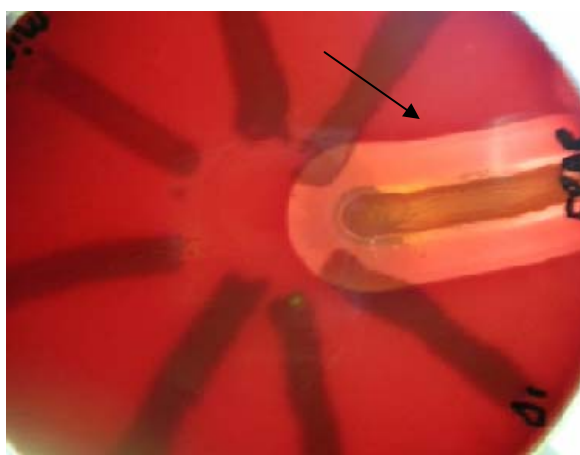


Figura 30. Produção de hemolisinas por *Staphylococcus* spp. isolados de infecções em animais de companhia. A seta indica um isolado produtor de α - β -hemolisinas em placa de ágar sangue apresentando outros isolados negativos para a produção de ambas as hemolisinas.

Em 57% (57/100) dos *Staphylococcus* spp. não foi detectada a atividade hemolítica. Estes isolados foram posteriormente submetidos ao teste de sinergismo hemolítico (SHA). O efeito sinérgico foi positivo em 38,6% (22/57) dos isolados que não haviam apresentado hemolisinas. Acredita-se que os isolados que desenvolvem tal fenômeno são portadores da γ -hemolisina que é expressa somente em presença de β -hemolisina (REINOSO, 2004). No entanto, outros autores afirmam que o fenômeno de sinergismo hemolítico é independente da produção de hemolisinas, porém sua ação é considerada potencializadora para isolados hemolíticos, permitindo aos *Staphylococcus* spp. uma melhor capacidade de colonização de sítios orgânicos (WATTS, 1988).

A baixa expressão de hemolisinas dos isolados avaliados pode estar relacionada aos múltiplos repiques realizados ou ao longo período de estocagem, sob congelamento, aos quais estes isolados foram submetidos.

Após a análise fenotípica da expressão de hemolisinas foi realizada a técnica de PCR-multiplex para a detecção dos genes *hla* e *hlb* (210pb e 300 pb, respectivamente) (Figura 31).

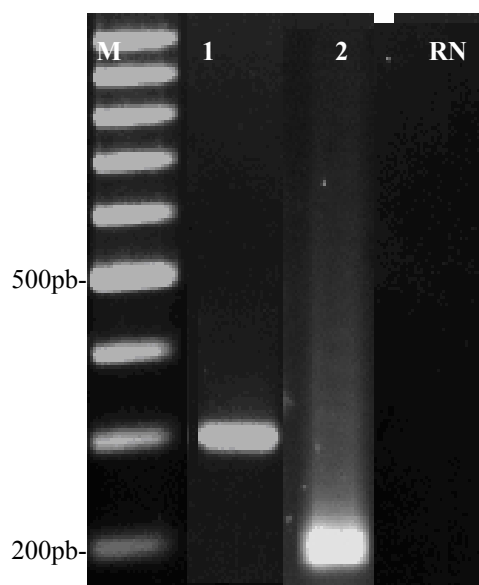


Figura 31. Genes *hla* (210pb) e *hbl* (300pb) em *Staphylococcus* spp. isolados de infecções de animais de companhia, através do PCR multiplex (gel de agarose a 1,5%). M: marcador de peso molecular (100pb). 1: isolado positivo para o gene *hbl*; 2: isolado positivo para o *hla* e RN: reação negativa.

De acordo com essa técnica foi possível avaliar que 13% (13/100) dos isolados foram positivos para o gene *hla*, 10% (10/100) foram positivos para o gene *hbl* e em 9% (9/100) dos isolados foi possível detectar ambos os genes *hla* e *hbl*. (Tabela 18).

Tabela 18. Detecção de hemolisinas e os genes *hla* e *hbl* dos 100 isolados de *Staphylococcus* spp.

Tipos de Hemolisinas*	Genes		Nº de isolados (%)
	<i>hla</i>	<i>hbl</i>	
NH	-	-	42 (42%)
TOTAL	-	-	12 (12%)
NH	+	-	10 (10%)
PAR	-	-	9 (9%)
PAR	-	+	8 (2%)
PAR/TOT	-	-	5 (5%)
PAR	+	+	5 (5%)
PAR/TOT	+	+	1 (4%)
TOTAL	+	-	3 (3%)
NH	+	+	3 (3%)
NH	-	+	2 (2%)

*PAR/TOT: parcial e total; PAR: parcial; TOT: total; NH: não hemolítico; +: positivo; -: negativo.

Um total de 19% (4/21) isolados produtores de hemolisina total foi positivo para o gene *hla* e 50% (14/28) dos isolados com hemólise parcial foram positivos para o gene *hbl*, confirmando a participação destes genes na expressão das α e β -hemolisinas, respectivamente. Em 58,1% (25/43) dos isolados de *Staphylococcus* spp. foi detectada hemólise, porém não foram detectados os genes *hla* e *hbl*, sugerindo o envolvimento de

outros genes, possivelmente relacionados à expressão destas toxinas, e que não foram amplificados no presente trabalho.

Do total de isolados não-hemolíticos, 73,7% (42/57) foram negativos para ambos os genes, e em 26,3% (15/57) foi possível detectar um ou ambos os genes *hla* e *hlb*. Nestes isolados a baixa expressão de hemolisinas pode estar relacionada às condições de estocagem destes isolados.

De todos os *Staphylococcus* spp. positivos para o sinergismo hemolítico (SHA) apenas três (13,6%) foram positivos para os genes *hla* e *hlb*, corroborando com Coelho e colaboradores (2009) que detectaram SHA em 17 isolados *Staphylococcus* spp. provenientes de casos de mastite bovina (11,3%), sendo 2 destes isolados positivos para os genes *hla* e *hlb*.

5.8.3. Gene *spaA* em *Staphylococcus* spp.

No presente estudo todos os *Staphylococcus aureus* (n=22) foram positivos para o gene que codifica a região variável (X) do gene *spaA* (Figura 32). Deste total 14,7% (5/34) apresentaram bandas múltiplas, tendo sido possível estabelecer sete perfis segundo o tamanho da banda amplificada, sendo prevalente o tamanho de 300pb (Tabela 19).

Tabela 19. Perfis estabelecidos segundo amplificação da região X do gene *spaA* em *Staphylococcus aureus* (n=22) isolados de infecções de animais de companhia.

Perfis (pb)	Número de repetições da região X	Frequência	Percentual
4 (300)	12	10	45,5%
5 (800)	33	3	13,6%
6 (800/900)	33/37	3	13,6%
2 (250)	10	2	9,1%
3 (280)	11	2	9,1%
1(220)	9	1	4,5%
7 (250/300)	10/12	1	4,5%

Todos os isolados apresentaram valores igual ou superior a nove repetições, sendo o perfil predominante o de 12 repetições (50%). Frenay e colaboradores (1996) determinaram que cepas com mais de 11 unidades repetidas na região X tendem a ser mais epidêmicas, enquanto que a presença de sete ou menos unidades indica cepas esporádicas. Isso se justifica pelo fato de que quanto maior o número de repetições, maior a longitude da região de união à porção Fc das imunoglobulinas, favorecendo a colonização e consequente infecção.

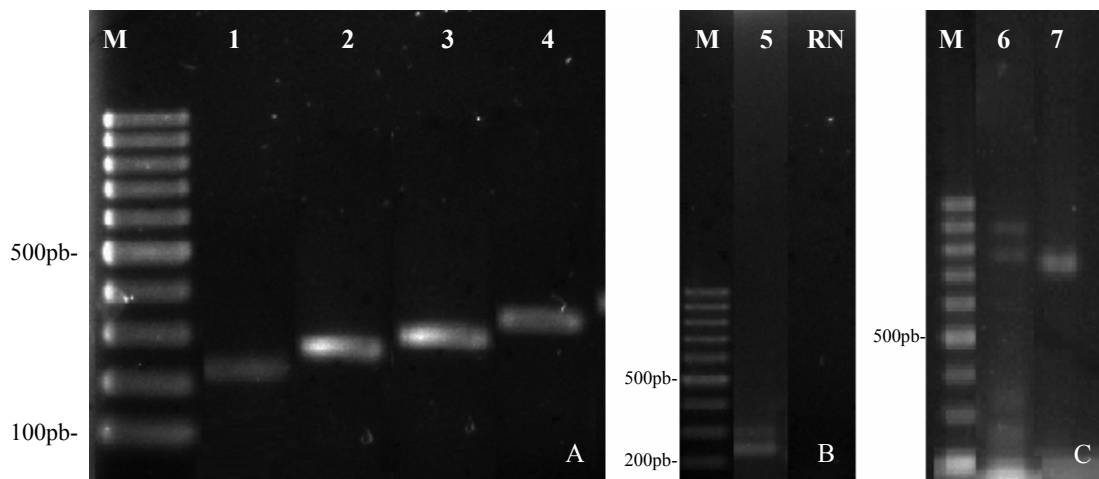


Figura 32. Gene *spaA* (região polimórfica) em *Staphylococcus* spp. isolados de infecções de animais de companhia (gel de agarose a 1,5%). M: marcador de peso molecular (100pb), 1: banda amplificada de 220pb; 2: banda amplificada de 250pb; 3: banda amplificada de 280pb; 4: banda amplificada de 300pb; 5: bandas amplificadas de 250pb e 300pb; 6: bandas amplificadas de 800pb e 900pb; 7: banda amplificada de 800pb; RN: reação negativa.

Embora muitos estudos afirmem que o gene *spaA* é específico para *Staphylococcus aureus*, o presente estudo detectou a prevalência deste gene em outras espécies de *Staphylococcus*. O gene *spaA* foi detectado em 88,2% (30/34) dos *S. intermedius* e em 83,3% (10/12) dos *S. hyicus*. O padrão de banda prevalente nessas espécies também foi o de 300pb e em três isolados da espécie *S. intermedius* foi possível detectar bandas múltiplas (Tabela 20).

Tabela 20. Perfis estabelecidos segundo amplificação da região X do gene *spaA* em *Staphylococcus intermedius* (n=30) e *S. hyicus* (n=10) isolados de infecções de animais de companhia.

<i>S. intermedius</i>			
Perfis (pb)	Número de repetições da região X	Frequência	Percentual
1 (300)	12	16	43,30%
2(220)	9	4	13,30%
3(800)	33	3	10%
4 (280)	11	2	6,70%
5(315)	13	2	6,70%
6 (800/900)	33/37	2	6,70%
7 (220/800)	9/33	1	3,33%
<i>S. hyicus</i>			
Perfis (pb)	Número de repetições da região X	Frequência	Percentual
1 (300)	12	9	90%
2(220)	9	1	10%

O perfil polimórfico do gene *spaA* detectado no presente estudo permitiu a análise discriminatória dos *Staphylococcus* spp. a partir do padrão de bandas detectadas para a região variável (X) de cada isolado (Tabela 21). Shopsisin e colaboradores (2000) utilizaram a análise de polimorfismo do gene *spaA* a partir de repetições da região X como alternativa para a tipificação de *Staphylococcus aureus* resistentes à meticilina e relataram que a técnica apresenta uma significativa capacidade discriminatória.

Tabela 21. Perfil polimórfico do gene *spaA* em *Staphylococcus* spp. isolados de infecções de animais de companhia.

n de isoados	Isolados	220pb	250pb	280pb	300pb	315pb	800pb	900pb
<i>Staphylococcus aureus</i>								
12	36,37,38,44,45,47,48,51,54,55,56,57				X			
3	39,40,41						X	X
3	43,46,50						X	
1	42	X						
1	49		X					
1	52		X		X			
1	53			X			X	
<i>S. intermedius</i>								
16	1,3,4,6,7,11,12,13,17,18,22,23,24,32,33,35				X			
4	14,28,29,34	X						
3	10,19,20						X	
2	8,15					X		
2	21,26						X	X
1	9				X		X	
1	5	X					X	
<i>S. hyicus</i>								
9	54,55,56,57,58,59,61,62,64				X			
1	62	X						

5.8.4. Gene *coa* em *Staphylococcus* spp.

O gene *coa* foi detectado em 100% (84/84) dos *Staphylococcus* spp. que fenotipicamente produziram a enzima coagulase (Figura 33). Os *Staphylococcus* spp. coagulase-positivos foram prevalentes na maioria dos sítios infecciosos avaliados no presente estudo apontando para a importância desse fator na patogenicidade desses agentes.

A análise das formas alélicas do gene *coa* permitiu detectar cinco perfis distintos, tendo sido predominante o perfil de 520pb (40,5%). Em nove isolados foram detectadas bandas duplas (Tabela 22).

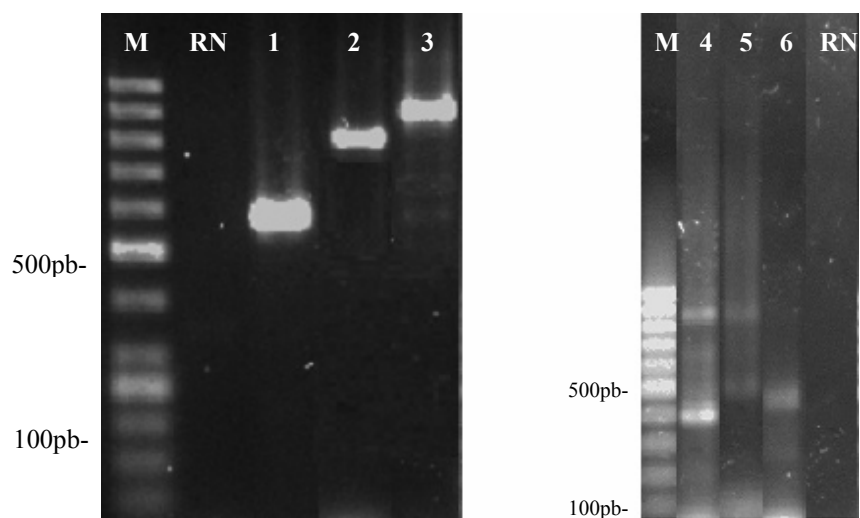


Figura 33. Gene *coa* em *Staphylococcus* spp. isolados de infecções de animais de companhia (gel de agarose a 1,5%). M: marcador de peso molecular (100pb); RN: reação negativa; 1: banda amplificada de 520pb; 2: banda amplificada de 800pb; 3: banda amplificada de 900pb; 4: bandas amplificadas de 400pb e 900pb; 5: bandas amplificadas de 520pb e 900pb; 6: banda amplificada de 400pb.

Tabela 22. Perfis estabelecidos segundo amplificação do gene *coa* em *Staphylococcus* spp.

Perfis (pb)	Número de repetições da região polimórfica	Frequência	Percentual
2 (520)	6	34	40,5%
1 (400)	5	30	35,7%
3 (800)	9	11	13,1%
4 (520/900)	6/11	5	5,9%
5(400/900)	5/11	4	4,8%

Dentre as diferentes espécies de *Staphylococcus* avaliadas o perfil de 400pb foi predominante em *Staphylococcus aureus* (12/22) e o de 520pb em *S. intermedius* (14/34) e *S. hyicus* (4/13). Dos 10 isolados que apresentaram bandas duplas, cinco corresponderam à espécie *S. intermedius*, sendo o perfil de bandas de 520pb e 900pb obtido em três isolados e o perfil de 400pb e 900pb em dois isolados. Bandas duplas também foram observadas em *S. aureus* (400pb e 900pb) e em *S. hyicus* (400pb e 900pb).

O perfil polimórfico do gene *coa* detectado no presente estudo permitiu a análise discriminatória dos isolados de *Staphylococcus* spp. (Tabela 23). Goh e colaboradores (1992) sugerem que a presença de mais de uma forma alélica para o gene da coagulase pode ser utilizada para subtipar isolados de *S. aureus* baseado no número de sequências repetidas como parâmetro para análises discriminatórias. A detecção de distintos perfis corrobora com o trabalho desenvolvido por Reinoso (2004) que encontrou 8 distintas formas alélicas em *Staphylococcus aureus* isolados de mastite bovina. Shopsin e colaboradores (2000) também encontraram polimorfismos que variaram entre 3 e 7 repetições, sendo o perfil predominante o de 5 repetições.

Tabela 23. Perfil polimórfico do gene *coa* em *Staphylococcus* spp. isolados de infecções de animais de companhia.

Perfil (n de isolados)	Isolados	400pb	520pb	800pb	900pb
<i>Staphylococcus intermedius</i>					
1(14)	2,4,6,8,9,12,13,15,22,23,27,29,30, 31		X		
2(9)	5,9,17,19,20,24,25,26,28	X			
3(3)	3,7,11		X		X
4(2)	14,21			X	
5(2)	1	X			X
<i>S. aureus</i>					
1(12)	32,33,34,36,37,39,40,42,47,48,49,55	X			
2(7)	43,46,44,50,51,52,53		X		
3(4)	35,38,41,45			X	
4(1)	44	X			X
<i>S. hyicus</i>					
1(4)	57,58,63,65		X		
2(3)	59,60,66	X			
3(3)	56,62,64			X	
4(1)	54		X		X
5(1)	61	X			X
SCP					
1(9)	71,72,74,76,77,81,82,83,84		X		
2(6)	67,68,70,73,75,79	X			
3(2)	78,8			X	
4(1)	67		X		X

5.8.5. Gene *agr* em *Staphylococcus* spp.

Do total de 100 isolados de *Staphylococcus* spp. foi possível detectar uma prevalência de 34% em relação ao gene regulatório *agr*.

Especificamente em relação aos *S. aureus*, foi possível detectar que 72,7% (16/22) foram positivos para o gene *agr*, tendo sido encontrado dois perfis (350pb e 550pb) distintos o que confirma o polimorfismo de tal gene. Um total de 37,5% (6/16) dos *S. aureus* apresentou a banda de 550pb. Este resultado corrobora com dados obtidos por Gilot; Van Leeuwen (2004) que encontraram associações estatísticas significativas entre os perfis de *agr* e o hospedeiro específico, onde o autor encontra prevalência do perfil de 550pb em isolados bovinos.

Em outras espécies de *Staphylococcus* também foi possível detectar o gene *agr*, sendo este prevalente em 31,4% (11/35) dos *S. intermedius*, em 23,1% (3/13) dos *S. hyicus* e em 33,3% (4/12) dos SCN. Para estas espécies o perfil predominante foi de bandas duplas de 350pb e 550pb. Em 18 isolados de SCP este gene não foi detectado.

Segundo a literatura, o locus *agr* codifica para um sistema de “QS (*Quorum Sensing*)” que promove a regulação positiva de proteínas extracelulares envolvidas na agressão ao hospedeiro, e regulação negativa da expressão de proteínas de superfície responsáveis pela colonização e por diversas interações com as células do hospedeiro (LYON et al., 2002; ZHANG et al., 2002). No meio da fase logarítmica do crescimento bacteriano, a porção RNAlII do locus *agr*, regula negativamente através de um mecanismo antisense, as proteínas de superfície, tais como, Spa, Clf, FnBP. Esta regulação é positiva e indireta na produção exoproteínas, como, serina proteases,

toxinas (α -hemolisina, TSST-1 e enterotoxinas) (NOVICK et al., 1995). No presente estudo, a presença do gene *agr* foi avaliada em relação ao genótipo e fenótipo da produção de hemolisinas e “slime” e o gene *spaA* (Anexo XII). A Tabela 24 apresenta o perfil dos 100 isolados de *Staphylococcus* spp. quanto a detecção do gene *agr* e sua possível relação com genes de fatores de virulência.

Tabela 24. Detecção do gene *agr* e fatores de virulência em *Staphylococcus* spp. (n=100).

Produção de hemólise em ágar sangue de carneiro				
(n de isolados)		Gene <i>hla</i>	Gene <i>hlyB</i>	Gene <i>agr</i>
30	-	-	-	-
15	+	-	-	-
14	-	-	-	+
8	+	+	-	-
7	+	-	-	+
6	+	+	+	+
5	-	+	-	-
3	+	+	+	-
3	-	+	-	+
3	+	-	+	-
2	-	+	+	-
2	+	+	-	+
1	-	-	+	+
1	-	+	+	+
Produção de "slime" detectada pelo teste de				
Perfil (n de isolados)	Microplaca	<i>ica A</i>	<i>ica D</i>	<i>agr</i>
1(36)	+	-	-	-
2(22)	+	-	-	+
3(11)	-	-	-	-
4(10)	+	-	+	-
5(8)	+	+	-	-
6(6)	-	-	-	+
7(3)	+	+	-	+
8(3)	+	-	+	+
9(1)	+	+	+	-
(n de isolados)		gene <i>spaA</i>		gene <i>agr</i>
37		+		-
29		-		-
17		+		+
17		-		+

Foi possível detectar que o gene *agr* exerceu atividade regulatória positiva sobre atividade hemolítica em 8% (8/100) dos *Staphylococcus* spp. e para a produção de “slime” em 6% (6/100) destes isolados. Quanto ao gene *spaA* que regula a proteína A, o gene *agr* exerceu regulação negativa em 17% (17/100) dos *Staphylococcus* spp. No entanto, devido à baixa frequência de casos de associação entre o gene *agr* e os demais fatores de virulência avaliados e a heterogeneidade dos resultados expressos não foi possível aplicar um modelo estatístico que desse suporte a esses dados (Anexo XII). Os resultados apontam para necessidade de ampliar as investigações a respeito de outros sistemas de regulação.

Em 28% dos *Staphylococcus* spp. não foi detectado o gene *agr* e também não foi possível detectar genes de fatores de virulência, tais como, para hemolisinas, produção de “slime” e proteína A.

Os *Staphylococcus* têm capacidade para produzir um grande número de fatores de virulência, os quais são finamente orquestrados por diversos reguladores globais. Dentre esses sistemas incluem-se o sistema *agr*, considerado o principal sistema de “QS” dos *Staphylococcus aureus*. No entanto, são reconhecidos outros sistemas de regulação tais como, o SigB (fator sigma alternativo de fase estacionária); a proteína SarA (reguladora transcricional global); e os sistemas Sae e Arl (sistemas de dois componentes; *signal transduction*). Além desses mecanismos, várias proteínas que apresentam homologia com a proteína SarA também foram descritas como reguladoras transcricionais de genes de virulência em *S. aureus*, dentre elas a proteína Rot (SAID et al., 2003).

Deste modo, acredita-se que a diversidade de sistemas regulatórios de fatores de virulência possa ser responsável pela extraordinária capacidade que os *Staphylococcus* spp. possuem de se adaptar aos diferentes sítios orgânicos e pela modulação de sua patogenicidade, tornando-se assim potentes agentes infecciosos.

5.9. Análise epidemiológica dos processos infecciosos de animais de companhia

5.9.1. Coleta das amostras

O presente estudo obteve 225 espécimes clínicos de animais de companhia coletados durante o período de 2006 até 2008. Estes espécimes foram coletados a partir do acompanhamento do atendimento clínico do Departamento de Clínica Médica de Pequenos Animais da Universidade Estácio de Sá, onde foram obtidos 102 espécimes clínicos, e 48 espécimes clínicos do Hospital Veterinário de Pequenos Animais da UFRRJ, onde se realiza o atendimento veterinário de animais de diferentes regiões do Estado do Rio de Janeiro. Foram realizadas campanhas informativas aos médicos veterinários dos respectivos locais e aos estagiários de graduação em Medicina Veterinária para coleta asséptica correta dos espécimes e correto envio ao laboratório de Bacteriologia da UFRRJ. Os exames de cultura e antibiograma foram realizados de forma gratuita e os resultados eram imediatamente enviados aos médicos veterinários responsáveis pelo atendimento clínico dos animais como forma de auxiliar no diagnóstico e na terapêutica das doenças.

O total de 75 espécimes foi obtido a partir de visitas periódicas que foram realizadas ao canil do Instituto Veterinário Municipal Jorge Waitsman e da Polícia Militar do Estado do Rio de Janeiro. Nestes pontos de coleta os animais eram alocados em baias superlotadas, predispondo a brigas e ao contágio. A condição higiênico-sanitária do local de alojamento desses animais deve ter associação direta com a presença de agente infecciosos, tais como, *Listeria* spp. que pode ser isolada a partir de solos, silagem, afluentes de esgoto, água corrente e fezes (HIRSH; ZEE, 2003). Este cenário levanta questões importantes a respeito da exposição humana, no caso médicos veterinários e a equipe de tratadores, e de animais a um excesso de contaminação ambiental que favorece a transmissão de agentes potencialmente patogênicos. Logo, a principal contribuição desta identificação bacteriana foi o esclarecimento de tais fatores de risco e da importância do médico veterinário como agente atuante no controle de zoonoses.

O Anexo V contém os dados a respeito das características clínicas de todos os espécimes coletados e informações sobre a faixa etária, sexo e raça dos animais investigados.

5.9.2. Processos infecciosos

Dentre os processos infecciosos de animais de companhia investigados no presente estudo foram realizadas análises epidemiológicas a partir dos processos infecciosos que geraram um tamanho de amostra significativo, dentre estes os casos de otite externa canina, infecções do trato urinário e infecções de pele.

5.9.2.1. Otite externa canina

As infecções do conduto auditivo externo de cães foram prevalentes em 29,3% (66/225) dos espécimes coletados. Fatores como raça, manejo e infecções recorrentes podem ter influência sobre este sítio orgânico predispondo à infecção. Os casos de otite externa canina foram mais frequentes em animais machos (57,6%) e adultos (92,4%). As raças que apresentaram maior frequência de casos de otite no presente estudo foram: pastor alemão (18,2%) e beagle (12,1%). Fatores raciais como, conformação anatômica do conduto auditivo externo e presença de pêlos, podem predispor ao acúmulo de umidade e sujidades que favorecem a infecção neste sítio.

Dentre os 70 isolados bacterianos identificados nos casos de otite externa canina as bactérias do gênero *Staphylococcus* spp. foram prevalentes, tendo sido isoladas as espécies *S. intermedius*, *S. aureus*, *S. intermedius* e *S. hominis*. Foi possível detectar que 18,6% (13/70) dos isolados corresponderam à espécie *S. intermedius* que apresentaram significativo percentual resistência em relação aos antimicrobianos das classes: β -lactâmico, macrolídeo e tetraciclina. As demais espécies de *Staphylococcus* apresentaram perfil de suscetibilidade antimicrobiana semelhante ao de *S. intermedius* e seus respectivos percentuais de resistência aos antimicrobianos avaliados estão apresentados na tabela 25.

Tabela 25. Percentual de resistência dos 39 isolados de *Staphylococcus* spp. isolados de casos de otite externa canina.

Antimicrobianos	Percentual de isolados resistentes (n de isolados)			
	<i>S. intermedius</i>	<i>S. aureus</i>	<i>S. hyicus</i>	SCN
β-lactâmicos				
Ampicilina (10mg)	84,6% (11/13)	63,6% (7/11)	72,7% (8/11)	75% (3/4)
Penicilina (10UI)	84,6% (11/13)	90,9% (10/11)	90,9% (10/11)	75% (3/4)
Oxacilina (1mg)	46,2% (6/13)	54,5% (6/11)	72,7% (8/11)	75% (3/4)
β-lactâmicos + inibidores de β-lactamase				
Ampicilina + Sulbactam (10/10mg)	0%	0%	9,1% (1/11)	0%
Amoxicilina + ác. Clavulânico (20/10mg)	0%	0%	0%	0%
Cefalosporinas				
Cefoxitina (30mg)	76,9% (10/13)	81,8% (9/11)	72,7% (8/11)	75% (3/4)
Cefalotina (30mg)	30,8% (4/13)	54,5% (6/11)	9,1% (1/11)	25% (1/4)
Ceftriaxona (30mg)	46,2% (6/13)	90,9% (10/11)	54,5% (6/11)	75% (3/4)
Carbapenem				
Imipenem (10mg)	0%	0%	0%	0%
Macrolídeos				
Azitromicina (15mg)	46,2% (6/13)	54,5% (6/11)	27,3% (3/11)	75% (3/4)
Eritromicina (15mg)	46,2% (6/13)	54,5% (6/11)	27,3% (3/11)	50% (2/4)

Lincosamida				
Clindamicina (2mg)	38,5% (5/13)	36,7% (4/11)	54,5% (6/11)	100%(4/4)
Fluoroquinolona				
Ciprofloxacina (5mg)	30,8% (4/13)	27,3% (3/11)	27,3% (3/11)	25% (1/4)
Enrofloxacin (10mg)	23,1% (3/13)	9,1% (1/11)	9,1% (1/11)	25% (1/4)
Norfloxacin (10mg)	23,1% (3/13)	18,2% (2/11)	18,2% (2/11)	25% (1/4)
Aminoglicosídeo				
Tobramicina (10mg)	46,2% (6/13)	63,6% (7/11)	36,7% (4/11)	50% (2/4)
Gentamicina (10mg)	23,1% (3/13)	27,3% (3/11)	36,7% (4/11)	50% (2/4)
Glicopeptídeo				
Vancomicina (30mg)	7,8% (1/13)	9,1% (1/11)	0%	0%
Inibidor da via de Folato				
Sulfametoxazol+trimetopim (1,25mg/23,75mg)	38,5% (5/13)	36,4% (4/11)	27,3% (3/11)	25% (1/4)
Oxazolidinona				
Linezolida (30mg)	7,8% (1/13)	9,1% (1/11)	9,1% (1/11)	0%
Tetraciclina				
Tetraciclina (30mg)	38,5% (5/13)	45,5% (5/11)	18,2% (2/11)	50% (2/4)

Um total de 17% (12/70) dos isolados corresponderam a Enterobactérias, representadas pelas espécies: *Eschericia coli*, *Proteus mirabilis*, *P. vulgaris*, *Serratia liquefaciens*, *Hafnia alvei* e *Enterobacter* spp.. foram detectados percentuais de resistência de 75% (9/12) para enrofloxacin e tetraciclina e 58,3% (7/12) para ceftriaxona.

Quanto às demais espécies bacterianas isoladas dos casos de otite externa canina foram detectados 10% (7/70) dos isolados correspondentes ao gênero *Pseudomonas*, e estes apresentaram percentuais de resistência de 71,4% (5/7) para o antibiótico ceftriaxona, 42,8% (3/7) para gentamicina e 28,6% (2/7) para ciprofloxacina.

Quanto à detecção de fatores de virulência expressos pelas espécies de *Staphylococcus* investigadas no presente estudo foi possível avaliar a produção fenotípica de “slime” em 92,3% (12/13) dos isolados de *S. intermedius*, em 81,8% (9/11) dos *S. aureus*, e em 100% dos *S. hyicus* (11/11) e SCN (4/4), respectivamente. Os genes reguladores da produção de biofilme, *icaA* e *icaD*, foram detectados em 23% (3/13) dos isolados da espécie *S. intermedius* e 18% (2/11) dos *S. aureus*. Para espécie *Staphylococcus hyicus* foi detectado a prevalência de 45,5% (5/11) para o gene *icaA* e 27,3% (3/11) para o gene *icaD*. Para os SCN foi detectada a prevalência de 50% (2/4) para o gene *icaD* e não foi possível detectar o gene *icaA*.

A expressão de hemolisinas foi detectada a partir do isolamento dos isolados de *Staphylococcus* spp. em ágar sangue, tendo sido possível avaliar que para a espécie *S. intermedius* 23% (3/13) foram produtores de hemólise total e positivos para o gene *hla*, e que 15% (2/13) foram produtores de hemólise parcial e deste total apenas um isolado foi positivo para o gene *hlyB*. Dos isolados que não apresentaram hemólise, um total de 62,5% (5/8) produziram o efeito de sinergismo hemolítico que pode estar associado a delta-hemolisina. Para espécie *S. aureus* foram detectados 9% (1/11) de isolados produtores de hemólise total, 18% (2/11) de hemólise parcial, 27% (3/11) de efeito hemolítico sinérgico, desse total apenas 18% (2/11) foram positivos para o gene *hla* e

nenhum isolado foi positivo para o gene *hlyB*. Quanto a *S. hyicus* foram detectados 36,3% (4/11) de isolados produtores de hemólise total, 27,3% (3/11) de hemólise parcial, 25% (1/4) de efeito hemolítico sinérgico e deste total, 18% (2/11) foram positivos para o gene *hlyA* e *hlyB*, respectivamente. Para os SCN, 50% (2/4) apresentaram apenas hemólise total e não foram detectados os genes *hlyA* e *hlyB* nestes isolados.

O gene *spaA* que regula a expressão da proteína A, proteína de superfície que se liga a imunoglobulinaG, foi detectado em 100% dos isolados das espécies, *S. intermedius* (13/13) e *S. aureus* (11/11) e em 45,5% (5/11) dos *S. hyicus*, sendo que para os isolados de SCN não houve detecção deste gene.

5.9.2.2. Infecções do Trato urinário

Os espécimes coletados a partir de infecções do trato urinário foram prevalentes em 26,7% (60/225) dos espécimes, sendo mais frequentes em cães machos (61,8%) adultos (44,1%) e idosos (41,2%). Quanto aos espécimes coletados de felinos, as infecções do trato urinário foram mais frequentes em felinos machos (83,3%) e adultos (75%). A capacidade dos felinos de produzir uma urina naturalmente ácida e altamente concentrada em uréia pode predispor a colonização deste sítio orgânico por patógenos como, *Citrobacter freundii*, isolados no presente estudo.

Do total de 36 isolados bacterianos identificados a partir de espécimes coletados de infecções do trato urinário as Enterobactérias foram prevalentes em 58,3% (21/36) dos isolados avaliados, sendo representados pelas espécies: *Escherichia coli*, *Proteus mirabilis*, *Citrobacter freundii*, *Serratia marcescens*, *Yersinia enterocolitica* *Hafnia alvei*, *Edwardsiella tarda* e *Enterobacter* spp. (Tabela 1). Nos espécimes clínicos provenientes do trato urinário de cães a espécie *Escherichia coli* foi prevalente, enquanto os espécimes clínicos de infecções de felinos houve a prevalência da espécie *Citrobacter freundii*. Foram detectados percentuais de resistência de 28,6% (6/21) para ciprofloxacina, 19% (4/21) para enrofloxacin, norfloxacina e tetraciclina, respectivamente, 14,3% (3/21) para ceftriaxona e 9,5% (2/21) para gentamicina.

Os *Staphylococcus* spp. foram prevalentes em 27,8% (10/36) dos isolados, que corresponderam as espécies *S. intermedius* e *S. aureus*. Foi possível detectar que 100% (10/10) dos isolados foram resistentes aos antibióticos: ampicilina, oxacilina, ceftriaxona e tetraciclina, 60% (6/10) foram resistentes à gentamicina, 40% (4/10) à ciprofloxacina e 20% (2/10) à norfloxacina e enrofloxacin, respectivamente. Dentre os fatores de virulência investigados foi possível detectar que 100% (10/10) dos isolados produziram “slime” deste total 20% (2/10) foram positivos para o gene *icaA* e 30% (3/10) para o gene *icaD*. Um total de 50% (5/10) produziram hemólise total, 70% (7/10) hemólise parcial e 33,3% (1/3) efeito hemolítico sinérgico. Destes isolados 40% (4/10) foram positivos para o gene *hlyA* e 70% (7/10) para o gene *hlyB*. O gene *spaA* foi detectado em 100% (10/10) dos *Staphylococcus* spp. identificados neste sítio infeccioso.

5.9.2.3. Infecções da pele

As infecções de pele foram prevalentes em 18,7% (42/225) dos espécimes coletados sendo mais frequentes em cães machos (64,5%) e adultos (93,4%) e fatores como raça, manejo, infecções recorrentes, polimicrobianas e de manejo podem predispor a infecção desse sítio orgânico.

Os *Staphylococcus* spp. foram prevalentes em 65,2 % (30/46) dos isolados bacterianos identificados a partir de espécimes clínicos coletados de lesões de pele de cães e gatos, que corresponderam as espécies *S. intermedius*, *S. aureus*, *S. hyicus*, *S. xylosus* e *S. hominis* (Tabela 1). Dentre os antibióticos que representam as opções terapêuticas em medicina veterinária para infecções estafilocócicas da pele, foi possível detectar que 90% (27/30) dos isolados foram resistentes ao antibiótico ampicilina, 73,3%

(22/30) foram resistentes à ceftriaxona e azitromicina, respectivamente, 66,7% (20/30) à cefoxitina, 53,3% (16/30) à cefalotina, 20% (6/30) à enrofloxacin e 13,3% (4/30) à gentamicina. Dentre os fatores de virulência investigados foi possível detectar que 80% (24/30) dos isolados produziram “slime” em testes fenotípicos e deste total 20,8% (5/24) foram positivos para o gene *icaA* e 16,7% (4/24) para o gene *icaD*. Um total de 16,7% (5/30) produziu hemólise total, 23,3% (7/30) hemólise parcial e 50% (8/16) dos isolados não-hemolíticos (16/30) foram positivos para o efeito hemolítico sinérgico, que pode estar associado a delta-hemolisina. Destes isolados 30% (9/30) foram positivos para o gene *hlyA* e 20% (6/30) para o gene *hlyB*. O gene *spaA* foi detectado em 46,7% (14/30) dos *Staphylococcus* spp. identificados neste sítio infeccioso.

Um total de 28,3% (13/46) dos isolados bacterianos corresponderam a Bastonetes Gram-negativos, representados em sua maioria por Enterobactérias, tendo sido possível identificar as seguintes espécies: *Escherichia coli*, *Proteus mirabilis*, *P. vulgaris*, *Serratia marcescens*, *Citrobacter freundii*, *Yersinia enterocolitica* e *Enterobacter* spp., apenas um isolado correspondeu ao gênero *Pseudomonas* spp. Estes isolados foram avaliados quanto ao seu perfil de suscetibilidade frente as principais alternativas terapêuticas veterinárias indicadas para infecções associadas à bactérias Gram-negativas, tendo sido possível detectar percentuais de resistência de 9% (1/11) para enrofloxacin, 18,2% (2/11) para tetraciclina e gentamicina, 45,5% (5/11) para ceftriaxona e 63,6% (7/11) para cefalotina e cefoxitina, respectivamente.

6. CONCLUSÕES

- As infecções do conduto auditivo externo de cães foram prevalentes em relação aos processos infecciosos avaliados (29,3%).
- Na etiologia dos processos infecciosos de animais de companhia avaliados foi detectada prevalência do gênero *Staphylococcus* spp. (50%), seguido de 26,5% de Enterobactérias e 5,5% de *Pseudomonas* spp..
- A caracterização genotípica das espécies de *Staphylococcus* spp., através do DNAr para *S. aureus*, e *nuc 3* e *4* para *S. intermedius* resultou em percentuais de 35% e 13 %, respectivamente e confirmou a identificação fenotípica. Os genes *nuc 1* e *2* detectaram 22% de *S. hyicus*.
- Os *Staphylococcus* spp. apresentaram significativos percentuais de resistência à penicilina, ampicilina, cefoxitina, ceftriaxona, azitromicina e clindamicina.
- As Enterobactérias foram resistentes à enrofloxacina e tetraciclina, enquanto *Pseudomonas* spp. à ceftriaxona.
- O teste de difusão em disco detectou resistência à azitromicina em 55% dos *Staphylococcus* spp. e 53,1% dos Bastonetes Gram-negativos.
- A CIM_{50/90} determinada pela técnica de microdiluição em caldo foi de 16,0 µg/mL e 64 µg/mL para *Staphylococcus* spp., e 256µg/mL e >512µg/mL para BGN.
- O gene *ermC* foi detectado em 24% dos *Staphylococcus* spp., o gene *ermA* em 12% e o gene *ermB* em 3% destes isolados, o gene *mef* não foi detectado.
- O fenótipo de resistência constitutiva (cMLS_B) à azitromicina foi detectado em 21,4% dos *Staphylococcus* spp. positivos para o gene *ermA* e *ermC*.
- O fenótipo de resistência induzida (iMLS_B) foi detectado em quatro *Staphylococcus* spp. positivos para o gene *ermA* e *ermC*.
- Um total de 25% (25/100) dos isolados de *Staphylococcus* spp. foi positivo para o gene *mecA*.. Sendo 8 isolados de *S.aureus*, 8 de *S. intermedius*, 3 de *S. hyicus* e 6 SCNs.
- O teste “Ágar screen” apresentou sensibilidade significativa, sendo o mais fidedigno na detecção da resistência à oxacilina em isolados positivos para o gene *mecA*.
- Foi possível detectar resistência a pelo menos um dos antibióticos β-lactâmicos avaliados em 88% (22/25) dos *Staphylococcus* spp. *mecA* positivos.
- Foram detectados três isolados com todos os genes do sistema *mec* (*mecA-mecI-mecR1*) e estes apresentaram resistência à oxacilina na maioria dos testes fenotípicos.
- Foi detectado somente o gene *blaZ* em 9% dos 100 isolados de *Staphylococcus* spp. Um total de 19% foi positivo para os genes *blaZ* e *blaI*. Em apenas 3% foi possível detectar todos os genes do sistema *blaZ*, *blaI* e *blaR1*.
- O gene *femA* (132 pb) foi detectado em 31,8% (7/22) dos *Staphylococcus aureus* avaliados e em 53,8% (7/13) dos *S. hyicus*, em 25,7% (9/35) dos *S. intermedius* e em uma espécie de SCN (8,3%, 1/12), *S. epidermidis*.
- Em 60% dos *Staphylococcus* spp. *mecA* positivos foi detectado o fenótipo de resistência à azitromicina.
- Um total de 50% dos *Staphylococcus* spp. produtores de β-lactamase portadores do gene *blaZ* também foram portadores de genes *erm*, apontando para o possível envolvimento do mecanismo de alteração do padrão de produção de β-lactamase na resistência à azitromicina.
- A técnica de microplaca detectou 81% de *Staphylococcus* spp. produtores de “slime”. Um total de 15% dos isolados foram positivos para genes *icaA* e *icaD*,

respectivamente. A técnica de ágar vermelho congo apresentou-se pouco específica para detecção de isolados produtores de “slime”.

- Hemólise foi detectada em 43% dos *Staphylococcus* spp., sendo prevalente a β -hemolisina. Em 38,6% dos *Staphylococcus* spp. não-hemolíticos foi observado efeito sinérgico. Os genes *hla* e *hlb* foram detectados em 48,8% dos *Staphylococcus* spp. hemolíticos.
- O gene *spaA* foi detectado em 100% dos *Staphylococcus aureus*, em 88,2% dos *S. intermedius* e em 75% dos *S. hyicus*. O perfil predominante foi o de 12 repetições de unidades repetidas da região X.
- Os *Staphylococcus* spp. fenotipicamente produtores de coagulase foram 100% positivos para o gene *coa*.
- O gene *agr* foi detectado em 29% dos *Staphylococcus* spp.. Em apenas 5% dos isolados o gene *agr* apresentou regulação positiva de hemolisinas e “slime” e negativa do gene *spaA*.

6.1. Considerações Finais

- A grande diversidade de espécies bacterianas envolvida na etiologia dos processos infecciosos de animais de companhia torna a execução de testes de identificação bacteriana e o antibiograma ferramentas importantes para evitar falhas na terapêutica veterinária.
- O aumento da pressão seletiva pode induzir alguns mecanismos de resistência, como observado para azitromicina e oxacilina em isolados de *Staphylococcus* spp..
- Os *Staphylococcus* possuem a habilidade de desenvolver diferentes mecanismos de resistência a antimicrobianos gerando resultados heterogêneos em testes fenotípicos, tornando necessárias análises genéticas para uma correlação fidedigna.
- Há necessidade de se avaliar os fatores de virulência expressos por *Staphylococcus* spp. para ampliar o conhecimento a respeito do potencial patogênico deste agente quando associado à infecções de animais de companhia.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AARESTRUP, F.M., WEGENER, H.C., ROSDAHL, V.T. Evaluation of phenotypic and genotypic methods for epidemiological typing of *Staphylococcus aureus* isolates from bovine mastitis in Denmark. *Veterinary Microbiology*. v.45, pp.139-150, 1995.

AARESTRUP, F.M.; SEYFARTH, A.M.; EMBORG, H.; PEDERSEN, K.; HENDRIKSEN, R.S.; BAGER, F. Effect of Abolishment of the Use of Antimicrobial Agents for Growth Promotion on Occurrence of Antimicrobial Resistance in Fecal Enterococci from Food Animals in Denmark. *Antimicrobial Agents Chemotherapy*. v. 45. pp. 2054-2059, 2001.

AARESTRUP, F. M. Comparative ribotyping of *Staphylococcus intermedius* isolated from members of the Canidea gives possible evidence for hostspecificity and co-evolution of bacteria and hosts. *International Journal Systematic and Evolutionary Microbiology*, v.51, pp.1343–1347, 2001.

ABDELNOUR, A.; ARVIDSON, S.; BREMELL, T.; RYDEN, C.; TARKOWSKI, A. The accessory gene regulator (*agr*) controls *Staphylococcus aureus* virulence in a murine arthritis model. *Infection and Immunity*. v.61 pp.3879–3885, 1993.

AGUILAR, B.; AMORENA, B; ITURRALDE, M. Effect of slime on adherente of *Staphylococcus aureus* isolated from bovine and ovine mastitis. *Veterinary Microbiology*. v.78, pp.183-191, 2001.

AJUWAPE, A.T.P.; OYEBANJI, M.O.; ADETOSOYE, A.I; Bacteriological examination of normal upper respiratory tract of puppies with particular reference to staphylococci. *Veterinarski Arhiv*, v.76, n.2, pp.179-184, 2006.

ALMEIDA R.; MATTHEWS E.; CIFRIAN A.; GUIDRY A.; OLIVER S. *Staphylococcus aureus* invasion of bovine mammary epithelial cells. *Journal of Dairy Science*. v.79, pp.1021-1026, 1996.

ALONSO D.O.V.; DAGGETT V. Staphylococcal Protein A: Unfolding Pathways, Unfolded States, and Differences between the B and E Domains. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*. v.97, pp.133-138, 2000.

AMORENA, B., BASELGA, R., AGUILAR, B. Factors influencing the degree of in vitro bacterial adhesion to ovine mammary gland epithelial cells. *Veterinary Microbiology*. v.24, pp.43-53, 1999.

AMSDEN, G.W. Pneumococcal macrolide resistance—myth or reality?. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. v.44, pp.1-6, 1999.

ANDRADE, A.L.; STRINGHINI, G.; BONELLO, F.L.; MARINHO, M.; PERRI, S.H.V. Microbiota conjuntival de cães da cidade de Araçatuba (SP). *Arquivos Brasileiros de Oftalmologia*, v.65, pp.323-326, 2002.

ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Detecção e Isentificação de Bactérias e Importância Médica. Módulo V, pp.5-8, 2005.

ARCHER, G.L.; NIEMEYER, D.M.; THANASSI, J.A.; PUCCI, M.J. Dissemination among staphylococci of DNA sequences associated with methicillin resistance. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v.38, pp.447-454, 1994.

ARCIOLA, C.R.; COLLAMATI, S.; DONATI, E.; MONTANARO, L. A rapid PCR method for the detection of slime producing strains of *Staphylococcus epidermidis* and *S. aureus* in perioprosthesis infections. *Diagnostic Molecular Pathology*. v.10 pp. 130-137, 2001.

BASELGA, R. et al. Phase variation of slime production in *Staphylococcus aureus*: implications in colonization and virulence. *Infection and Immunity*. v.61, pp.4857-4862, 1993.

BAYLES K., WESSON C., LIOU L., FOX L., BOHACH G., TRUMBLE W. Intracellular *Staphylococcus aureus* escapes the endosome and induces apoptosis in Epithelial cells. *Infection and Immunity*. v.66, pp.336-342, 1998.

BLONDEAU, J.M. The evolution and role of macrolides in infectious diseases. Summary Expert Opinion on Pharmacotherapy. v.3, n.8, pp.1131-1151, 2002.

BRAGA, C.A.S.B.; RESENDE, C.M.F.; PESTANA, A.C.N.R.; CARMO, L.S.; SILVA, L.A.F.; ASSIS, L.N.; LIMA, L.A.; FARIAS, L.M.; CARVALHO, M.A.R. Isolamento e identificação da microbiota periodontal de cães da raça pastor alemão. *Ciência Rural*, v.35, n.2, p.35, 2005.

BROOKS, G. F; BUTEL, J S.; MORSE, S. A. Microbiologia Médica. 21.ed., Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, p.158, 2000.

BROWN, D.F.J.; YATES, V.S. Methicillin susceptibility testing of *Staphylococcus aureus* on media containing five percent sodium chloride. *European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Disease*. v.726, p.8, 1986.

BROWN, D.F.J.; EDWARDS, D.I.; HAWKEY, P.M.; MORRISON, D.; RIDGWAY, G.L.; TOWNER, K.J.; WREN, M.W.D. On behalf of the Joint Working Party of the Britis, Guidelines for the laboratory diagnosis and susceptibility testing of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). *Journal Antimicrobial Chemotherapy*, v.56, pp.1000-1018, 2001.

CALVINHO, L. F., F. G. TOSELLI, W. R. WEIMANN, V. R. CANAVESIO, V. E. NEDER, AND I. A. IGUZQUIZA. Antimicrobial sensitivity of coagulase-positive staphylococcal strains isolated from bovine mastitis in the central dairy catchment area of Argentina. *Revista Argentina de Microbiología*. v.34, pp.171–175, 2002.

CAUWELIER, B.; GORDTS, B.; DESCHEEMAECER, P.; VAN LANDUYT, H. Evaluation of a disk diffusion method with cefoxitin (30µg) for detection of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Disease*. v.23, pp.389–392, 2004.

ÇETIN, C.; SENTÜRK, S.; KACABIYIK, A.L.; TEMIZEL, M.; ÖZEL, E.; Bacteriological Examination of urines samples from dogs with symptoms of urinary tract infection. Turkish Journal of Veterinary Animal Sciences, v.23, pp.1225-1229, 2003.

CHAPMAN, G.; BERENS, C.; PETERS, A.; CURCIO, L. The differentiation of pathogenic staphylococci from non-pathogenic types. Journal of Bacteriology. XXVIII, p.343, 1934.

CHANG, S.; SIEVERT, D.M.; HAGEMAN, J.C.; BOULTON, M.L.; TENOVER, F.C.; DOWNES, F.P.; SHAH, S.; RUDRIK, J.T.; PUPP, G.R.; BROWN, W.J.; CARDO, D.; FRIDKIN, S.K. Infection with vancomycin-resistant *Staphylococcus aureus* containing the *vanA* resistance gene. The New England Journal of Medicine. v.348, pp.1342-1347, 2003.

CHRISTENSEN, G.D.; SIMPSON, W.A.; YOUNGER, J. J.; BADDOUR, M. L.; BARRET, F. F.; MELTON, D. M.; BEACHEY, E. H. Adherence of coagulase--ative staphylococci to plastic tissue culture plates: a quantitative model for the adherence of staphylococci to medical devices. Journal of Clinical Microbiology. v. 22, pp.996-1006, 1985.

CIFRIAN, E.; GUIDRY, A.J.; O'BRIEN, C.N.; MARQUARDT, W.W. Effect of alpha-toxin and capsular exopolysaccharide on the adherence on *S.aureus* to cultured teat, ductal and secretory mammary epithelial cells. Research Veterinary Science. v.58 pp.20-25, 1995.

CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE. Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically. Approved standards. CLSI document M45-P, Wayne, Pa, 2005.

CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE (CLSI). Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically. Approved standards. CLSI document M45-P, Wayne, Pa, 2009.

COELHO, S.M.O.; PEREIRA, I.A.; MORAES, R.A.M.; OLIVEIRA, D.F.B.; SOUZA, M.M.S. Avaliação do Perfil de Resistência e Detecção do Gene *mecA* de *Staphylococcus* spp. Isolados de Otite Canina. Revista da Universidade Rural - Série Ciências da Vida. v.25, supl., pp.337-338, 2005.

COELHO S.M.O.; MENEZES R.A.; SOARES L.C.; PEREIRA I.A.; GOMES L.P.; SOUZA M.M.S. Mapeamento do Perfil de Resistência e Detecção do gene *mecA* em *Staphylococcus aureus* e *Staphylococcus intermedius* oxacilina-resistentes isolados de espécies humanas e animais. Ciência Rural. v.37, pp.195-200, 2007.

COELHO S.M.O. Caracterização fenotípica e genotípica de fatores de virulência e resistência à oxacilina em *staphylococcus* spp. coagulase-positivos isolados de mastite bovina. Tese de doutorado. Instituto de Veterinária. Universidad Federal Rural do rio de Janeiro. p.77, 2008.

COLOMBINI, S.; MERCHANT, S.R.; HOSGOOD, G. Microflora and antimicrobial susceptibility patterns from dogs with otitis media. Veterinary Dermatology, v.11, pp.235-239, 2000.

COGGAN, J.A.; OLIVEIRA, C.M.; FAUSTINO, M.; MORENO, A.M.; VON SYDOW, A.C.; MELVILLE, P.A.; BENITES, N.R. Estudo microbiológico de conteúdo intra-uterino de Cadelas com piometra e pesquisa de fatores de Virulência em cepas de *Escherichia coli*. Arquivos do Instituto Biológico. v.71, pp.513-515, 2004.

CONLON, K.M.; HUMPHREYS, H.; O' GARA, J.P. Inactivations of *rsbU* and *sarA* by IS256 represent novel mechanisms of biofilm phenotypic variation in *Staphylococcus epidermidis*. Journal of Bacteriology. v.186, pp.6208-6219, 2004.

COSTA, L. M.; RAMOS, I. B.; CARVALHO, D. G.; JÚNIOR, R. D. Análise da sensibilidade do *Staphylococcus aureus* hospital aos antimicrobianos no período 1988-1993. In: Programa Oficial e Resumos de Trabalhos do VIII Congresso Brasileiro e Infectologia, Porto Alegre, Resumo, n.111. pp.87, 1994.

CUNHA, M.L.R.S. Significância etiológica e características de estafilococos coagulase-negativo isolados de processos infecciosos em recém-nascidos. [Tese (doutorado). Faculdade de Medicina. Unesp. Botucatu, SP; 1998].

CUTERI, V.; MARENZONI, M.L.; VALENTE, F.; MAZZOLLA, R.; TOSTI, N.; BUONCRISTIANI, E.; CARACCILO, M.R.M.; ARCIONI, S.; MERLETTI, L.; VALEMTE, C. Methicillin resistant and Methicillin susceptible *Staphylococcus aureus*: comparison of genomic similarity of strains isolated from human and veterinary specimens using amplified fragment length polymorphisms (AFLP). Journal of Animal and Veterinary Advances. V.4, n.12, pp.1000-1003, 2005.

DAGAN, R.; KLUGMAN, K.P.; CRAIG, W.A.; BAQUERO, F. Evidence to support the rationale that bacterial eradication in respiratory tract infection is an important aim of antimicrobial therapy. Journal of Antimicrobial and Chemotherapy. v.47, pp.129-140, 2001.

DANCER, S.J. The problem with cephalosporins. Journal of Antimicrobial and Chemotherapy. v.48, pp.463-478, 2001.

DAUM, R.S.; ITO, T.; HIRAMATSU, K.; HUSSAIN, F.; MONGKOLRATTANOTHAI, K.; JAMKLANG, M.; BOYLE-VAVRA, S. A novel methicillin-resistance cassette in community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates of diverse genetic backgrounds. Journal of Infectious Disease, v.186, pp.1344-1347, 2002.

DEMO, M. Caracterización y estudios de patogenicidad de cepas del género *Staphylococcus* aisladas de leches mastíticas. Instituto de Microbiología, Universidad Nacional de Río Cuarto, 1996.

DE JONGE, B.L.; SYDOW, T.; CHANG, Y.S.; LABISCHINSKI, H.; BERGER-BACHI, B.; GAGE, D.A.; TOMASZ, A. Altered muropeptide composition in *Staphylococcus aureus* strains with an inactivated *femA* locus. Journal of Bacteriology. v.175, n.9, pp.2779-2782, 1993

DE OLIVEIRA, A. P.; WATTS, J. L.; SALMON, S.A.; AARESTRUP, F.M. Antimicrobial Susceptibility of *Staphylococcus aureus* Isolated from Bovine Mastitis in Europe and the United States. *Journal of Dairy Science*. v.83, pp.855–862, 2000.

DEVRIESE L.A. A simplified system for biotyping *Staphylococcus aureus* strains isolated from different animal species. *Journal of Applied Bacteriology*. v.56, pp.215-220, 1984.

DINGES, M.M.; ORWIN, P.M.; SCHLIEVERT, P.M. Exotoxins of *Staphylococcus aureus*. *Clinical Microbiology Reviews*. v.13, pp.16-34, 2000.

DOBINSKY, S.; BARTSCHT, K.; MACK, D. Influence of Tn917 insertion of transcription of the *icaADBC* operon in six biofilm-negative transposon mutants of *Staphylococcus epidermidis*. *Plasmid*. v.47, pp.10-17, 2002.

D'OLIVEIRA, R.E.C.; BARROS, R.R.; MENDONÇA, C.R.V.; TEIXEIRA, L.M.; CASTRO, A.C.D. Susceptibility to antimicrobials and mechanisms of erythromycin resistance in clinical isolates of *Streptococcus agalactiae* from Rio de Janeiro, Brazil. *Journal of Medicine Microbiology*. v.52, pp.1029-1030, 2003.

DOMINGUES, L.M.; AKESSI, A.C.; SCHOKEN-ITURRINO, R.P.; DUTRA, L.S. Microbiota saprófita associada à doença periodontal em cães. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*. v.51, n.4, pp.89-100, 1999.

DUARTE, R.S.; MIRANDA, O.P.; BELLEI, B.C.; BRITO, M.A.V.P.; TEIXEIRA, L.M. Phenotypic and molecular characteristics of *Streptococcus agalactiae* isolates recovered from milk of dairy cows in Brazil. *JOURNAL OF CLINICAL MICROBIOLOGY*. v.42, n.9, pp.4214–4222, 2004.

FAGUNDES, H.; OLIVEIRA, C.A.F. Infecções intramamárias causadas por *Staphylococcus aureus* e suas implicações em saúde pública. *Ciência Rural, Santa Maria*. v.34, n.4, pp.1315-1320, 2004.

FARIAS, M.F. Terapêutica otológica. In: Manual de terapêutica veterinária. 2.ed. São Paulo: Roca, 2002.

FELTEN, A.; GRANDRY, B.; LAGRANGE, P. H.; CASIN, I. Evaluation of three techniques for detection of low-level methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA): a disk diffusion method with cefoxitin and moxalactam, the Vitek 2 system, and the MRSA-Screen latex agglutination test. *Journal of Clinical Microbiology*. v.40 p.2766–2771, 2002.

FENG, Y.; CHEN, C.J.; 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, 2007.

FRANK. L.A.; KANIA, S.A.; HNILICA, K.A. Isolation of *Staphylococcus schleiferi* from dogs with pododermatitis. *Journal of The American Veterinary Medical Association*. v.222, p.451-454, 2003.

FRANSSON, B. A; RAGLE, C.A. Canine Pyometra: An Update on Pathogenesis and Treatment. Compendium, Washington. v.25, n.8, p.602-612, 2003

FRENAY H., BUNSCHOTEN A., SCHOULS L., VAN LEEUWEN W., VANDENBROUCKE-GRAULS C., VERHOEF J., MOOI F. Molecular typing of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* on the basis of protein A gene polymorphism. European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases. v.15, p.60-64, 1996.

GAHRN-HANSEN, B. Coagulase-negative staphylococci and micrococci in clinical microbiology. Danish Medicine Bulletin, v.34, p.96-115, 1987.

GALDBART, J.O. et al. Screening for *Staphylococcus epidermidis* markers discriminating between skin-flora strains and those responsible for infections of jointprostheses. Journal Infection Disease. v. 5, p. 351-355, 2000.

GARBER, R. Inteligência Competitiva de Mercado. Ed. Madras editora LTDA-São Paulo, pp.248-249, 2001.

GEHA, J.; UHL, J.R.; GUSTAFERRO, C.A.;PERSING, D. H. Multiplex PCR for identification of methicillin-resistant staphylococci in the clinical laboratory. Journal of Clinical Microbiology. v.32, p.1768-1772, 1994.

GENTILINI, E.; DENAMIEL, G.; BETANCOR, A. Antimicrobial susceptibility of coagulase-negative staphylococci isolated from bovine mastitis in Argentina. Journal of Dairy Science. v. 85, p.1913-1917, 2000.

GILLASPY, A. F., HICKMON, S. G., SKINNER, R. A., THOMAS, J. R., NELSON, C. L., SMELTZER, M. S. Role of the accessory gene regulator (*agr*) in pathogenesis of staphylococcal osteomyelitis. Infection and Immunity. v.63 p.3373-3380, 1995.

GILLIS, R.J.; WHITE, K.G.; CHOI, K.; WAGNER, V.E.; SCWEISER, H.P.; IGLEWSKI, B.H. Molecular basis of Azithromycin-Resistant *Pseudomonas aeruginosa* Biofilms. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, v.49, n.09, p.3858-3867, 2005.

GILOT P.; VAN LEEUWEN W. Comparative analysis of *agr* locus diversification and overall genetic variability among bovine and human *Staphylococcus aureus* isolates. Journal of Clinical Microbiology. v.42, p.1265-1269, 2004.

GIOSO, M.A. Odontologia veterinária: pequenos animais. 2.ed. São Paulo, p.45, 1993.

GIRARD, A.E.; GIRARD, D.; RETSEMA, J.A. Correlation of the extravascular pharmacokinetics of Azithromycin with in vivo efficacy in models of localized infection. Journal of Antimicrobial Chemotherapy, v.25(A), p.61-71, 1990.

GIRAUDO A., RAMPONE H., CALZOLARI A., NAGEL R. Phenotypic characterization and virulence studies of *agr-sae* double mutants of *Staphylococcus aureus*. Canadian Journal of Microbiology. v.32, p.120-123, 1999.

GOH, S. H.; BYRNE, S. K.; ZHANG, J. L.; CHOW, A. W. Molecular typing of *Staphylococcus aureus* on the basis of coagulase gene polymorphisms. *Journal of Clinical Microbiology*. v.30, p.1642-1645, 1992.

GOTZ, F. *Staphylococcus* and biofilms. *Molecular Microbiology*. v.43, p.1367–1378, 2002.

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, n.23, p.7, 2004.

GUARDABASSI, L.; SCHWARZ, S.; LLOYD, D.H. Pet animals as reservoirs of antimicrobial-resistant bacteria. *Journal of Antimicrobial and Chemotherapy*. v.54, pp.321–332, 2004.

HAMILTON-MILLER, J.M.T.; SHAH, S. Patterns of phenotypic resistance to macrolide-lincosamide-ketolide-streptogramin group of antibiotics in staphylococci. *Journal of Antimicrobial and Chemotherapy*. v.46, pp.941-949, 2000.

HANSEN, G.T.; METZLER, K.L.; DECAROLIS, E.; BLONDEAU, J.M. The macrolides. *Expert Opinion on Investigational Drugs*. v.11, n.2, pp.189-215, 2002.

HARIHARAN, H.; COLES, M.; POOLE, D.; LUND, L.; PAGE, R. Update on microbial susceptibilities of bacterial isolates from canine and feline otitis externa. *Canadian Veterinarian Journal*. v.47, pp.253-257, 2006.

HARVEY, C.E., EMILY, P.P. *Small animal dentistry*. St. Louis: Mosby Year Book. p.413, 1993.

HEBERT, G.A.; HANCOCK, G.A. Synergistic hemolysis exhibited by species of staphylococci. *Journal of Clinical Microbiology*. v.22, n.3, pp.409-415, 1985.

HIRAMATSU, K. Molecular evolution of MRSA. *Microbiology and Immunology*. v.39, pp.531-543, 1995.

HIRAMATSU, K.; HANAKI, H.; INO, T.; YABUTA, K.; OGURI, T. ; TENOVER, F.C. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clinical strain with reduced vancomycin susceptibility. *Journal of Antimicrobial and Chemotherapy*. v.40, pp.135-136, 2001.

HIRST, D.C.; ZEE, Y.C. *Microbiologia Veterinária*. ED. Guanabara Koogan, pp.212-215, 2003.

HOFFMAN, H. *O Gato*. Tradução do Inglês Valter Lellis Siqueira. São Paulo: Editora Martins Fontes, Título original: Katzen Richtig Verstehen. Instituto Pasteur. p.173, 1997.

HOLDEN, M.T.G.; FEIL, E.J.; LINDSAY, J.A.; PEACOCK, S.J.; DAY, N.P.J.; MARK C.; ENRIGHT, M.C.; FOSTER, T.J.; MOORE, C.E.; HURST, L.; ATKIN, R.; BARRON, A.; BASON, N.; BENTLEY, S.D.; CHILLINGWORTH, C.; CHILLINGWORTH, T.; CHURCHER, C.; CLARK, L.; CORTON, C.; CRONIN, A.;

DOGGETT, J.; DOWD, L.; FELTWELL, T.; HANCE, Z.; HARRIS, B.; HAUSER, H.; HOLROYD, S.; JAGELS, K.; JAMES, K. D.; LENNARD, N.; LINE, A.; MAYES, R.; MOULE, S.; MUNGALL, K.; ORMOND, D.; QUAIL, M.A.; RABBINOWITSCH, E.; RUTHERFORD, K.; SANDERS, M.; SHARP, S.; SIMMONDS, M.; STEVENS, K.; WHITEHEAD, S.; BARRELLS.G.; SPRATT, B.G.; PARKHILL, J. Complete genomes of two clinical *Staphylococcus aureus* strains: Evidence for the rapid evolution of virulence and drug resistance. Proceedings of the National Academy of Science. USA. v.101, pp.9786-9791, 2004.

HOLM, B.R.; PETERSSON, U.; MORNER, A. Antimicrobial resistance in staphylococci from canine pyoderma: a prospective study of first-time and recurrent cases in Sweden. The Veterinary Record. v.151, n.600, p.5, 2002.

HORSTKOTTE, M.A. Rapid detection of methicillin resistance in coagulase-negative staphylococci by a penicillin-binding protein 2a-specific latex agglutination test. Journal of Clinical Microbiology. v.39, n.10, pp.3700-3702, 2002.

HUSSAIN, Z.; STOAKES, L.; MASSEY, V.; DIAGRE, D.; FITZGERALD, V.; SAYED, S.; LANNIGAN, R. Correlation of oxacillin MIC with *mecA* carriage in coagulase-negative Staphylococci. Journal of Clinical Microbiology. v.38, pp.752-754, 2000.

ITO T; KATAYAMA Y.; ASDA K.; MORI N.; TSUTSUMIMOTO K.; TIENSASITORN C.; HIRAMATSU K. Structural comparison of three types of staphylococcal cassette chromosome *mec* integrated in the chromosome in methicillin-resistant *S. aureus*. Antimicrobial Agents and Chemotherapy. v.45, pp.1323-1336, 2001.

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, *ccr*. Antimicrobial Agents and Chemotherapy. v.48, pp. 2637-2651, 2004.

JANSEN, M.D.; BOX, A.T.A.; FLUIT, A.C. SCC*mec* Typing in Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Strains of Animal Origin. Emerging Infectious Diseases.v.15, n.1, p.136, 2009.

JAPONI, A.; ALBORZI, A.; MANOOCHEHR, R.; POURABBAS, B. Modified DNA extraction for rapid PCR detection of methicillin-resistant staphylococci. Iranian Biomedical Journal. v.8, n.3, pp.161-164, 2003.

JEFFERSON, K. K. What drives bacteria to produce a biofilm? FEMS Microbiology Letters.v.236, pp.163-173, 2004.

JOHN, J.F.; BARG N.L. *Staphylococcus aureus*. In: *Hospital Epidemiology and Infection Control*. Mayhall, C.G. (ed.) 1st ed. Williams & Wilkins Company, Baltimore, USA. pp.271-289, 1996.

JOHNSTON, S. D.; KUSTRITZ, M. V.R.; OLSON, P. N. S. Canine and feline Theriogenology. Philadelphia: WB Saunders Company, p.592, 2001.

KAIDA, S. Nucleotide and deduced amino acid sequence of staphylocoagulase gene from *Staphylococcus aureus* strain 213. *Nucleic Acids Research*.v.17, p.8871, 1989.

KARAHAN, M.; CETINKA, Y.A. B. Coagulase gene polymorphisms detected by PCR in *Staphylococcus aureus* isolated from subclinical bovine mastitis in Turkey. *Veterinary Journal*. v.174, n.2, pp.428-431, 2007.

KARLOWSKY, J.; SAHM, D. Antibiotic resistance – is resistance detected by surveillance relevant to predicting resistance in clinical setting?. *Current Opinion in Pharmacology*. v.2, n.1471, pp.4892-4902, 2002.

KATAYAMA, Y.; ITO, T.; HIRAMATSU, K. A new class of genetic element, staphylococcus cassette chromosome *mec*, encodes methicilin resistance in *Staphylococcus aureus*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. v.44, p.1549-1555, 2000.

KATAYAMA, Y.; ITO, T.; HIRAMATSU, K. Genetic organization of the chromosome region surrounding *mecA* in clinical staphylococcal strains: role of *IS431*-mediated *mecI* deletion in expression of resistance in *mecA*-carrying, low-level methicillin-resistant *Staphylococcus haemolyticus*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. v.45, n.7, pp.1955-1963, 2001.

KASZANYITZKY E.J.; EGYED Z.; JANOSI S.; KESERU J.; GAL Z.; SZABO I.; VERES Z.; SOMOGY, I. Staphylococci isolated from animals and food with phenotypically reduced susceptibility to beta-lactamase-resistant beta-lactam antibiotics. *Acta Veterinaria Hungarica*. v.52, n.1, pp.7-17, 2004.

KATCHER, A.; FRIEDMAN, E. Potential health value of pet ownership. *Practices Veterinary*. v.2, p.117, 1980.

KIMPE, A.; DECOSTERE, A.; BAELE, M.; DEVRIESE, L.A.; HAESEBROUCK, F. Presence and mechanism of macrolide-lincosamide resistance in *Enterococcus columbae* strains belonging to intestinal flora of pigeons. *Avian Pathology*. V.33, n.3, pp.310-313, 2004.

KOGIKA, M.M.; FORTUNATO, V.A.B.; MAMIZUKA, E.M.; HAGIWARA, M.K.; PAVAN, M.F.B.; GROSSO, S.N.A.: Etiologic study of urinary tract infection in dogs. *Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science*. v.32, pp.31-36, 1995.

KOHNER, J. P.; UHL, J.; KOLBERT, C.; PERSING, D. ; COCKERILL, F. A Comparison of susceptibility testing methods with *mecA* Gene analysis for determining oxacilin (methicilin) resistance in clinical isolates of *Staphylococcus aureus* and coagulase-negative *staphylococcus* spp.. *Journal of Clinical Microbiology*. v.37, n.9 pp.2952-2961, 1999.

KONEMAN, E.W.; ALLEN, S.D.; JANDA, W.M; SCHRECKENBERGER, P.C.; WINN JR. *Diagnóstico Microbiológico*. 5.ed. Rio de Janeiro: Editora MEDS, 2008.

KONG KF, VUONG C; OTTO M. *Staphylococcus* quorum sensing in biofilm formation and infection. Journal of Medical Microbiology. v.296, pp.133–139, 2006.

KOREEN, L.; RAMASWAMY, S.V.; GRAVISS, E.A.; NAIDICH, S.; MUSSER, J. M.; KREISWIRTH, B.N. *spa* typing method for discriminating among *Staphylococcus aureus* isolates: implications for use of a single marker to detect genetic micro- and macrovariation. Journal of Clinical Microbiology. v.42, pp.792–799, 2004.

KREISWIRTH B.; KORNBLUM J.; ARBEIT R.; EISNER W.; MASLOW J.; MCGEER A.; LOW, D.Y.; NOVICK, R. Evidence for a clonal origin of methicillin resistance in *Staphylococcus aureus*. Science. v.259, pp.227-230, 1993.

KRUT O., UTERMOHLEN O., SCHLOSSHERR X., KRONKE M. Strain-specific association of cytotoxic activity and virulence of clinical *Staphylococcus aureus* isolates. Infection and Immunity. v.71, p.2716-23, 2003.

KWON, N.H.; PARK, K.T.; JUNG, W.K.; YOUN, H.Y.; LEE, Y.; KIM, S.H.; BAE, W.; LIM, J.Y.; KIM, J.Y.; KIM, J.K.; HONG, S.K.; PARK, Y.H. Characteristics of methicillin resistant *Staphylococcus aureus* isolated from chicken meat and hospitalized dogs in Korea and their epidemiological relatedness. Veterinary Microbiology. V.117, PP.304-312, 2006.

KUWAHARA-ARAI, K.; KONDO, N.; HORI, S.; TATEDA-SUZUKI, E; HIRAMATSU. Suppression of methicillin resistance in *mecA*-containing pre-methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strain is caused by the *mecI*-mediated repression of PBP2' production. Antimicrobial Agents and Chemotherapy. v.40, pp.2680-2685, 1996.

LANGONI, H.; MENDONÇA, A.O.; DEVELLEY, A. Avaliação do uso da associação da bromexina com gentamicina no tratamento da mastite subclínica bovina. Nappama. v.1 pp.4-7, 2000.

LECLERCQ, R. Mechanisms of resistance to macrolides and lincosamides: nature of the resistance elements and their clinical implication. Antimicrobial Resistance. v.34, pp.482-492, 2002.

LEE, J.H.; Occurrence of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains from cattle and chicken, and analyses of their *mecA*, *mecR1* and *mecI* genes. Veterinary Microbiology. v.114, pp.155-159, 2006.

LEITE, C.A.L. As otites de cães e gatos. Parte 1– epidemiologia. Cães e Gatos, v.15, pp.22-26, 2000.

LEWIS, R.A.; DIKE, K.G.H. *MecI* repress synthesis from the β -lactamase operon of *Staphylococcus aureus*. Journal of Antimicrobial Chemotherapy. v.5, pp.139-144, 2005.

LEVY, C.E. Aspectos Microbiológicos. Infecção Hospitalar: prevenção e controle. São Paulo, Sarvier. pp.591-598, 1997.

LI, X.Z.; MEHROTRA, M.; GHIMIRE, S.; ADEWOYE, L. β -Lactam resistance and β -lactamases in bacteria of animal origin . Veterinary Microbiology. v.121(3-4), pp.197-214, 2007.

LILENBAUM, W.N.; NUNES, E.L.C.; AZEREDO, M.A.I. Prevalence and Antimicrobial susceptibility of staphylococci isolated from skin surface of clinically normal cats. Letters in Applied Microbiology. v.27, pp.224-228, 1998.

LIM, J.A., KWON, A.R., KIM, S.K., CHOMG, Y., LEE, K., CHOI, E.C. Prevalence of resistance to macrolide, lincosamide and streptogramin antibiotics in Gram-positive cocci isolated in Korean hospital. Journal of Antimicrobial Chemotherapy. v.49, pp.489-495, 2002.

LING, G.V.; NORRIS, C.R.; FRANTI, C.E.; EISELE, P.H.; JOHNSON, D.L.; RUBY, A.L.; JANG, S.S. Interrelations of organisms prevalence, specimen collection method, and host age, sex and breed among 8,354 canine urinary tract infections (1969-1995). Journal of Veterinary Internal Medicine. v.15, pp.341-347, 2001.

LINEHAN, D.; ETIENNE, J. ; SHEEHAN, D. Relationship between haemolytic and sphingomyelinase activities in a partially purified β -like toxin from *Staphylococcus schleiferi*. FEMS: immunology and medical microbiology. v.36, pp. 95-102, 2003.

LOEFFLER, A.; BOAG, A.; SUNG, J.; LINDSAY, J.A.; GUARDABASI, L.; DALSGAARD, A.; SMITH, H.; STEVENS, K.B.; LLOYD, D.H. Prevalence of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* among staff and pets in a small referral hospital in the UK. Journal of Antimicrobial Chemotherapy. v.56, n.4, pp.692-697, 2005.

LOW, D.E.; AZAVEDO, J.; WIES, K.; MAZZULI, T.; KUHN, M.; CHURCH, D.; FORWARD, K.; ZAHNEL, G.; SIMOR, A.; MCGEER, A. antimicrobial resistance among clinical isolates of *Streptococcus pneumoniae* in Canada during 2000. Antimicrobial Agents and Chemotherapy. v.46, n.5, pp.1295-1301, 2002.

LOWY, F.D. Antimicrobial resistance: the example of *Staphylococcus aureus*. The Journal of Clinical Investigation. v.111, pp.1265-1273, 2003.

LÜTHJE, P.; SCHWARZ, S. Antimicrobial resistance of coagulase-negative staphylococci from bovine subclinical mastitis with particular reference to macrolide–lincosamide resistance phenotypes and genotypes. Journal of Antimicrobial Chemotherapy. v.57, pp.966-969, 2006.

LYON, G.J.; WRIGHT, J.S.; MUIR, T.W.; NOVICK, R.P. Key determinants of receptor activation in the *agr* autoinducing peptides of *Staphylococcus aureus*. Biochemistry. v.41, pp.10095-10104, 2002.

MCKINNEY, T.K.; SHARMA, V.K.; CRAIG, W.A.; ARCHER, G.L. Transcription of the gene mediating methicillin resistance in *Staphylococcus aureus* (*mecA*) is corepressed but not coinduced by cognate *mecA* and β -lactamase regulators. Journal of Bacteriology, v.183, pp.6862-6868, 2001.

MAIDHOF, H., B. REINICKE, P. BLUMEL, B. BERGER-BACHI, H. LABISCHINSKI. *FemA*, which encodes a factor essential for expression of methicillin resistance, affects glycine content of peptidoglycan in methicillin-resistant and methicillin-susceptible *Staphylococcus aureus* strains. *Journal of Bacteriology*. v.173, pp.3507-3513, 1991.

MALLORQUÍ-FERNANDÉZ, G.; MARRERO, A.; GARCÍA-PIQUÉ, S.; GARCÍA-CASTELLANOS, R.; GOMIS-RÜTH, F.X.; Staphylococcal methicillin resistance: fine focus on folds and functions. *FEMS Microbiology Letters*. v.235, pp.1-8, 2004.

MANN, C.M.; MARKHAM, J.L. A New method for determining the minimum inhibitory concentration of essential oils. *Journal of Applied Microbiology*. v.84, pp.538-544, 1998.

MANRIQUE, E.I.; GALVÃO, L.L. Racionalização e controle de antimicrobianos. Infecções hospitalares: prevenção e controle. São Paulo, Sarvier. pp.117-130, 1997.

MARANGONI, D.V. *Staphylococcus aureus*. Inf. Hosp. : prevenção e controle. São Paulo, Sarvier. pp.573-591, 1997.

MARTEL, A.; DEVRIESE, L.A.; DECOSTERE, A.; HAES, F. Presence of macrolide resistance genes in streptococci and enterococci isolated from pigs and pork carcasses. *International Journal of Food Microbiology*. v.84, n.1, pp.27-32, 2003.

MARTINEAU, F., PICARD, F.J., LANSAC, N., MÉNARD, C., ROY, P.H., OUELLETTE, M.E BERGERON, M.G. Correlation between the Resistance Genotype Determined by Multiplex PCR Assays and the Antibiotic Susceptibility Patterns of *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v. 44, pp.231-238, 2000.

MASKELL, J.P.; SEFTON, A.M.; WILLIAMS, J.D. Comparative *in vitro* activity of Azithromycin against Gram-positive cocci *Haemophilus influenzae* and anaerobes. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. v.25(A), pp.19-24, 1990.

MISHELIA, G.D.; AMIN, J.D.; CHAUNDHARY, S.U.R. Vaginal bacterial flora of Nigeria local bitches during different stages of reproductive cycle. *International Journal of Agriculture & Biology*, v.3, n.2, pp.183-185, 2001.

MITRA, M.; MAHANTA, S.K.; GUHA, C.; PRAMANKI, A.K. Comparative efficacy of gentamicin, norfloxacin and nitrofurantoin against urinary tract infection in canine. *Indian Veterinary Journal*. v.16, pp.299-301, 1994.

MOODLEY, A., STEGGER, M., BAGCIGIL, A.F., BAPTISTE, K.E., LOEFFLER, A., LLOYDD, H., WILLIAMS, N.J., LEONARD, N., ABBOTT, Y., SKOV, R., GUARDABASI, L. spa typing of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolated from domestic animals and veterinary staff in the UK and Ireland. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. v.58, pp.1118-1123, 2006.

MOON, J.S.; LEE, A.R.; KANG, H.M.; LEE, E.S.; KIM, M.N.; PAIK, Y.H.; PARK, Y.H.; JOO, Y.S.; KOO, H.S. Phenotypic and Genetic Antibigram of

Methicillin-Resistant Staphylococci Isolated from Bovine Mastitis in Korea. *Journal of Dairy Science*. v.90, pp.1176-1185, 2007.

MOORE, R.D.; HELLER, N.; MAJORS, L.J.; WHITLEY, R.D.; BURGESS, E.C.; WEBER, J. Prevalence of ocular microorganisms in hospitalized and stabled horses. *American Journal and Veterinary Research*. v.49, pp.773-777, 1988.

MULLER, G.H.; KIRK, R.W.; SCOTT, D.W. *Dermatologia de pequenos animais*. 3ed. São Paulo ed. manole, p.199, 1995.

MURAKAMI, K.W.; MINAMIDE, K.; WADA, W.; NAKAMURA, E.; TERAOKA, H.; WATANBE, S. Identification of methicillin resistant strains of staphylococci by polymerase chain reaction. *Journal of Clinical Microbiology*. v.29, pp.2240-2244, 1991.

NAYAK, N.; NAG, T.C.; SATPATHY, G.; RAY, S.B. Ultrastructural analysis of slime positive & slime negative *Staphylococcus epidermidis* isolates in infectious keratitis. *Indian Journal of Medicine Research*. v.125, pp.767-771, 2007.

NEU, H.C. Clinical Microbiology of Azithromycin. *The American Journal of Medicine*. v.91(3A), pp.3A-12S, 1991.

NILSSON, I.M.; HARTFORD, O.; FOSTER, T.; TARKOWSKI, A. Alpha-toxin and gamma-toxin jointly promote *Staphylococcus aureus* virulence in murine septic arthritis. *Infection and Immunity*. v.67, pp.1045-1049, 1999.

NOBRE, M.O.; CASTRO, A.P.; NASCENTE, P.S. Occurrence of *Malassezia pachydermatis* and others Infectious agents as cause of External Otitis in Dogs from Rio Grande do Sul State, Brazil (1996/1997). *Brazilian Journal of Microbiology*. v.32, pp.245-249, 2001.

NOVICK, R.P.; PROJAN, S.J.; KORNBLUM, J.; ROSS, H.F.; JI G.; KREISWIRTH, B.; VANDENESCH, F.; MOGHAZEH, S. The *agr* P2 operon, an autocatalytic sensory transduction system in *Staphylococcus aureus*. *Molecular and General Genetics*. v.248, pp.446-458, 1995.

NOVICK, R.P.; JIANG, D. The staphylococcal *saeRS* system coordinates environmental signals with *agr* quorum sensing. *Microbiology*. v.149, pp.2709-2717, 2003.

O'BRIEN, F.G.; ZAINI, Z.; COOMBS, G.W.; PEARSON, J.C.; CHRISTIANSEN, K.; GRUBB, W. Macrolide, lincosamide and streptogramin B resistance in a dominant clone of Australian community methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. v.351, pp.985-986, 2005.

OLIVEIRA, L. C.; MEDEIROS, C. M. O.; SILVA, I. N. G.; MONTEIRO, A. J.; LEITE, C. A. L.; CARVALHO, C. B. M. Susceptibilidade de bactérias isoladas de otite externa canina a distintos antimicrobianos na cidade de Fortaleza/Ceará. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*. v.57, n.3, pp.1325-1330, 2005.

OLIVEIRA, L.C.; LEITE, C.A.L.; BRILHANTE, R.S.N.; CARVALHO, C.B.M. Etiology of canine otitis media and antimicrobial susceptibility of coagulase-positive *Staphylococcus* in Fortaleza city, Brazil. Brazilian Journal of Microbiology. v. 37, pp.44-147, 2006.

OLIVEIRA, D.C.; MILHEIRIÇO, C.; DE LENCASTRE, H. Redefining a structural variant of staphylococcal cassette chromosome *mec*, SCC*mec* type VI. Antimicrobial Agents and Chemotherapy. v.50, pp.3457-3459, 2006.

OLIVEIRA, P.C.; LOPES, M.D.; THOMÉ, H.E.; BALIEIRO, J.C.C. Avaliação citológica, histológica e hormonal de cadelas normais e com o complex hiperplasia endometrial cística/piometra. Veterinária e Zootecnia. v.15, n.1, pp.150-159, 2008.

OLSEN, J.E.; CHRISTESEN, H. AERESTRUP, F.M. Diversity and evolution of *blaZ* from *Staphylococcus aureus* and coagulase-negative staphylococci. Journal of Antimicrobial Chemotherapy. v.57, pp.450-460, 2006.

OTTO, M.; ECHNER, H.; VOELTER, W.; GOTZ, F. Pheromone crossinhibition between *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis*. Infection and Immunity. v.69, pp.1957-1960, 2004.

PACHECO, A.B.F.; GUTH, B.E.C.; SOARES, K.C.C.; NISHIMURA, L.; ALMEIDA, D.F.; FERREIRA, L.C.S. Random amplification of polymorphic DNA reveals serotype-specific clonal clusters among enterotoxigenic *Escherichia coli* strains isolated from humans. Journal of Clinical Microbiology. v.35, pp.1521-1525, 1997.

PALAZZO, I.C.; DARINI, A.L. Evaluation of methods for detecting oxacillin resistance in coagulase-negative staphylococci including cefoxitin disc diffusion. Microbiology Letters. v.257, pp.299-305, 2006.

PARK, P.W.; FOSTER, T.J.; NISHI E.; DUNCAN S.J.; KLAGSBRUN, M.; CHEN, Y. Activation of Syndecan-1 Ectodomain Shedding by *Staphylococcus aureus* α -Toxin and β -Toxin. The Journal of Biological Chemistry. v.279, pp.251-258, 2004.

PÉCHERE, J.C. New perspectives on macrolide antibiotics. Journal of Antimicrobial Agents. v.18, pp.S93-97, 2001.

PELLERIN, J.L.; BOURDEAU, P.; SEBBAG, H.; PERSON, J.M. Epidemiological surveillance of antimicrobial compound resistance of *Staphylococcus intermedius* clinical isolates from canine pyoderma. Compendium of Immunology and Microbiology & Infectious Disease. v.21, pp.115-133, 1998.

PEREIRA, M.G. Epidemiologia teoria e prática. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan AS. pp.358-375, 1995.

PEREIRA, I.A.; SOARES, L.C.; COELHO, S.M.O.; BALBINO, F.A.; PRIBUL, B.R.; SOUZA, M.M.M.S. Suscetibilidade à azitromicina de agentes bacterianos isolados de processos infecciosos em diferentes sítios de animais de companhia. Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia. v.61, pp.577-584, 2009.

PETERS, D.H.; FRIEDEL, H.A.; MCTAVISH, D. Azithromycin- A review of its antimicrobial activity, pharmacokinetic properties and clinical efficacy. *Drugs*. v.44, n.5, pp.750-799, 1992.

PETINAKI, E.; ARVANITI, A.; DIMITRACOPOULOS, G.; SPILIOPOULOU, I.; Detection of *mecA*, *mecR1* and *mecI* genes among clinical isolates of methicilin-resistant staphylococci by combined polymerase chain reactions. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. v.47, pp.297-304, 2001.

PIRIZ, S.; DE LA FUENTE, R.; VALLE, J.; MATEOS, E.; HURTADO, M.A.; CID, D.; RUIZ-SANTAQUITERIA, J.A. ; VADILLO, S. Comparative in vitro activity of 11 β -lactam antibiotics against 91 *Staphylococcus intermedius* strains isolated from staphylococcal dermatitis in dogs. *Zentralbl Veterinarmed B*. v.42, pp. 293–300, 1995.

PHAFF, S.J.; TIDDENS, H.A.W.M.; VERBRUGH, H.A.; OTT, A. Macrolide resistance of *Staphylococcus aureus* and *Haemophilus* species associated with long-term azithromycin use in cystic fibrosis. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. v.57, pp.741-746, 2006.

PHONIMDAENG, P. The coagulase of *Staphylococcus aureus* 8325-4: sequence analysis and virulence of site-specific coagulase-deficient mutants. *Molecular Microbiology*. v.4, pp.393-404, 1990.

PRESCOTT, J.F.; HANNA, W.J.B.; REID-SMITH, R. Antimicrobial Drug Use and Resistance in Dogs. *Canadian Veterinary Journal- Reveu Veterinaire Canadienne*, v.43, pp.107-116, 2002.

PROJAN, S.; NOVICK, R. The molecular basis of pathogenicity. In: CROSSLEY, K. B.; ARCHER, G. L. (Ed.). *The Staphylococci in Human Disease*. New York: Churchill Livingstone. pp.55-81, 1997.

RECHER JUNIOR, A. A orbifloxacin no tratamento das cistites bacterianas em gatos domésticos. *Ciência Rural*. v.35, n.6, pp.1325-1330, 2005.

REINOSO, E.B. Análisis epidemiológico y molecular de cepas de *Staphylococcus aureus* de distintos orígenes. Tese de doutorado. Instituto de Microbiologia. Universidad Nacional de Rio Cuarto. p.199, 2004.

RETSEMA, J.; GIRARD, A.; SCHELKLEY, W. Spectrum and mode of action of azithromycin (CP-62,993), a new 15-membered-ring macrolide with improve potency against gram-negative organisms. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. v.31, pp.1937-1947, 1987.

RETSEMA, J.A.; BRENNAN, L.A.; GIRARD, A.E. Effects of environmental factors on the in vitro potency of azithromycin. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases*. v.10, n.10, pp.834-842, 1991.

RETSEMA, J.A. Susceptibility and Resistance emergence studies with Macrolides. *International Journal of Antimicrobial Agents*. v.11(1), pp.S15-S21, 1999.

RICKARD, A. H.; GILBERT, P.; HIGH, N. J.; KOLENBRANDE, P. E.; HANDLEY, P. S. Bacterial coaggregation: an integral process in the development of multispecies biofilms. *Trends in Microbiology*. v.11, pp.94-100, 2003.

ROBERTS, M.C.; SUTCLIFFE, J.; COURVALIN, P.; JENSEN, L.B.; ROOD, J.; SEPPALA, H. Nomenclature for macrolide and macrolide-lincosamide-streptogramin B resistance determinants. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. v.43, pp.2823-2830, 1999.

ROSATO, A.E.; KREISWIRTH, B.N.; GRAIG, W.A.; EISNER, W.; CLIMO, M.W.; AECHER, G.L. *mecA-BlaZ* corepressors in clinical *Staphylococcus aureus* isolates. *Antimicrobial Agents Chemotherapy*. v.47, pp.1463-1466, 2003.

ROWLAND, S.J.; DYKE, K.J. Tn552, a novel transposable element from *Staphylococcus aureus*. *Molecular Biology*. v.4, pp.965-975, 1990.

ROGOLSKY, M. Nonenteric toxins of *Staphylococcus aureus*. *Microbiological Reviews*. v.43, pp.320, 1979.

RUBIN, J.; WALKER, R.D.; BLICKENSTAFF, K.; BODEIS-JONES, S.; ZHAO, S. Antimicrobial resistance and genetic characterization of fluoroquinolone resistance of *Pseudomonas aeruginosa* isolated from canine infections. *Veterinary Microbiology*. v.131, pp.164-172, 2008.

SAHA, B.; SINGH, A.K.; GHOSH, A.; BAL, M. Identification and characterization of a vancomycin-resistant *Staphylococcus aureus* isolated from Kolkata (South Asia). *Journal of Medicine Microbiology*. v.57, pp.72-79, 2008.

SAID- SALIM, B.; DUMMAN, P.M.; MCALEESE, F.M.; MACAPAGAL, D.; MURPHY, E.; MCNAMARA, P.J.; ARVIDSON, S.; FOSTER, T.J.; PROJAN, S.J.; KREISWIRTH, B.N. Global regulation of *Staphylococcus aureus* genes by Rot. *Journal of Bacteriology*. v.185, pp.610-619, 2003.

SAKOULAS, G.; GOLD H.S.; VENKATARAMAN, L.; DEGIROLAMI, P.C. Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*: Comparison of Susceptibility Testing Methods and Analysis of *mecA*-Positive Susceptible Strains. *Journal of Clinical Microbiology*. v.39, n.11, pp.3946–3951, 2001.

SAMBROOK, J.; FRITSCH, E. F.; MANIATIS, T. *Molecular Cloning: a laboratory manual*. New York: Cold Spring Harbor Lab. Press, 2002.

SCHENTAG, J.J.; BALOW, C.H. Tissue- directed pharmacokinetics. *American Journal of Medicine*. v.3A, pp.5S-11S, 1991.

SCHMITZ, F.J.; SADURSKI, R.; KRAY, A.; BOOS, M.; GEISEL, R.; KÖHRER, K.; VERHOEF, J.; FLUIT, A.C. Prevalence of macrolide-resistance genes in *Staphylococcus aureus* and *Enterococcus faecium* isolates from 24 european University hospitals. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. v.45, pp.891-894, 2000.

SCOTT, D.W.; MILLER Jr., W.H.; GRIFFIN, C.E. *Dermatologia dos pequenos animais*. Interlivros, 5 ed., pp.256-300, 1995.

SCOTT, D.W.; MILLER, W.H.J.; GRIFFIN, C.G. Small animal dermatology. Philadelphia: Saunders, p.1528, 2001.

SFM. Antibigram Committee of the French Society for Microbiology. Tabeleau X- Concentrations, diamètres critiques et règles de lecture interprétative pour *Staphylococcus* spp.. p.33, 2006.

SENNA, J.P.M.; PINTO, C.A.; CARVALHO, L.P.S.; SANTOS, D.S. Comparison of pulsed-field gel electrophoresis and PCR analysis of polymorphisms on the *mec* hypervariable region for typing methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. Journal of Clinical Microbiology. v.40, pp.2254-2256, 2002.

ŠEOL, B. Comparative in vitro activities of enrofloxacin, ciprofloxacin and marbofloxacin against *Staphylococcus intermedius* isolated from dogs. Veterinarski Arhiv. v.75, n.3, pp.189-194, 2005.

SEPPÄLA, U.; KLAUKKA, J.; VUOPIO-VARKILA, A.; MUOTIALA, H.; HELENUS, K.; LAGER, P. The Effect of Changes in Consumption of Macrolide antibiotics on Erythromycin resistance Grupo A streptococci in Finland. The New England Journal of Medicine. v.337, pp.4441-446, 1997.

SERPELL, J. The domestic dog: its evolution, behaviour and interactions with people. Cambridge: Cambridge University Press, p.268, 1995.

SHLAES, D. M.; GERDING, D. N.; JOHN JR, J. F.; CRAIG, W. A.; BONSTEINS, D. L.; DUNCAN, R. A.; EKMAN, M. R.; FARRER, W. E.; GREENE, W. H.; LORIAN, V.; LEVY, S.; MCGOWAN JR., J. E.; PAUL, S. M.; RUSKIN, J.; TENOVER, F. C.; WATANAKUNADORN, C. Society of Healthcare Epidemiology of America and Infectious Diseases Society of America Joint Committee on the Prevention of Antimicrobial Resistance Guidelines for the prevention of antimicrobial resistance in hospitals. Clinical Infectious Diseases. v.25, pp.584-599, 1997.

SHOPSIN B., GOMEZ M., WADDINGTON M., RIEHMAN M., KREISWIRTH B.N. Use of coagulase gene (*coa*) repeat region nucleotide sequences for typing of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains. Journal of Clinical Microbiology. v.38, pp.3453-3456, 2000.

SILVA, N. Identification and antimicrobial susceptibility patterns of *Staphylococcus* spp. isolated from canine chronic otitis externa. Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia, v.53, n.2, pp.197-201, 2001.

SILVA, W.P., SILVA, A.J., MACEDO, M.R.P., ARAÚJO, M.R., MATA, M.M.; GANDRA, E.A. Identification of *Staphylococcus aureus*, *S. intermedius* and *S. hyicus* by Pcr amplification of *coa* and *nuc* genes. Brazilian Journal of Microbiology. v.34(1), pp.125-127, 2003.

SIQUEIRA, A.K.; RIBEIRO, M.G.; SALERNO, T.; TAKAHIRA, R.K.; LOPES, M.D.; PRESTES, N.C.; SILVA, A.V. Perfil de sensibilidade e multirresistência em linhagens de *Escherichia coli* isoladas de infecção do trato urinário, de piometra e

de fezes de cães. Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia. v.60, n.5, pp.1263-1266, 2008

SLANEY, L.; CHUBB, H.; RONALD, A.; BRUHAM, R. In vitro activity of Azithromycin, erythromycin, ciprofloxacin and norfloxacin against *Neisseria gonorrhoeae*, *Haemophilus ducreyi* and *Chlamydia trachomatis*. Journal of Antimicrobial Chemotherapy. v.25(A), pp.1-5, 1990.

SLATER, D. Fundamentals of veterinary ophthalmology. 2ed. Philadelphia: W.B. Saunders, p.630, 1990.

SKOV, R.; RMYTH, R.; CLAUSEN, M.; LARSEN, A. R.; FRIMODT-MOLLER, N.; OLSSON LILJEQUIST, N.; KAHLMETER, G. Evaluation of a cefoxitin 30 µg disc on Iso-Sensitest agar for detection of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. Journal of Antimicrobial Chemotherapy. v.52, pp.204–207, 2003.

SNARY, E.L.; KELLY, L.A.; DAVISON, H.C.; TEALE, C.; WOOLDRIDGE, M. Antimicrobial resistance: a microbial risk assessment perspective. Journal of Antimicrobial Chemotherapy. v.53, n.6, pp.906-917, 2004.

STRAUB, J.A.; HERTEL, C.; HAMMES, W.P. A 23S RNAr-targeted polymerase chain reaction-based system for detection of *Staphylococcus aureus* in meat started cultures and dairy products. Journal of Food Protection. v.62, pp.1150-1156, 1999

STROMMINGER, B.; KEHRENBURG, C.; KETTLITZ, C.; CUNY, C.; VERSPOHL, J.; WITTE, W.; SCHWARZ, S.; Molecular characterization of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains from pet animals and their relationship to human isolates. Journal of Antimicrobial Chemotherapy. v.57, pp.461-465, 2006

STRUELLENS, M. J., DELPLANO, A., GODARD, C., MAES, N., SERRUS, E. Epidemiologic typing and delineation of genetic relatedness of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* by macrorestriction analysis of genomic DNA by using pulsed-field gel electrophoresis. Journal of Clinical Microbiology. v.30, pp.2599-2602, 1992.

SUTCLIFFE, J.; GREBE, T.; TAIT-KAMRADT, A.; WONDRACK, L. Detection of erythromycin-resistant determinants by PCR. Antimicrobial Agents chemotherapy. v.40, pp.2562-2566, 1996.

SUZUKI, E.; KUWAHARA-ARAI, K.; RICHARDSON, J.F.; HIRAMATSU, K. Distribution of mec regulator genes in methicillin-resistant *Staphylococcus* clinical strains. Antimicrobial Agents and Chemotherapy. v.37, pp.1219-1226, 1993.

SWENSON, J.M.; TENOVER, F.C.; WILLIAMS, P.P.; KILLGORE, G.; Results of disk diffusion testing with cefoxitin correlate with presence of *mecA* in *Staphylococcus* spp. Journal of Clinical Microbiology, v.43, n.8, pp.3818-3823, 2005.

TAKEUCHI, S.; MAEDA, T.; HASHIMOTO, N.; IMAIZUMI, K.; KAIDOH, T.; HAYAKAWA, Y. Variation of the *agr* locus in *Staphylococcus aureus* isolates from cows with mastitis. *Veterinary Microbiology*. v.79, pp.267-274, 2001.

TEJEDOR, M.T.; MARTÍN, J.L.; NAVIA, M.; FREIXES, J.; VILA, J. Mechanisms of fluoroquinolone resistance in *Pseudomonas aeruginosa* isolates from canine infections. *Veterinary Microbiology*. v.94, pp.295-301, 2003.

TERASAWA, L.B. Caracterização da Resistência à Oxacilina em Estafilococos Coagulase-Negativos Isolados no Hospital de Clínicas de Curitiba – Paraná, Universidade Federal do Paraná, Dissertação de Mestrado, 2006.

THORNSBERRY, C.; MCDOUGAL, L.K. Successful use of broth microdilution in susceptibility tests for methicillin resistant (heteroresistant) staphylococci. *Journal of Clinical Microbiology*. v.11, pp.1084-1091, 1983.

TOKUE, Y.; SHOJI, S.; SATOH, K.; MOTOMYIA, M. Comparison of a polymerase chain reaction assay and a conventional microbiologic method for detection of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. v.36, pp.6-9, 1992.

TRAMPER-STRANDERS, G.A.; VAN DER EM, C.K.; GERRITSEN, S.A.M.; FLEER, A.; KIMPEN, J.L.; WOLFS, T.F.W. Macrolide-resistant *Staphylococcus aureus* colonization in cystic fibrosis patients: is there transmission to household contacts? *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. v.60, pp.665-668, 2007.

UHLEN M., GUSS B., NILSSON B., GATENBECK S., PHILIPSON L.; LINDBERG M. Complete sequence of the staphylococcal gene encoding protein A. *Journal of Biological Chemistry*. v.259, pp.1695-1702, 1984.

UZCUDUN, L.I. Biofilms bacterianos. *Actualidad*. v.37, n.15, 2004.

VANNUFFEL, P., J. GIGI, H. EZZEDINE, B. VANDERCAM, M. DELMEE, G. WAUTERS, J. GALA. Specific detection of methicillin-resistant *Staphylococcus* species by multiplex PCR. *Journal of Clinical Microbiology*. v.33, pp.2864–2867, 1995.

VASUDEVAN, P.; NAIR, M.K.M.; ANNAMALAI, T.; VENKITANARAYANA, K.S. Phenotypic and Genotypic characterization of bovine mastitis isolates of *Staphylococcus aureus* for biofilm formation. *Veterinary Microbiology*. v.92, pp.179-185, 2003.

VIANA, F.A.B. Guia Terapêutico Veterinário. Ed. CEM LTDA. Lagoa Santa-MG, p.24, 2003.

VOJTOV, N.; ROSS, H. F.; NOVICK, R. P. Global repression of exotoxin synthesis by staphylococcal superantigens. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. v.99, n.15, pp.10102-10107, 2002.

VUONG, C., SAENZ, H. L., GOTZ, F. ; OTTO, M.. Impact of the *agr* quorum-sensing system on adherence to polystyrene in *Staphylococcus aureus*. *Journal of Infectious Disease*. v.182, pp.1688–1693, 2000.

VUONG, C. ; OTTO, M. *Staphylococcus epidermidis* infections. Microbes and Infection. v.4, pp.481–489, 2002.

WALTHER, B.; WIELER, L.H.; FRIEDRICH, A.W.; HANSEN, A.; KOHN, B.; BRUNNBERG, L.; BKE-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, pp.171–178, 2008.

WANDELLER, A.I.; MATTER, H.C.; KAPPELER, A.K.; BUDDE, A. The ecology of dogs and canine rabies: a selective review. Revue Scientifique et Technique (International Office of Epizootics). v.12, n.1, pp.51-71, 1993.

WATTS, J. Etiological agents of bovine mastitis. Veterinary Microbiology. v.16 p.41-46, 1988.

WATSON, A.D.J.; ROSIN, E. Antimicrobial drug use in dogs and cats. Antimicrobial Therapy in Veterinary Medicine, 3rd Iowa State University Press USA. pp.537-575, 2000.

WEESE, J.S.; ROUSSEAU, J.; TRAUB-DARATZ, J.L.; WILLEY, B.M., MCGREER, A.J.; LOW, D.E. Community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in horses and humans who work with horses. Journal of The American Veterinary Medicine Association. v.226, pp.580–583, 2005.

WEISBLUM B. Erythromycin resistance by ribosome modification. Antimicrobial Agents Chemotherapy. v.39, pp.577-585, 1995.

WELLER, T.M.A. The distribution of *mecA*, *mecR1* and *mecI* and sequences analysis of *mecI* and the *mec* promoter region in staphylococci expressing resistance to methicillin. Journal of Antimicrobial Chemotherapy. v.43, pp.15-22, 1999.

WILLIAMS, R.E.O.; HARPER, G.J. Staphylococcal hemolysins on sheep-blood agar with evidence for a fourth hemolysin. The Journal of Pathology and Bacteriology. v.59, n.1-2, pp.69-78, 2005.

YANAGIHARA, K.; MORINAGA, Y.; NAKAMURA, S.; SEKI, M.; IZUMIKAWA, K.; KAKEYA, H.; YAMAMOTO, Y.; YAMADA, Y.; KAMIHIRA, S.; KOHNO, S. Subinhibitory concentrations of telithromycin, clarithromycin and azithromycin reduce methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* coagulase in vitro and in vivo. Journal of Antimicrobial Chemotherapy. v.61, pp.647-650, 2008

YAZDANKHAH, S.P.; SØRUM, H.; OPPEGAARD, H. Comparison of Genes Involved in Penicillin Resistance in Staphylococci of Bovine Origin Microbial Drug Resistance. V.6, pp.29-36, 2009

ZOCHE, F.; BASTOS, C.P.; FRANÇA, R.C.; SILVA, W. P. *Staphylococcus aureus* Enterotoxigênicos em Queijo Tipo Minas Frescal: Detecção Por PCR. Anais do XVI Congresso de Iniciação Científica da Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel, 2006.

ZHANG, L.; GRAY, L.; NOVICK, R.P. & JI, G. Transmembrane topology of AgrB, the protein involved in the post-translational modification of AgrD in

Staphylococcus aureus. Journal of Biology and Chemistry.v.277, pp.34736-34742, 2002.

ÍNDICE DE ANEXOS

	Pág
Anexo I	Testes de identificação das espécies de <i>Staphylococcus</i> spp. coagulase-positivos. 119
Anexo II	Testes de identificação das espécies de <i>Staphylococcus</i> spp coagulase-negativos. 120
Anexo III	Valores interpretativos dos halos de inibição dos antibióticos eletivos para <i>Staphylococcus</i> spp. 121
Anexo IV	Valores interpretativos dos halos de inibição dos antibióticos eletivos para Bastonetes Gram-negativos. 122
Anexo V	Processos Infeciosos de animais de companhia avaliados 123
Anexo VI	Distribuição de dados epidemiológicos dos processos infecciosos de animais de companhia. 128
Anexo VII	Análises Estatísticas: Determinação da CIM para Azitromicina. 131
Anexo VIII	Correlação entre fenótipo e genótipo da produção de hemolisinas. 135
Anexo IX	Correlação entre fenótipo e genótipo da produção de “slime”. 137
Anexo X	Perfil dos isolados de <i>Staphylococcus</i> spp. (n=100) quanto a presença dos genes <i>agr</i> , <i>hla</i> , <i>hly</i> , <i>icaA</i> , <i>icaD</i> e <i>spaA</i> . 139

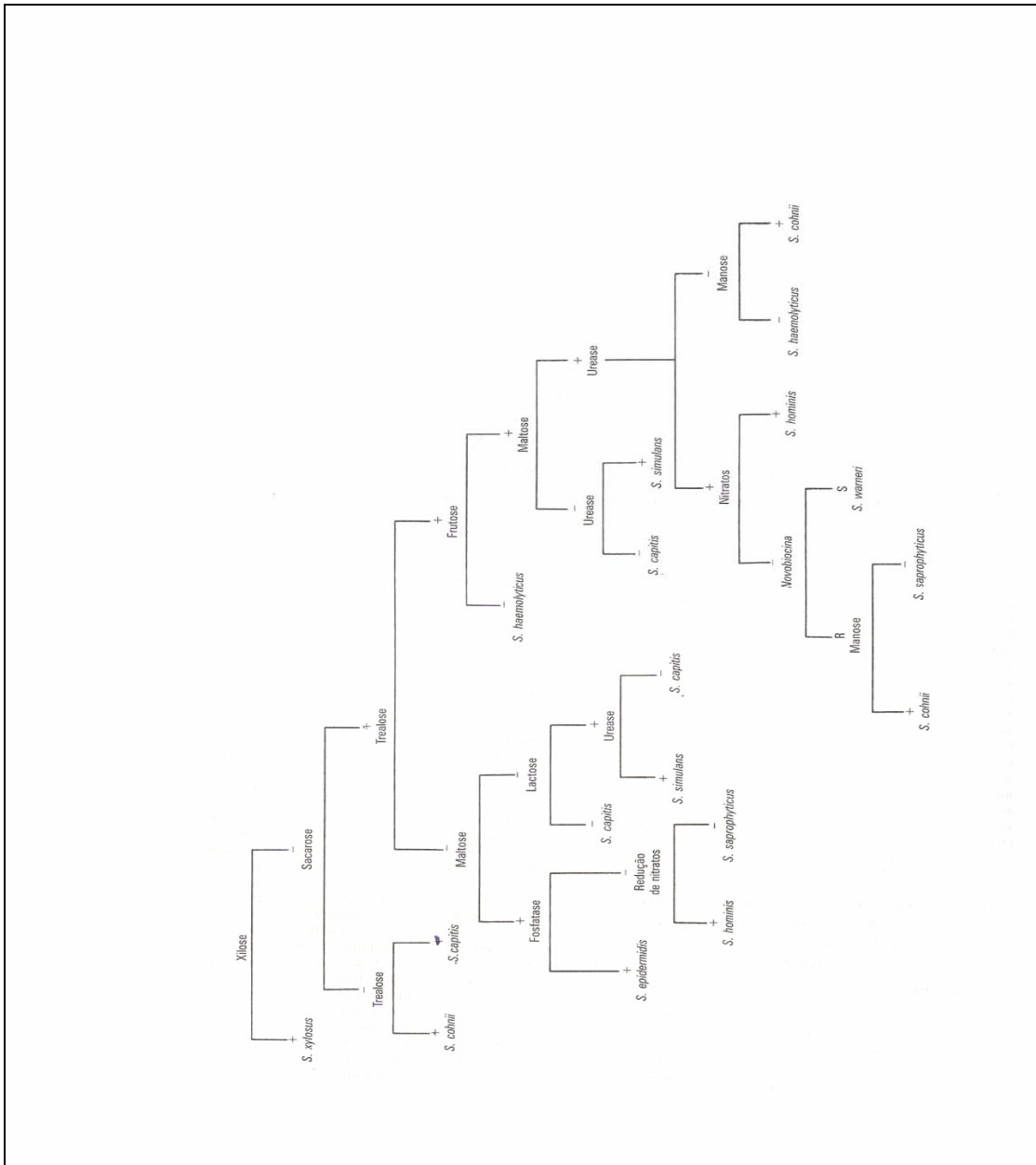
Anexo I

Testes de identificação das espécies de *Staphylococcus* spp. coagulase-positivos segundo Koneman e colaboradores (2008).

<i>Staphylococcus</i> spp.	Maltose	Caldo Nitrado	VP
<i>S. aureus aureus</i>	+	+	+
<i>S. aureus</i> subsp <i>anaerobius</i>	+	-	-
<i>S. schleiferi</i> subsp <i>coagulans</i>	-	+	+
<i>S. intermedius</i>	+/-	+	-

Anexo II

Testes de identificação das espécies de *Staphylococcus* spp coagulase-negativos, segundo Koneman e colaboradores (2008).



Anexo III

Valores interpretativos dos halos de inibição dos antibióticos eletivos para *Staphylococcus* spp. segundo recomendações do CLSI, 2009.

Antimicrobianos	Zonas de inibição (mm)		
	Resistente	Intermediário	Sensível
β-lactâmicos			
Ampicilina (10μg)	≤28	-	≥29
Penicilina (10UI)	≤28	-	≥29
Oxacilina (1μg)	≤10	11-12	≥13
β-lactâmicos + inibidores de β-lactamase			
Ampicilina + Sulbactam (10/10μg)	≤11	12-14	≥15
Amoxicilina + ác. Clavulânico (20/10μg)	≤19	-	≥20
Cefalosporinas			
Cefoxitina (30μg)	≤24	-	≥25
Cefalotina (30μg)	≤14	15-17	≥18
Ceftriaxona (30μg)	≤13	14-20	≥21
Carbapenem			
Imipenem (10μg)	≤13	15-18	≥19
Macrolídeos			
Azitromicina (15μg)	≤13	14-17	≥18
Eritromicina (15μg)	≤13	14-22	≥23
Lincosamida			
Clindamicina (2μg)	≤14	15-20	≥21
Fluoroquinolona			
Ciprofloxacina (5μg)	≤15	16-20	≥21
Enrofloxacin (10μg)	≤14	15-17	≥18
Norfloxacina (10μg)	≤12	13-16	≥17
Aminoglicosídeo			
Tobramicina (10μg)	≤12	13-14	≥15
Gentamicina (10μg)	≤12	13-14	≥15
Glicopeptídeo			
Vancomicina (30μg)	-	-	≥15
Inibidor da via de Folato			
Sulfametoxazol+trimetopim (1,25μg/23,75μg)	≤10	11-15	≥16
Oxazolidinona			
Linezolida (30μg)	-	-	≥21
Tetraciclina			
Tetraciclina (30μg)	≤14	14-15	≥16

Anexo IV

Valores interpretativos dos halos de inibição dos antibióticos eletivos para Bastonetes Gram-negativos segundo recomendações do CLSI, 2009.

Antimicrobianos	Zonas de inibição (mm)		
	Resistente	Intermediário	Sensível
Enterobacteriaceae			
Cefalosporinas			
Cefoxitina (30µg)	≤14	15-17	≥18
Cefalotina (30µg)	≤14	15-17	≥18
Ceftriaxona (30µg)	≤13	14-20	≥12
Fluoroquinolona			
Ciprofloxacina (5µg)	≤15	16-20	≥12
Enrofloxacin (10µg)	≤14	15-17	≥18
Norfloxacin (10µg)	≤12	13-16	≥17
Aminoglicosídeo			
Gentamicina (10µg)	≤12	13-14	≥15
Tetraciclina			
Tetraciclina (30µg)	≤11	12-14	≥15
Pseudomonadaceae			
Cefalosporinas			
Cefoxitina (30µg)	≤14	15-17	≥18
Ceftriaxona (30µg)	≤13	14-20	≥12
Fluoroquinolona			
Ciprofloxacina (5µg)	≤15	16-20	≥12
Norfloxacin (10µg)	≤12	13-16	≥17
Aminoglicosídeo			
Gentamicina (10µg)	≤12	13-14	≥15

Anexo V

Processos Infecciosos de animais de companhia avaliados.

Espécie	Sexo	Idade	Raça	Sinais Clínicos	Local*	Antibiótico*
Infecções do Conduto auditivo externo						
CAN	♀	adulto	Pastor Alemão	Sc. Purulenta	PMERJ	-
CAN	♀	adulto	Beagle	Sc. Purulenta escura	PMERJ	-
CAN	♀	adulto	Beagle	Sc. Purulenta escura	PMERJ	-
CAN	♀	adulto	Beagle	Sc. Purulenta	PMERJ	-
CAN	♂	adulto	Beagle	Sc. Purulenta	PMERJ	-
CAN	♂	adulto	Beagle	Sc. Purulenta	PMERJ	-
CAN	♂	adulto	Beagle	Sc. Purulenta escura	PMERJ	-
CAN	♂	adulto	Beagle	Edema e sc. Purulenta	PMERJ	-
CAN	♂	adulto	Pastor holândes	Sc. Purulenta escura	PMERJ	-
CAN	♂	adulto	Pastor holândes	Sc. Purulenta escura	PMERJ	-
CAN	♂	adulto	Pastor holândes	Sc. Purulenta	PMERJ	-
CAN	♂	adulto	Rotweiler	Edema e sc. Purulenta	PMERJ	-
CAN	♂	adulto	Rotweiler	Sc. Purulenta e miíase	PMERJ	-
CAN	♂	adulto	Labrador	Sc. Purulenta escura	PMERJ	-
CAN	♂	adulto	Labrador	Edema e sc. Purulenta	PMERJ	-
CAN	♂	adulto	Dogo alemão	Sarna demodécica+sc. purulenta	PMERJ	-
CAN	♀	adulto	Labrador	Sc. Purulenta escura	HVPA	-
CAN	♀	adulto	Labrador	Otite crônica recidivante	HVPA	-
CAN	♀	adulto		Sc. purulenta+hemorragica+miíase	HVPA	-
CAN	♂	adulto	Pastor Belga	Sc. Purulenta	HVPA	-
CAN	♂	adulto	Pastor Alemão	Sc. Purulenta	HVPA	-
CAN	♂	adulto	Pastor Belga	Sc. Purulenta	HVPA	-
CAN	♂	adulto		Edema e sc. Purulenta	HVPA	-
CAN	♀	adulto	Pastor Mallinois	Sarna demodécica+sc. purulenta	HVPA	-
CAN	♂	adulto	Pastor Mallinois	Sc. Purulenta	HVPA	CFX
CAN	♀	adulto	Pastor Mallinois	Sc. Purulenta	HVPA	ENO
CAN	♀	adulto	Cane Corso	Otite média crônica	HVPA	-
CAN	♂	adulto	Cane Corso	Sc. Purulenta escura	HVPA	-
CAN	♀	adulto	Labrador	Edema hemorragia+sc. purulenta	HVPA	-
CAN	♀	adulto	Cocker spainel	Sc. Purulenta	HVPA	-
CAN	♀	adulto	SRD	Sc. Purulenta	HVPA	-
CAN	♂	adulto	SRD	Sc. Purulenta	HVPA	-
CAN	♂	adulto	Pastor alemão	Otite crônica recidivante	HVPA	-
CAN	♂	adulto	SRD	Sc. purulenta	HVPA	-
CAN	♀	adulto	Pointer	Sc. Purulenta	ES	-
CAN	♂	filhote	SRD	Sc. Purulenta	ES	-
CAN	♀	adulto	Boxer	Sc. Purulenta	ES	ENO
CAN	♂	adulto	SRD	Otite crônica recidivante	ES	-
CAN	♀	adulto	SRD	Sc. Purulenta e miíase	ES	-
CAN	♂	adulto	Dog alemão	Sc. Purulenta e miíase	ES	-
CAN	♀	adulto	Pastor alemão	Sc. escura	ES	-
CAN	♂	adulto	Pittbull	Sc. Purulenta	ES	-
CAN	♀	adulto	SRD	Otite crônica recidivante	ES	-
CAN	♀	adulto	SRD	Otite aguda purulenta	ES	ENO
CAN	♀	adulto	Poodle	Sc. Purulenta escura	ES	-
CAN	♂	adulto	Cocker spainel	Sc. Purulenta escura	ES	ENO

Continua na próxima página.

Espécie	Sexo	Idade	Raça	Sinais Clínicos	Local*	Antibiótico*
Infecções do Conduto auditivo externo						
CAN	♂	adulto	Cocker spainel	Sc. Purulenta escura	ES	ENO
	♂	adulto	Poodle	Sc. Purulenta	ES	-
CAN	♀	adulto	Dálmata	Sc. Purulenta escura	ES	-
CAN	♂	filhote	Dashund	Sc. Purulenta	ES	-
CAN	♀	adulto	Lhasa Apsu	Sc. Purulenta	ES	PEN
CAN	♂	adulto	Rottweiler	Otite média crônica	ES	-
CAN	♂	adulto	Cocker spainel	Sc. Purulenta escura	ES	-
CAN	♂	adulto	Pastor alemão	Edema hemorragia+sc. purulenta	ES	-
CAN	♂	adulto	SRD	Sc. Purulenta	ES	ENO
CAN	♀	adulto	SRD	Sc. Purulenta	ES	-
CAN	♀	filhote	SRD	Sc. Purulenta	ES	-
CAN	♀	adulto	Cocker spainel	Otite crônica recidivante	ES	CFX
CAN	♀	adulto	Boxer	Edema e sc. Purulenta	ES	-
CAN	♂	idoso	Poodle	Sarna demodécica+sc. purulenta	ES	-
CAN	♂	adulto	Beagle	Sc. Purulenta	ES	-

Continua na próxima página.

Espécie	Sexo	Idade	Raça	Sinais Clínicos	Local*	Antibiótico*
Infecções de Pele						
CAN	♂	aduto	SRD	Fístula com sc. purulenta (Mordida)	HVPA	ENO
CAN	♀	aduto	Labrador	Ferida lacerante com sc. purulenta	HPVA	-
CAN	♀	adulto	poodle	Fístula secundária miíase	HVPA	-
CAN	♂	adulto	poodle	Miíase	HVPA	-
CAN	♂	adulto	Bulldog ingl.	Otohematoma c/ Fístula sc. purulenta	HVPA	CEF
CAN	♀	adulto	hotweiller	Carcinoma mamário c/ sc. purulenta	PMERJ	-
CAN	♀	adulto	hotweiller	Pioderma profundo	PMERJ	-
CAN	♂	aduto	SRD	Demodicose e pioderma	HVPA	-
CAN	♂	aduto	Pastor alemão	Pioderma profundo	HVPA	-
CAN	♀	adulto	SRD	Demodicose c/ pioderma	ES	-
CAN	♂	adulto	Yorkshire	DUA c/ sc purulenta	ES	MET
FEL	♂	adulto	PCB	Pioderma profundo	ES	-
CAN	♂	adulto	Husky	Pústulas, crostas e prurido.	ES	-
CAN	♂	adulto	Pointer	Pústulas	ES	-
FEL	♀	adulto	Perça	Pio/Pododermite c/ queratose	ES	-
FEL	♂	adulto	Ciamês	Pioderma (mordida)	ES	-
CAN	♂	adulto	Sharpei	Piodermite e necrose	ES	-
CAN	♀	adulto	Chowchow	Pústula	ES	-
CAN	♂	adulto	Bulldog ingl.	Miíase e sc. purulenta	ES	-
CAN	♀	adulto	Lhasa apsu	Miíase e sc. purulenta	ES	ENO
CAN	♀	adulto	SRD	Carcinoma mamário c/ sc. purulenta	ES	MET
CAN	♂	adulto	Dashund	DUA e sc. purulenta	ES	-
CAN	♀	adulto	Labrador	Lesão purulenta+carcinoma mamário	ES	ENO
CAN	♀	adulto	poodle	Pústulas e crostas	ES	-
CAN	♂	adulto	SRD	Fístula com secreção purulenta	ES	-
CAN	♂	adulto	SRD	Piodermite	JW	-
CAN	♀	adulto	SRD	Pioderma profundo	JW	-
CAN	♂	adulto	SRD	Pioderma	JW	-
CAN	♂	adulto	Pittbull	Miíase e sc. purulenta	JW	-
CAN	♀	adulto	SRD	Pioderma profundo com fistulas	ES	-
CAN	♂	idoso	Golden Retr.	Miíase com secreção purulenta	ES	-
FEL	♀	adulto	PCB	Miíase	ES	-
FEL	♀	adulto	PCB	Pioderma	JW	-
FEL	♀	idoso	SRD	Pioderma profundo	JW	-
FEL	♂	adulto	SRD	Piodermite	JW	-
FEL	♂	idoso	Perça	Lesão purulenta+carcinoma mamário	JW	-
FEL	♂	adulto	SRD	Pioderma	JW	-
FEL	♂	adulto	SRD	Pústula	JW	-
FEL	♀	adulto	SRD	Pústula	JW	-
CAN	♂	adulto	Pittbull	Miíase com secreção purulenta	ES	GEN
CAN	♂	idoso	PCB	Piodermite	ES	-
CAN	♀	adulto	PCB	Pioderma	ES	-

Espécie	Sexo	Idade	Raça	Sinais Clínicos	Local*	Antibiótico*
Infecções uterinas em cadelas						
CAN	♀	adulto	Husky	Piometra	HVPA	MET
CAN	♀	adulto	Pittbull	Piometra	HVPA	ENO/DOX/MET
CAN	♀	adulto	Pastor alemão	Piometra	ES	ENO/DOX/MET
CAN	♀	adulto	Poodle	Piometra+vulvovaginite	ES	-
CAN	♀	adulto	Poodle	Piometra	ES	ENO/PEN
CAN	♀	adulto	Rottweiler	Piometra+Vulvovaginite	ES	TER
CAN	♀	adulto	SRD	Piometra+vulvovaginite	ES	-
CAN	♀	adulto	SRD	Piometra	ES	-
Infecções do tecido ósseo						
CAN	♀	adulto	Dog alemão	Osteossarcoma	HVPA	Gentamicina
CAN	♀	adulto	Weimaraner	Sinovite	HVPA	-
CAN	♀	adulto	Rottweiler	Osteomielite	HVPA	-
CAN	♂	adulto	SRD	Fratura óssea	HVPA	-
Infecções da Cavidade Oral						
CAN	♀	adulto	Husky	Miíase na mucosa oral	ES	-
CAN	♀	adulto	Pittbull	Abcessos gengivais	ES	-
CAN	♀	idoso	SRD	Periodontite	ES	-
CAN	♀	filhote	SRD	Periodontite	JW	-
CAN	♀	adulto	SRD	Abcesso gengival	JW	-
CAN	♂	adulto	SRD	Periodontite	JW	MET
CAN	♀	adulto	SRD	Periodontite	JW	-
CAN	♂	adulto	SRD	Periodontite	JW	-
CAN	♂	adulto	SRD	Periodontite	JW	-
CAN	♂	adulto	SRD	Periodontite	JW	-
CAN	♂	adulto	SRD	Periodontite	JW	-
CAN	♀	idoso	Poodle	Periodontite	HVPA	-
Infecções do Trato respiratório						
CAN	♂	adulto	Poodle	Sec nasal purulenta+miíase	HVPA	ENO
CAN	♂	adulto	Weimaraner	Bronquite+efusão pleural opaca	HVPA	DOX/AMP
CAN	♀	idoso	Poodle	Bronquite+efusão pleural opaca	ES	DOX/AMP
CAN	♀	idoso	Poodle	Sec nasal purulenta	ES	-
CAN	♀	adulto	SRD	Bronquite+efusão pleural opaca	ES	-

Continua na próxima página.

Espécie	Sexo	Idade	Raça	Sinais Clínicos	Local*	Antibiótico*
Infecções da Mucosa Ocular						
CAN	♂	adulto	Pug	Conjuntivite+miíase	HVPA	-
CAN	♂	adulto	Pincher	Conjuntivite+sc purulenta	HVPA	-
CAN	♂	adulto	Poodle	Uveíte+conjuntivite	HVPA	-
CAN	♀	adulto	Weimaraner	Uveíte+conjuntivite	ES	ENO
CAN	♀	idoso	Rottweiler	Uveíte traumática	ES	-
CAN	♀	filhote	Beagle	Uveíte+conjuntivite	ES	-
CAN	♀	adulto	SRD	Conjuntivite	JW	-
CAN	♀	filhote	SRD	Miíase	ES	-
CAN	♀	filhote	SRD	Uveíte	ES	-
CAN	♀	filhote	SRD	Uveíte traumática	ES	MET
CAN	♀	adulto	Husky	Uveíte	JW	-
CAN	♀	filhote	Beagle	Uveíte traumática	JW	-
CAN	♀	adulto	SRD	Uveíte	JW	-
CAN	♂	filhote	SRD	Conjuntivite	JW	-
CAN	♀	adulto	SRD	Conjuntivite	JW	-
CAN	♀	adulto	Beagle	Uveíte	JW	-

CAN: espécie canina, FEL: espécie felina, Filhote: animais com idade até 1 ano e seis meses, Adulto: animais com idade até sete anos, Idoso: animais com idade acima de sete anos, ♂: sexo masculino, ♀: sexo feminino, SRD: cães sem raça definida, PDB: felinos pêlo curto brasileiro, * instituição de coleta da amostra, * antibioticoterapia realizada antes da coleta das amostras, JW: Instituto Veterinário Municipal Jorge Waitsman, ES: Universidade Estácio de Sá, HVPA: Hospital Vetainário de Pequenos Animais da UFRRJ, PMERJ: Polícia Militar de Estado do Rio de Janeiro, MET; Metronidazol, ENO: enrofloxacina, DOX: doxiciclina, AMP:ampicilina, CFX:ceftriaxona.

Anexo VI

Distribuição de dados epidemiológicos dos processos infecciosos de animais de companhia.

Casos Clínicos de Otite Externa Canina	
Distribuição quanto ao sexo	
♂	50,0%
♀	42,4%
Distribuição quanto à idade	
adulto	92,4%
filhote	6,1%
idoso	1,5%
Distribuição quanto à raça	
Pastor Alemão	18,2%
SRD	16,7%
Beagle	12,1%
Labrador	7,6%
Cocker spainel	6,1%
Pastor holândes	4,5%
Pastor Mallinois	4,5%
Poodle	4,5%
Dogo alemão	3,0%
Pastor Belga	3,0%
Rotweiller	3,0%
Boxer	3,0%
Cane Corso	3,0%
Dashund	1,5%
Dálmata	1,5%
Rottweiler	1,5%
Pittbull	1,5%
Chow chow	1,5%
Pointer	1,5%
Lhasa Apsu	1,5%

Infecções do Trato Urinário			
Distribuição quanto ao sexo			
Cães		Felinos	
adulto	44,1%	adulto	75,0%
idoso	41,2%	idoso	25,0%
filhote	14,7%		
Distribuição quanto à idade			
♂	61,8%	♂	83,3%
♀	38,2%	♀	16,7%
Distribuição quanto à raça			
SRD	35,3%	PCB	62,5%
Poodle	14,7%	Ciamês	16,7%
Cocker spainel	5,9%	Persa	12,5%
Pittbull	5,9%	Perça	8,3%
Boxer	5,9%		
Dog alemão	5,9%		
Doberman	2,9%		
Pastro alemão	2,9%		
Pastor alemão	2,9%		
Dálmata	2,9%		
Dashund	2,9%		
Husky	2,9%		
Cocker sp.	2,9%		
Pastor	2,9%		
Golden Retrv.	2,9%		

Infecções de pele de cães e gatos			
Distribuição quanto ao sexo			
Cães		Felinos	
♂	64,5%	♀	45,5%
♀	35,5%	♂	54,5%
Distribuição quanto a idade			
adulto	93,5%	adulto	81,8%
idoso	6,5%	idoso	18,2%
Distribuição quanto a raça			
SRD	29,0%	Ciamês	9,1%
poodle	9,7%	PCB	27,3%
hotweiller	6,5%	Perça	18,2%
Pittbull	6,5%	SRD	45,5%
PCB	6,5%		
Labrador	6,5%		
Bulldog ingl.	6,5%		
Dashund	3,2%		
Husky	3,2%		
Pointer	3,2%		
Pastor alemão	3,2%		
Sharpei	3,2%		
Golden Retr.	3,2%		
Yorkshire	3,2%		
Chowchow	3,2%		
Lhasa apsu	3,2%		

Anexo VII

Análises Estatísticas: Determinação da CIM para Azitromicina.
Tabela dos coeficientes para regressão logística dos ensaios de dose-resposta.

Tratamento	Coeficientes				
	a	b	c	d	r2
Azitromicina-caldo					
<i>Staphylococcus</i> spp.	8,7857	-12,296	7,3236	-0,5707	0,974
Bastonetes Gram-negativos	-32,217	21,9928	-4,4457	0,3472	0,988
Azitromicina-agar					
<i>Staphylococcus</i> spp.	-14,067	12,8376	0,0897	0,0509	0,981
Bastonetes Gram-negativos	23,1435	0	-1,6447	0,2169	0,985
Azitromicina-caldo					
<i>Staphylococcus aureus</i>	-13,939	9,2657	2,1562	-0,2225	0,94
<i>S. intermedius</i>	-101,09	56,7203	-6,2028	0,2309	0,999
<i>S. hyicus</i>	-95,971	56,0523	-6,2854	0,2331	0,974
SCN	1,1111	6,8538	0,4953	-0,0453	0,996
Azitromicina-agar					
<i>Staphylococcus aureus</i>	-74,351	43,7508	-4,3979	0,1492	0,989
<i>S. intermedius</i>	-10,381	8,8351	0,7526	-0,0738	0,981
<i>S. hyicus</i>	-13,077	17,6514	-0,9996	-0,003	0,946
SCN	15,2778	-11,119	3,9336	-0,225	0,985
Tratamento	Concentração Inibitória Mínima (μ.ml-1)				
	90%		50%		
Azitromicina-caldo					
<i>Staphylococcus</i> spp.	57,68003			15,03263	
Bastonetes Gram-negativos	512			272,4788	
Azitromicina-agar					
<i>Staphylococcus</i> spp.	171,2547			22,7848	
Bastonetes Gram-negativos	310,8339			200,8535	
Azitromicina-caldo					
<i>Staphylococcus aureus</i>	114,5632			10,77787	
<i>S. intermedius</i>	697,4945			11,55143	
<i>S. hyicus</i>	81,00842			11,23556	
SCN	526,3943			31,34145	
Azitromicina-agar					
<i>Staphylococcus aureus</i>	268,7275			13,36141	
<i>S. intermedius</i>	117,784			24,59	
<i>S. hyicus</i>	96,33579			16,33619	
SCN	263,1971			53,07645	

Cálculo de p valores adotando $p \geq 0,05$ (98%).

<i>Staphylococcus</i> spp. /Azitromicina Caldo					
sensibilidade	Dose	tam.amostra	z-coef normal	padrão	p-valor
2	1	100			
4	2	100			
21	4	100			
41	8	100			
59	16	100	1,83		0,034
66	32	100	3,38		0,000
70	64	100	4,36		0,000
72	128	100	4,90		0,000
73	256	100	5,18		0,000
77	512	100	6,42		0,000
<i>Staphylococcus</i> spp. /Azitromicina Caldo					
3	1	100			
4	2	100			
25	4	100			
35	8	100			
49	16	100	-0,20		0,579
58	32	100	1,62		0,053
63	64	100	2,69		0,004
65	128	100	3,14		0,001
69	256	100	4,11		0,000
75	512	100	5,77		0,000
Bastonetes Gram-negativos /Azitromicina Caldo					
1,5625	4	64			
9,375	8	64			
10,9375	16	64			
14,0625	32	64			
20,3125	64	64	-5,90		1,000
34,375	128	64	-2,63		0,996
65,625	256	64	2,63		0,004
87,5	512	64	9,07		0,000
Bastonetes Gram-negativos /Azitromicina Àgar					
9,375	8	65			
9,375	16	65			
14,0625	32	65			
17,1875	64	65			
23,4375	128	65	-5,06		1,000
51,5625	256	65	0,25		0,400
75	512	65	4,65		0,000

<i>Staphylococcus intermedius</i> /Azitromicina Caldo					
sensibilidade	Dose	tam.amostra	z-coef normal	padrão	p-valor
20	4	35			
40	8	35			
57,14285714	16	35			
65,71428571	32	35			
71,42857143	64	35	2,81		0,003
74,28571429	128	35	3,29		0,001
74,28571429	256	35	3,29		0,001
77,14285714	512	35	3,82		0,000
<i>Staphylococcus aureus</i> /Azitromicina Caldo					
4,545454545	1	22			
4,545454545	2	22			
13,63636364	4	22			
50	8	22			
68,18181818	16	22	1,83		0,034
77,27272727	32	22	3,05		0,001
77,27272727	64	22	3,05		0,001
77,27272727	128	22	3,05		0,001
77,27272727	256	22	3,05		0,001
77,27272727	512	22	3,05		0,001
<i>S. hycus</i> /Azitromicina Caldo					
23,07692308	4	13			
38,46153846	8	13			
61,53846154	16	13			
61,53846154	32	13			
69,23076923	64	13	1,50		0,067
69,23076923	128	13	1,50		0,067
69,23076923	256	13	1,50		0,067
69,23076923	512	13	1,50		0,067
SCN /Azitromicina Caldo					
8,333333333	1	12			
16,66666667	2	12			
25	4	12			
33,33333333	8	12			
41,66666667	16	12	-0,59		0,721
50	32	12	0,00		0,500
58,33333333	64	12	0,59		0,279
66,66666667	128	12	1,22		0,110
66,66666667	256	12	1,22		0,110
75	512	12	2,00		0,023

<i>Staphylococcus intermedius</i> /Azitromicina ágar					
sensibilidade	Dose	tam.amostra	z-coef normal	padrão	p-valor
2,857143	1	35			
2,857143	2	35			
22,85714	4	35			
31,42857	8	35			
42,85714	16	35	-0,85		0,803
60	32	35	1,21		0,114
62,85714	64	35	1,57		0,058
68,57143	128	35	2,37		0,009
71,42857	256	35	2,81		0,003
82,85714	512	35	5,16		0,000
<i>Staphylococcus aureus</i> /Azitromicina ágar					
7,692308	1	100			
7,692308	2	100			
38,46154	4	100			
38,46154	8	100			
53,84615	16	100	0,77		0,220
53,84615	32	100	0,77		0,220
61,53846	64	100	2,37		0,009
61,53846	128	100	2,37		0,009
61,53846	256	100	2,37		0,009
61,53846	512	100	2,37		0,009
<i>S. hycus</i> /Azitromicina ágar					
7,692308	1	13			
7,692308	2	13			
38,46154	4	13			
38,46154	8	13			
53,84615	16	13	0,28		0,390
53,84615	32	13	0,28		0,390
61,53846	64	13	0,86		0,196
61,53846	128	13	0,86		0,196
61,53846	256	13	0,86		0,196
61,53846	512	13	0,86		0,196
SCN /Azitromicina ágar					
8,333333	1	12			
8,333333	2	12			
8,333333	4	12			
16,66667	8	12			
33,33333	16	12	-1,22		0,890
41,66667	32	12	-0,59		0,721
58,33333	64	12	0,59		0,279
58,33333	128	12	0,59		0,279
66,66667	256	12	1,22		0,110
75	512	12	2,00		0,023

Anexo VIII

Correlação entre fenótipo e genótipo da produção de hemolisinas.

Resultados obtidos através do teste de Qui-Quadrado (X^2).

- Gene *hla* X produção de alfa-hemolisina.

Crosstab					
			resultc		Total
			HEMOL	N-HEMOL	
hla	-	Count	24	44	68
		Adjusted Residual	-2,3	2,3	
	+	Count	19	13	32
		Adjusted Residual	2,3	-2,3	
Total		Count	43	57	100

Chi-Square Tests					
	Value	df	Asymp. Sig. (2-sided)	Exact Sig. (2-sided)	Exact Sig. (1-sided)
Pearson Chi-Square	5,148(b)	1	,023		
Continuity Correction(a)	4,213	1	,040		
Likelihood Ratio	5,135	1	,023		
Fisher's Exact Test				,031	,020
Linear-by-Linear Association	5,097	1	,024		
N of Valid Cases	100				
a Computed only for a 2x2 table					
b 0 cells (,0%) have expected count less than 5. The minimum expected count is 13,76.					

Resultados obtidos através do teste de Qui-Quadrado (X^2).
 - Gene *hly* X produção de beta-hemolisina.

Crosstab							
			result		Total		
			HEMOL	N-HEMOL			
hlb	-	Count	32	52	84		
		Adjusted Residual	-2,3	2,3			
	+	Count	11	5	16		
		Adjusted Residual	2,3	-2,3			
Total		Count	43	57	100		
Chi-Square Tests							
			Value	df	Asymp. Sig. (2-sided)	Exact Sig. (2-sided)	Exact Sig. (1-sided)
Pearson Chi-Square			5,153(b)	1	,023		
Continuity Correction(a)			3,978	1	,046		
Likelihood Ratio			5,147	1	,023		
Fisher's Exact Test						,029	,023
Linear-by-Linear Association			5,101	1	,024		
N of Valid Cases			100				
a Computed only for a 2x2 table							
b 0 cells (,0%) have expected count less than 5. The minimum expected count is 6,88.							

Anexo IX

Correlação entre fenótipo e genótipo da produção de “slime”.
Resultados obtidos através do teste de Qui-Quadrado (X^2).

- Genes *icaA* X produção de “slime”.

Crosstab					
			Resultado (ica A)		Total
			-	+	
slime	-	Count	13	72	85
		% within g1	15,3%	84,7%	100,0%
		Adjusted Residual	1,6	-1,6	
	+	Count	0	15	15
		% within g1	,0%	100,0%	100,0%
		Adjusted Residual	-1,6	1,6	
Total		Count	13	87	100
		% within g1	13,0%	87,0%	100,0%

Chi-Square Tests					
	Value	df	Asymp. Sig. (2-sided)	Exact Sig. (2-sided)	Exact Sig. (1-sided)
Pearson Chi-Square	2,637(b)	1	,104		
Continuity Correction(a)	1,458	1	,227		
Likelihood Ratio	4,555	1	,033		
Fisher's Exact Test				,207	,104
N of Valid Cases	100				
a Computed only for a 2x2 table					
b 1 cells (25,0%) have expected count less than 5. The minimum expected count is 1,95.					

Resultados obtidos através do teste de Qui-Quadrado (X^2).
 - Genes *icaB* X produção de “slime”.

Crosstab					
			Resultado (ica B)		Total
			-	+	
slime	-	Count	13	72	85
		% within g2	15,3%	84,7%	100,0%
		Adjusted Residual	1,6	-1,6	
	+	Count	0	15	15
		% within g2	,0%	100,0%	100,0%
		Adjusted Residual	-1,6	1,6	
Total		Count	13	87	100
		% within g2	13,0%	87,0%	100,0%

Chi-Square Tests					
	Value	df	Asymp. Sig. (2-sided)	Exact Sig. (2-sided)	Exact Sig. (1-sided)
Pearson Chi-Square	2,637(b)	1	,104		
Continuity Correction(a)	1,458	1	,227		
Likelihood Ratio	4,555	1	,033		
Fisher's Exact Test				,207	,104
N of Valid Cases	100				
a Computed only for a 2x2 table					
b 1 cells (25,0%) have expected count less than 5. The minimum expected count is 1,95.					

Anexo X

Perfil dos isolados de *Staphylococcus* spp. (n=100) quanto a presença dos genes *agr*, *hla*, *hly*, *icaA*, *icaD* e *spaA*.

Perfil (n de isolado)	Hemolisinas			"slime"		Proteína A
	<i>agr</i>	<i>hla</i>	<i>hly</i>	<i>icaA</i>	<i>icaD</i>	<i>spaA</i>
1(18)	-	-	-	-	-	-
2(12)	-	-	-	-	-	+
3(10)	+	-	-	-	-	-
4(9)	-	+	-	-	-	+
5(6)	+	-	-	-	-	+
7(6)	-	-	-	+	-	+
8(5)	-	+	+	-	+	+
9(4)	-	-	-	+	-	-
10(4)	-	+	-	-	-	-
9(4)	+	+	-	-	-	+
10(4)	-	-	+	-	-	+
11(3)	-	-	-	-	+	-
12(2)	+	-	-	+	-	-
13(2)	-	-	-	-	+	+
14(2)	+	+	+	-	-	+
15(2)	+	+	+	-	-	-
16(1)	+	+	+	+	+	-
17(1)	+	+	+	-	+	-
18(1)	+	-	+	-	+	-
19(1)	+	+	-	-	+	+
20(1)	+	-	-	+	-	+
21(1)	+	+	+	-	+	+
22(1)	+	-	+	-	-	+

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)