

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA "JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA
CAMPUS DE BOTUCATU

**PREVALÊNCIA DE *Staphylococcus* spp. RESISTENTE A
METICILINA (MRS) EM EQUINOS NO AMBIENTE
HOSPITALAR E HUMANOS CONTACTANTES**

GIOVANE OLIVO

Botucatu - SP

2016

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA "JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA
CAMPUS DE BOTUCATU

PREVALÊNCIA DE *Staphylococcus* spp. RESISTENTE A
METICILINA (MRS) EM EQUINOS NO AMBIENTE
HOSPITALAR E HUMANOS CONTACTANTES

Giovane Olivo

Tese apresentada junto ao Programa de Pós-
Graduação em Medicina Veterinária para
obtenção do título de Doutor.

Orientador: Prof. Dr. Alexandre Secorun Borges
Co-Orientador: Prof. Dr. Márcio Garcia Ribeiro

Botucatu - SP
2016

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CÂMPUS DE BOTUCATU - UNESP

BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: ROSANGELA APARECIDA LOBO-CRB 8/7500

Olivo, Giovane.

Prevalência de *staphylococcus* spp. resistente a
metecilina (mrs) em equinos no ambiente hospitalar e humanos
contactantes / Giovane Olivo. - Botucatu, 2016

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista "Júlio
de Mesquita Filho", Faculdade de Medicina Veterinária e
Zootecnia

Orientador: Alexandre Secorun Borges

Capes: 50501062

1. Cavalo - Doenças. 2. *Staphylococcus aureus*. 3.
Staphylococcus aureus resistente à metecilina. 4.
Prevalência. 5. Veterinários.

Palavras-chave: ST398; colonização; equino; humano;
metecilina resistente.

Nome do autor: Giovane Olivo

Título: PREVALÊNCIA DE *Staphylococcus* spp. RESISTENTE A METICILINA (MRS) EM EQUINOS NO AMBIENTE HOSPITALAR E HUMANOS CONTACTANTES.

COMISSÃO EXAMINADORA

Prof. Adj. Dr. Alexandre Secorun Borges
Presidente e Orientador
Departamento de Clínica Veterinária
Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia – UNESP – Botucatu

Prof. Adj. Dr. Marcos Bryan Heinemann
Membro
Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Animal
Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia – USP – São Paulo

Prof. Adj. Dr. João Pessoa Araújo Junior
Membro
Departamento de de Microbiologia e Imunologia
Instituto de Biociências/FMVZ – UNESP – Botucatu

Prof^a. Adj. Dr^a. Maria de Lourdes Ribeiro de Souza da Cunha
Membro
Departamento de de Microbiologia e Imunologia
Instituto de Biociências – UNESP – Botucatu

Prof^a. Adj. Dra. Regina Kiomi Takahira
Membro
Departamento de Clínica Veterinária
Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia – UNESP – Botucatu

Data da Defesa: 16 de Dezembro de 2016.

Dedicatória

Aos meus pais, **Nerio Olivo** e **Maria Adriana da Silva**, pelo amor e compreensão, por me apoiarem e orientarem em todas as decisões e caminhos que escolhi.

Ao meu irmão **Leandro Olivo**, por toda amizade e bons momentos vividos ao seu lado.

A minha namorada **Juliana Mattos Pascotto**, pela compreensão e empatia em todos os momentos vividos, apoiando-me incondicionalmente.

“In Memoriam”,

Ao meu avô e grande amigo **Angelo Olivo**, por me incentivar na profissão de Médico Veterinário e fazer de minha infância algo bom em se recordar.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, que sempre me deu forças, levando-me a crer em dias melhores.

Em especial:

Ao meu orientador Prof. Dr. Alexandre Secorun Borges, pela amizade e orientações durante a residência, mestrado e pela oportunidade concedida para realizar o curso de doutorado sobre sua orientação (VOCÊ É O CARA!);

Ao meu Co-orientador Prof. Dr. Márcio Garcia Ribeiro, pela amizade e por nunca medir esforços para que este projeto fosse realizado;

A professora Maria de Lourdes Ribeiro de Souza da Cunha pela “co-orientação”, sempre disposta a elucidar qualquer dúvida e contribuir na execução desta pesquisa;

Aos meus amigos da “salinha”: Cesar Erineudo Tavares de Araújo, Campo Amor Vieira da Cunha Neto, Juliana Mira Hernandez, Mariana Herman e Danilo Andrade, pela amizade, convivência e por me ajudarem durante o curso de doutorado;

A todos do laboratório de microbiologia (orientados da prof. “Lurdinha”), em especial a Priscila Luiza Melo, Danilo Flávio Moraes Riboli, Nathalia Bibiana Teixeira, Thaís Alves Barbosa e Luiza Pinheiro;

Aos meus amigos, Leandro Américo e Rodrigo Cavalcanti por todo apoio e ajuda durante a residência e pós-graduação;

Aos meus amigos e funcionários da Clínica de Grandes Animais, Cesar Leme e Marco Antônio Simão pela ajuda durante a residência, mestrado e doutorado, e bons momentos de prosa.

Agradeço com simples palavras aos que tornaram este trabalho possível de ser realizado:

Aos Residentes da Clínica de Grandes Animais, Cirurgia de Grandes Animais e Reprodução Animal, que permitiram a nossa pesquisa e colheita de dados, sendo essencial para que este trabalho se tornasse realidade;

Ao técnico Fernando José Paganini Listoni e pós-graduandos do Departamento de Higiene Veterinária e Saúde Pública, pela disponibilidade em elucidar qualquer dúvida apresentada;

LISTA DE TABELAS

TABELA 1. Oligonucleotídeos para a detecção do gene <i>mecA</i>	20
TABELA 2. Sequência de primers utilizados na PCR.....	22
TABELA 3. Percentual de equinos e humanos com isolamento microbiano, Botucatu, SP (2016).....	23
TABELA 4. Identificação de <i>Staphylococcus</i> spp. (CoPS) isolados de equinos (n = 23) e humanos (n = 14), HV – Unesp (2016).....	25
TABELA 5. Resistência fenotípica aos antimicrobianos, de amostras de <i>Staphylococcus</i> spp. positivos para isolados do gene <i>mecA</i> de equinos e humanos, HV – Unesp (2016).....	26
TABELA 6. Dados epidemiológicos de equinos hospitalizados e humanos contactantes, segundo isolamento microbiológico e detecção molecular de estafilococos, Botucatu, SP, 2016.	29

LISTA DE FIGURAS

- FIGURA 1.** Gel de agarose após eletroforese para a identificação do gene *staur* (1250pb) e *mecA* (533bp - amostra 59), de estafilococos isolados de suabes nasais de equinos e humanos (representadas pela letra H). Botucatu, SP, 2016.....24
- FIGURA 2.** Gel de agarose após eletroforese (ITS-PCR) para a identificação de amostra de equinos, amostras controles (*S. aureus*, *S. hyicus* e *mecA*). Asterisco de cores semelhantes (junto a amostra) indica similaridade das bandas formadas.....25
- FIGURA 3.** Dendrograma criado a partir do padrão eletroforético por PFGE (enzima de restrição *ApaI*) de 15 amostras de *S. aureus* (coeficiente de similaridade de DICE; método de clusterização: UPGMA) de equinos e humanos (identificação – H a frente do número da amostra). A linha vertical vermelha mostra o nível de delineamento de 80%.....27
- FIGURA 4.** Dendrograma criado a partir do padrão eletroforético por PFGE (enzima de restrição *ApaI*) de 4 amostras de *S. aureus* (coeficiente de similaridade de DICE; método de clusterização: UPGMA) de equinos e humanos (identificação – H a frente do número da amostra). A linha vertical vermelha mostra o nível de delineamento de 97%.....27
- FIGURA 5.** Dendrograma criado a partir do padrão eletroforético por PFGE (enzima de restrição *SmaI*) de 10 amostras de *S. hyicus* (coeficiente de similaridade de DICE; método de clusterização: UPGMA) de equinos. A linha vertical vermelha mostra o nível de delineamento de 80%.....28

SUMÁRIO

Resumo	1
Abstract	2
Introdução	3
1. REVISÃO DE LITERATURA.....	4
1.1 Etiologia	4
1.2 Genoma	4
1.3 Biologia celular (Virulência).....	4
1.4 Epidemiologia	6
1.4.1 Colonização e infecção	7
1.4.2 Transmissão	8
1.5 Fisiopatologia	8
1.6 Infecções invasivas.....	9
1.6.1 Doenças mediadas por toxinas	10
1.7 Doenças causadas por <i>Staphylococcus aureus</i>	10
1.7.1 Endocardite	10
1.7.2 Síndrome do choque tóxico	11
1.8 Mecanismo de resistência aos agentes antimicrobianos	11
1.9 Tratamento de infecções por <i>Staphylococcus aureus</i> meticilina resistente	12
1.10 Prevenção	14
1.11 Diagnóstico	14
2. OBJETIVOS	16
2.1 Objetivo geral.....	16
2.2 Objetivos específicos	16
3. MATERIAL E MÉTODOS	17
3.1 Equinos, humanos contactantes e local de estudo.....	17
3.2 Colheita das amostras.....	17
3.3 Cultivo e isolamento de <i>Staphylococcus</i> spp.	17
3.4 Identificação de <i>S. aureus</i>	17
3.5 Determinação da concentração inibitória mínima (CIM)	18
3.6 Extração do ácido nucléico (DNA) bacteriano	18
3.7 Amplificação do ácido nucléico (PCR).....	19
3.8 Detecção do gene de resistência à meticilina (<i>mecA</i>) em <i>Staphylococcus</i> spp.....	20

3.9 <i>Pulsed-field gel electrophoresis</i> (PFGE)	20
3.11 Reação de sequenciamento	22
4. ANÁLISE ESTATÍSTICA	22
5. RESULTADOS	23
6. DISCUSSÃO	30
7. CONCLUSÕES	35
8. BIBLIOGRAFIA	36
9. TRABALHO A SER ENVIADO PARA A REVISTA CIÊNCIA RURAL.	54

Resumo

Staphylococcus spp. causam várias enfermidades em humanos e animais. O crescente desenvolvimento de resistência bacteriana aos antimicrobianos convencionais dificulta o tratamento das infecções por esses micro-organismos, e é considerado problema de saúde humana e animal. Foi investigada a frequência e distribuição de clones de *Staphylococcus* spp. resistentes a meticilina (MRS) em equinos hospitalizados e profissionais da área (médicos veterinários e funcionários), bem como avaliar possível transmissão interespecies. Foram colhidas 131 amostras de suabe nasal de equinos e 35 de humanos, cultivados em ágar de ovo-telurite-glicina-piruvato (BD Baird-Parker Agar®). Os micro-organismos foram submetidos à coloração de Gram, identificação por provas bioquímicas e métodos genotípicos (PCR) e ITS-PCR para caracterização das espécies. A sensibilidade aos antimicrobianos foi determinada pelo método de concentração inibitória mínima (MIC). O perfil clonal e identificação da estirpe dos *Staphylococcus* spp. foi caracterizado por Eletroforese em Gel de Campo Pulsado (PFGE) e pelo *Multilocus sequence Typing* (MLST). O gênero *Staphylococcus* foi isolado em 17,5% (23/131) dos equinos, dos quais, 8,4% (11/131) foram identificados como *S. hyicus*, 3,8% (5/131) *S. aureus*, 3,8% (5/131) *S. pseudintermedius* e 1,5% (2/131) *S. schleiferi*. Foi detectado o gene *mecA* em um isolado de *S. pseudintermedius*. Nos 35 humanos amostrados, foram identificados 40% (14/35) de *S. aureus*. A tipagem molecular por PFGE possibilitou identificar similaridade clonal (C1) dos isolados de *S. aureus*, obtido de duas pessoas da área Clínica Cirúrgica de Grandes Animais (CCGA) e uma da área de Reprodução de Grandes Animais (RGA). Foi possível observar similaridade entre os dois isolados de humanos da CCGA (C2), bem como entre as duas estirpes de departamentos distintos (CCGA e RGA – C5). Entre os isolados de *S. aureus* obtidas de equinos, obteve-se similaridade clonal entre os estafilococos provindos da RGA e Clínica de Grandes Animais (CGA) (C3), e de pacientes da CCGA (C4). Em quatro isolados foi identificado ST398, com similaridade clonal de 98,1% entre um estafilococo de equino e o de humano. Foi observado maior frequência de isolados de *S. hyicus* em equinos e *S. aureus* em humanos. O gene *mecA* foi detectado exclusivamente em *S. pseudintermedius* origem equina. A similaridade clonal foi atribuída entre isolados de *S. aureus* e *S. hyicus* de equinos, *S. aureus* de humanos, bem como entre as duas espécies estudadas, tendo como principais fatores de risco, o tempo de internação e o contato direto entre as espécies.

Abstract

Staphylococcus spp. is a primary agent of a wide variety of infections in humans and animals. The increasing of bacterial resistance of this microorganism to conventional antimicrobial difficulties the treatment of infections and is considered a problem in human and animal health problem. The aim of this research was to investigate the prevalence and distribution of *Staphylococcus* spp. resistant (MRS) and clones of staphylococci in hospitalized horses and professionals with some contact of animals (veterinarians and medical staff), and evaluate the possibility of interspecies transmission. One hundred thirty-one samples were taken from nasal swabs of horses and 35 humans, subjected to agar egg-glycine-tellurite-pyruvate (BD Baird-Parker Agar®). The isolates were submitted to Gram staining and conventional biochemical tests (catalase, coagulase, maltose, trehalose and mannitol) to phenotypic characterization of the species. The antimicrobial susceptibility was determined by minimum inhibitory concentration (MIC) method. The profile of clonal and strain characterization of *Staphylococcus* spp. was realized by Pulsed-field gel electrophoresis (PFGE) and Multilocus sequence Typing (MLST). *Staphylococcus* genus was isolated in 17.5% (23/131) of horses, of which 8.4% (11/131) were *S. hyicus*, 3.8% (5/131) *S. aureus*, 3.8% (5/131) *S. pseudintermedius* and 1.5% (2/131) of the *S. schleiferi*. *mecA* gene was detected in one isolate of *S. pseudintermedius* (resistant to oxacillin). For the 35 humans sample was identified *S. aureus* in 40% (14/35). Molecular typing by PFGE identified a cluster (C1) of the *S. aureus*, obtained from strains of Large Animal Surgery Service (CCGA) and a Large Animal Breeding Service (RGA). It was observed similarity between two human isolates from CCGA (C2), and between two strains of different services (CCGA and RGA - C5). Among the samples of *S. aureus* obtained from horses, it was similarity between clonal isolates from the RGA and Large Animal Internal Medicine (CGA) (C3), and patients from CCGA (C4). Four strains was identified as ST398, among them, clonal similarity of 98.1% between equine and human strains. Higher frequency of *S. hyicus* was observed among horses and *S. aureus* from humans. The *mecA* gene was identified exclusively in *S. pseudintermedius* (horses). The clonal similarity was attributed between all samples and species studied, had the same risk factors, the length of stay and direct contact between the species.

Introdução

Staphylococcus aureus Meticilina Resistente (MRSA) é um patógeno de pouca especificidade, capaz de causar doença em humanos e diversas espécies de animais. Equinos hospitalizados podem carrear e disseminar o micro-organismo, tornando-se um risco de infecção nosocomial tanto para humanos quanto para outras espécies animais (Weese et al., 2005b; Van den Eede et al., 2012b; 2013).

A importância no diagnóstico nos animais e humanos acometidos não se restringe apenas ao isolamento do micro-organismo, mas também a detecção do gene *mecA* (responsável por conferir resistência do micro-organismo à meticilina) e vários fatores de virulência que conferem ao *S. aureus* a capacidade de se multiplicar no hospedeiro e dificultar a ação de anticorpos e antimicrobianos. *Staphylococcus aureus* apresenta populações clonais com linhagens disseminadas globalmente, refletindo na tipificação molecular (CLSI, 2014). A *Multilocus Sequence Typing* (MLST) é o método de escolha para determinar a genética da população do patógeno estudado, capaz de reconhecer pequenas evoluções de linhagens por sequenciamento de sete genes conservados (*housekeeping genes*) para identificar o sequenciamento gênico (ST) dos isolados (Enright et al., 2000).

A ocorrência de surtos de MRSA em hospitais humanos e veterinários é atribuída a diferentes fatores, como a exposição prévia aos antimicrobianos e a colonização dos susceptíveis, agravados pelo estado de debilidade dos pacientes, principalmente no pós operatório, resultando em septicemias e óbitos (Weese, 2010). Outra possibilidade é de que *S. aureus* sensível a meticilina seja amplamente disseminado entre os humanos e, posteriormente, transferido para cavalos, onde podem adquirir um elemento *SCCmec* que é diferente daqueles verificados em humanos (MRSA - ST254) (Cuny et al., 2006).

Com a crescente resistência bacteriana aos antimicrobianos convencionais, como β -lactâmicos, penicilinas e a meticilina, tem se observado baixa eficácia dos tratamentos relacionados ao MRSA, de modo que atualmente o protocolo terapêutico baseia-se no uso da vancomicina, embora, já sejam relatadas cepas resistentes a esse fármaco (Hiramatsu, et al., 1997; Weigel, et al., 2003).

A detecção do MRSA é rotineira em países da América do Norte (Seguin et al., 1999; Weese e Lefebvre, 2007) e Europa (Weese et al., 2006b; Witte et al., 2007; Bergström et al., 2012), enquanto no Brasil poucos estudos (Lange et al., 1999; Maluta,

et al., 2010; Aquino et al., 2012) têm se preocupado em investigar o impacto de estafilococos, coagulase positiva e negativa, meticilina resistentes em animais domésticos.

1. REVISÃO DE LITERATURA

1.1 Etiologia

S. aureus é uma bactéria Gram positiva da família Staphylococcaceae, identificados microscopicamente como cocos agrupados (0,5 a 1,5 μm de diâmetro), pertencentes a microbiota da pele, conjuntivas e mucosas de humanos e animais. Possui grande número de fatores de virulência, possibilitando ao patógeno causar infecção, ocasionalmente oportunistas, em várias espécies animais (Gotz et al., 2006; Morgan, 2006; Weese, 2010; Van den Eede et al., 2012b).

1.2 Genoma

O genoma consiste em um cromossoma circular, com pouco mais de 2,8 milhões de bases (Mb), contendo profagos, plasmídios e transposons, carreando 2.800 genes (Gill et al., 2005; Lindsay e Holden, 2006; Lindsay, 2010). O MRSA contém fatores de virulência codificados por genes, os quais produzem enterotoxinas, leucocidinas (lesam leucócitos), hemolisinas (lesam eritrócitos), adesinas (função de fixação), estafiloagulase e formação de biofilme, responsáveis pela disseminação da bactéria (Martino et al., 2010; Costa et al., 2011; Lin et al., 2011; Jamrozny et al., 2012). O gene *mecA* está presente no MRSA e é responsável por codificar a Proteína Ligadora de Penicilina modificada (PBP2a ou PBP2'), que apresenta baixa afinidade aos antimicrobianos beta-lactâmicos (Engemann et al., 2003; Melzer, et al., 2003).

1.3 Biologia celular (Virulência)

A parede celular estafilocócica possui sua massa constituída de 50% por peptidoglicanos, que são formados por subunidades polissacarídeas de N-acetilglucosamina e ácido N-acetilmurâmico, com ligações β -1,4 (Gotz et al., 2006). O peptidoglicano pode estimular a liberação de citocinas pelos macrófagos, ativação do sistema complemento e a agregação de plaquetas. Diferenças na estrutura dos peptidoglicanos entre os isolados podem contribuir para a virulência, com capacidade de causar coagulação intravascular disseminada (Majcherczyk et al., 2003; Gotz et al., 2006).

A maioria dos *Staphylococcus* spp. produz microcápsulas. Dos 11 sorotipos de *S. aureus* microcapsulares polissacarídeos existentes, os tipos 1 e 2 raramente afetam humanos. Os tipos 5 e 8 são responsáveis por 75% das infecções humanas, os quais são produzidos pela maioria dos MRSA (Shinefield et al., 2002; Gotz et al., 2006).

S. aureus produzem inúmeras toxinas que são agrupadas de acordo com seu mecanismo de ação. Citotoxinas, tais como proteína alfa (toxina de 33-kD), provocam a formação de poros em membranas celulares e induzem reações pró-inflamatórias nas células de mamíferos (Bhakdi e Tranum-Jensen, 1991). Os superantígenos pirogênicos de toxinas estão estruturalmente relacionados, compartilhando vários graus de homologia da sequência de aminoácidos. Servem como superantígenos, ligando-se ao complexo de histocompatibilidade principal (MHC) de proteínas classe II, causando extensa proliferação de células T e liberação de citocinas (Marrack e Kappler, 1990). Diferentes domínios de moléculas de enterotoxinas são responsáveis por duas doenças causadas por estas proteínas: a síndrome do choque tóxico e a intoxicação alimentar (Harris et al., 1993). O gene para a síndrome do choque tóxico (TSST-1) é encontrado em 20% dos *S. aureus* isolados. Apesar da pequena homologia da sequência de aminoácidos, a toxina 1 da síndrome do choque tóxico (toxina 1) é estruturalmente similar as enterotoxinas B e C (Marrack e Kappler, 1990).

A toxina Panton-Valentine Leucocidina tem sido epidemiologicamente associada a infecções cutâneas graves em humanos, causando necrose tecidual e destruição de leucócitos, resultando em poros na membrana celular (Lin et al., 2011).

As infecções estafilocócicas apresentam inúmeros painéis determinantes de virulência, como nos estágios iniciais da infecção, quando a expressão de proteínas de superfície que se ligam as moléculas de proteínas da matriz extracelular favorece a colonização ao tecido do hospedeiro, enquanto que a síntese de exoproteínas favorece a propagação para os tecidos adjacentes (Cheung et al., 1994; Novic, 2003). A estafilocoagulase é uma proteína que reage com a protrombina formando estafilotrombina, capaz de coagular o sangue ao converter fibrinogênio em fibrina (Costa et al., 2011). O operon *agr* é responsável por induzir a expressão de exoproteínas (proteínas extracelulares), enquanto suprime a expressão da proteína de superfície, através da detecção da densidade populacional (bacteriana) (Novic, 2003; Ji et al., 1995).

1.4 Epidemiologia

Na década de 60 surgiram os primeiros relatos de internações de humanos acometidos por MRSA. No entanto, somente no início dos anos 1980 a situação tornou-se crítica, com alta mortalidade dos pacientes infectados. Dados de estudo realizado há mais de 20 anos pela Auditoria Oficial Nacional do Estado (Reino Unido) mostraram que infecções por MRSA eram a causa de morte de aproximadamente 5.000 pessoas por ano (Bourn, 2000). Em equinos, os primeiros relatos de MRSA datam de 1989, com infecções esporádicas atribuídas à transmissão direta por humanos (Ubukata et al., 1989; Weese, 2010), acometendo éguas (endometrite), e animais com feridas traumáticas e pós-cirúrgicas (Bergström et al., 2012). Em equinos hospitalizados, as infecções por MRSA já foram constatadas em diversos órgãos e tecidos, como nas articulações, pele e em feridas cirúrgicas, bem como, pneumonia, metrites, onfaloflebites, sinusites e septicemias, com diferentes graus de severidade (Weese, 2010).

S. aureus resistente a meticilina é um dos principais causadores de infecções hospitalares e tem mostrado aumento crescente de resistência a inúmeras classes de antimicrobianos (Enright et al., 2002). Estudos realizados por Melzer et al. (2003) em hospital humano na Inglaterra, comprovaram que a proporção de pacientes em bacteremia causadas por MRSA, e que evoluíram para óbito foi de 11,8% (45/382), enquanto em pacientes infectados por *S. aureus* sensível a meticilina (MSSA) foi de 5,1% (22/382). Weese e Lefebvre (2007) investigaram a prevalência do agente após realização do suabe nasal em todos os cavalos atendidos em *Ontario Veterinary College –Veterinary Teaching Hospital*, concluindo que 2% dos animais eram infectados nas primeiras 24 horas após hospitalização. Na Suécia, Bergström et al. (2012) após coletas de suabe nasal e de feridas de equinos, demonstraram que havia resistência dos isolados de estafilococos aos beta-lactâmicos, ciprofloxacino, gentamicina, canamicina, tetraciclina e trimetoprim, com sensibilidade dos isolados apenas para eritromicina, clindomicina e ácido fusídico; e confirmaram o diagnóstico de MRSA (gene *mecA*) nessas amostras após realização de PCR.

Na Alemanha, Witte et al. (2007) coletaram suabe nasal de funcionários e de feridas infeccionadas de animais admitidos em um hospital veterinário, comprovando a transmissão entre espécies com base nos resultados do MLST, a qual demonstrou predomínio da linhagem ST398, que apresentava as mesmas características fenotípicas

em todos os hospedeiros. Weese et al. (2006b) colheram suabe nasal de 2283 cavalos entre outubro de 2002 e junho de 2004, dos quais 61 apresentaram MRSA no momento da admissão. Destes, 53 adquiriram ao longo da hospitalização (não foi possível determinar o momento de infecção), totalizando 120 animais positivos (2,7%). Curiosamente, estes achados se assemelham aos encontrados em hospitais humanos.

Apesar da detecção de MRSA em equinos e humanos contactantes em outros países (Ubukata et al., 1989; Weese, 2010; Martino et al., 2010; Bergström et al., 2012), não foi encontrado nenhum estudo sistematizado de prevalência no Brasil com intuito de associar o isolamento de estafilococos *mecA* positivos em equinos e humanos que manipulam estes animais, bem como o potencial de transmissão interespecie.

1.4.1 Colonização e infecção

Os estafilococos estão difundidos globalmente (Harrison et al., 2014; Lin et al., 2011). Observa-se, entretanto, maior incidência de MRSA em animais criados para produção de carne, onde a densidade populacional é superior em comparação com as criações de equinos. Equinos com alto valor econômico é a espécie animal mais propensa a desenvolver a infecção, usualmente por apresentarem contato mais estreito com médicos veterinários e tratadores. A contaminação por MRSA pode ocorrer em cavalos hígidos, os quais podem ou não desenvolver os sinais clínicos da doença. Contudo, tornam-se fontes de infecção para humanos (Weese, 2010; Martino et al., 2010).

A ocorrência de isolados MRSA tornou-se problema também para os hospitais veterinários, bem como para as fazendas de criação de equinos, afetando principalmente potros (Weese et al., 2005b). Pessoas colonizadas por *S. aureus* tem maior risco de infecções. Altas taxas de colonização são relatadas em pacientes com diabetes melitus tipo 1, usuários de drogas intravenosas, pacientes submetidos a hemodiálise, cirúrgicos e com a síndrome da imunodeficiência adquirida (AIDS). Pacientes com déficit quantitativo ou qualitativo da função leucocitária possuem grande predisposição a infecções por *S. aureus* (Casewell, 1986; Sanford et al., 1994). Em hospitais veterinários, 9,3% das pessoas que trabalham diretamente com equinos, ou em unidades de tratamento intensivo com potros, podem estar colonizadas quando se possui ao menos um paciente humano positivo para a enfermidade (Weese, 2006a). Já em equinos hospitalizados, a infecção nosocomial pode oscilar entre 10 e 40% de MRSA do total de *S. aureus* isolados (Cuny et al., 2006). A análise gênica realizada em isolados obtidos

em hospitais veterinários confirmam a possibilidade de transmissão entre humanos e equinos (Moodley et al., 2006).

1.4.2 Transmissão

A difusão do patógeno no ambiente hospitalar é rápida, principalmente nos casos de pacientes imunologicamente comprometidos e/ou com lesões cutâneas que facilitam a colonização da bactéria. Médicos veterinários e funcionários que trabalham diretamente com animais de produção, podem carrear o micro-organismo e representam fonte de infecção (Morgan, 2008; Van den Eede et al., 2012b). A narina é o local onde *S. aureus* é comumente isolado, seguido do sistema urinário e feridas não cicatrizadas, o que possibilita a bactéria distribuir-se facilmente para os tecidos adjacentes e à corrente sanguínea. A formação de biofilme em catéter venoso e dispositivos intravasculares ou cutâneos é muito frequente, o que possibilita fácil acesso da bactéria à corrente sanguínea, capaz de causar septicemia (Moodley et al., 2006).

Pessoas colonizadas por *S. aureus* têm maiores chances de se tornarem infectadas. A maioria dos casos de infecção nosocomial ocorre por exposição das mãos das pessoas que cuidam de pacientes após terem sido previamente colonizados ou por contato com pacientes infectados (Weese et al., 2006a).

Existem vários fatores de risco associados a infecção estafilocócica, embora o contato direto entre humanos e equinos seja descrita como primordial. Weese et al. (2005a) em Ontário (Canadá) e Nova Iorque (EUA), relataram que em fazendas de criação de equinos colonizados por MRSA, existia ao menos um humano colonizado por algum subtipo indistinguível, tendo como fator de risco o contato regular com mais de 20 animais. Já para equinos, o único fator de risco encontrado era o fato de haver mais de 20 animais residentes no mesmo haras.

1.5 Fisiopatologia

S. aureus possui grande número de fatores de virulência (FV) associada a patogênese da infecção. Estes FV podem atuar em conjunto ou isoladamente. *S. aureus* é capaz de colonizar as narinas, axilas, faringe, conjuntivas, glândula mamária ou a superfície da pele lesionada. As infecções ocorrem quando há lesões de pele ou quebra da barreira natural da mucosa, possibilitando o acesso da bactéria a corrente sanguínea ou tecidos adjacentes (Noble et al., 1967; Casewell e Hill, 1986b). As narinas são o principal reservatório para *S. aureus*. Aparentemente a mucina é a principal superfície para a colonização inicial do hospedeiro por um processo que envolve interações entre a

proteína do estafilococos e o carboidrato de mucina. A função de IgA secretória ou adesinas de estafilococos ainda são pouco conhecidas na fisiopatogenia (Shuter et al., 1996).

1.6 Infecções invasivas

Bacteremias causadas por *S. aureus* podem evoluir para graves complicações, como endocardite, infecção metastática, ou a síndrome séptica. A célula endotelial é o principal alvo do patógeno. Os estafilococos aderem às células endoteliais e se ligam mediante interações receptor-adesina (Tompkins et al., 1990). Estudos *in vitro* demonstram que, após a adesão, os estafilococos são fagocitados pelas células endoteliais. O ambiente intracelular protege a bactéria do mecanismo de defesa do hospedeiro, bem como dos efeitos bactericidas dos antimicrobianos (Ogawa et al., 1985, Hamill et al., 1986).

A aderência de *S. aureus* ao trombo formado pela junção de plaquetas e fibrinas que se formam na superfície vascular lesada resulta na aderência de proteínas expondo a matriz molecular. A capacidade de invadir o tecido endovascular também favorece a disseminação para outros tecidos. O tropismo de *S. aureus* por tecido não é justificado exclusivamente com base nos padrões de fluxo sanguíneo. A principal função da aderência de proteínas de *S. aureus* é a ligação ao colágeno, que facilita a infecção de ossos e articulações nos animais (Patti et al., 1994).

Os eventos celulares que determinam o choque séptico são semelhantes em infecções por *S. aureus* e bactérias gram-negativas. Em ambos, monócitos e macrófagos desempenham função fundamental, embora os leucócitos polimorfonucleares, células endoteliais e plaquetas também desempenhem ação semelhante. Os monócitos produzem o fator de necrose tumoral e interleucina-1, 6 e 8, após contato com *S. aureus*, embora peptidioglicanos e ácido lipoteicóico também estejam envolvidos na patogênese (Timmerman et al., 1993). Em contraste, a expressão de interleucina 1 e 6 pelas células endoteliais requer a fagocitose da bactéria (Yao et al., 1995). Como resultado a liberação de citocinas e ativação celular, o sistema complemento, a cascata de coagulação e o ácido aracdônico são ativados, e o fator de ativação plaquetária é liberado. Estes eventos causam febre, hipotensão, aumento de permeabilidade capilar, coagulação intravascular disseminada, depressão da função do miocárdio e disfunções em múltiplos órgãos. Vários componentes têm capacidade de desencadear a síndrome séptica, como a combinação de peptidioglicanos e ácido lipoteicóico, que estimulam

inúmeras respostas fisiológicas, como observado em modelos experimentais de sepse (Spika et al., 1982, De Kimpe et al., 1995). As alfa toxinas são capazes de produzir muitos dos sinais e sintomas da sepse, incluindo hipotensão, trombocitopenia e oxigenação reduzida em modelos animais (Bhakdi et al., 1991).

1.6.1 Doenças mediadas por toxinas

Toxinas pirogênicas superantigênicas causam doença com risco de morte, em animais e humanos caracterizado pelo início abrupto de febre, choque, aumento da permeabilidade capilar e disfunção de múltiplos órgãos. Na síndrome do choque tóxico (toxina 1), ocorre a ligação de todas as regiões variáveis das células T $\beta 2$ positivas, causando expansão de células T clonais (5 a 20% de células T restantes, comparadas a 0,01% de células T de antígenos processados. Essa expansão na liberação maciça de citocinas por macrófagos e células T, medeiam a síndrome do choque tóxico, cuja patofisiologia é semelhante ao choque por endotoxinas. Em ambas síndromes, os produtos bacterianos induzem a liberação de quantidades excessivas de citocinas que causam danos teciduais (Marrack e Kappler, 1990, Yao et al., 1995).

1.7 Doenças causadas por *Staphylococcus aureus*

As infecções por *S. aureus* são as principais responsáveis por doenças de pele, tecidos moles, sistema respiratório, ósseo, articular e endovasculares. A maioria destas infecções ocorrem com pessoas com múltiplos fatores de riscos (Musher et al., 1994).

1.7.1 Endocardite

Acomete preferencialmente usuário de drogas de abuso injetáveis, pessoas idosas, portadores de próteses valvares e pacientes hospitalizados. Em todos os grupos, a apresentação inicial pode ser limitada a febre e mal estar, dificultando o diagnóstico. Ao contrário da endocardite causada por patógenos menos virulentos, a endocardite causada por *S. aureus* é caracterizada por início rápido com hipertermia, envolvimento de valvas cardíacas normais e ausência de sinais clínicos da doença na apresentação inicial (Chambers et al., 1983).

Em casos de endocardites relacionado ao uso intravenoso de drogas de abuso, a doença afeta frequentemente pacientes jovens, representado por mortalidade. O prognóstico é reservado para usuários de drogas intravenosas, que apresentam avanço da doença associado com o vírus da imunodeficiência humana (HIV), se comparados aqueles não infectados (Pulvirenti et al., 1996).

S. aureus é um dos mais comuns patógenos nosocomiais, principalmente nos casos de endocardite estafilocócica de próteses valvares e cateteres intravasculares, os quais constituem a fonte mais frequente de transmissão da bactéria. A mortalidade por endocardite oscila de 40 a 56%, embora seja ainda maior quando acometido por *S. aureus* (Fernández-Guerrero et al., 1995). Na endocardite, em sua maioria fulminante, as próteses valvares são as regiões mais afetadas, especialmente no período pós-operatório, caracterizado pela formação de abscessos do miocárdio e insuficiência valvar (Fang et al., 1993).

1.7.2 Síndrome do choque tóxico

A síndrome do choque tóxico foi relatada pela primeira vez em 1980-1981, onde vários casos foram associados com a introdução de tampões absorventes para o uso durante a menstruação. A doença é caracterizada por início fulminante, muitas vezes em pessoas saudáveis. Os sinais clínicos incluem hipertermia, exantema eritematoso com subsequente descamação, hipotensão e danos em múltiplos órgãos. Diagnósticos diferenciais incluem febre maculosa e febre escarlatina estreptocócica. A síndrome do choque tóxico muitas vezes se desenvolve em um local de colonização e não de infecção prévia (Chesney, 1981).

Em humanos a toxina 1 da síndrome do choque tóxico (toxina I) é responsável por mais de 90% das síndromes tóxicas associadas a menstruação, enquanto outras enterotoxinas estafilocócicas representam 50% dos casos não relacionados a menstruação. Estes casos representam infecções localizadas, cirurgias ou picadas de insetos. Pacientes com síndrome do choque tóxico não menstrual apresentam maior taxa de mortalidade quando comparados aos que apresentam a síndrome do choque tóxico menstrual (Wergeland et al., 1989).

1.8 Mecanismo de resistência aos agentes antimicrobianos

O primeiro antimicrobiano utilizado no tratamento do MRSA foi a penicilina, resultando em desenvolvimento de resistência ao fármaco pela produção de β -lactamase e posteriormente, uma alteração na proteína de ligação a penicilina (PBP2a), capaz de ser mobilizada até mesmo por plasmídeos, conferindo resistência aos estafilococos (Hiramatsu et al., 1990). MRSA é resistente a todos os antimicrobianos β -lactâmicos (Engemann et al., 2003; Melzer, et al., 2003). O tratamento com meticilina aumenta a pressão de seleção para linhagens com maior resistência ao fármaco, o que resultou no surgimento de *Staphylococcus aureus* meticilina-resistente (MRSA). De acordo com o

Instituto de Padronização de Laboratórios Clínicos (CLSI), em meados da década de 1990, já havia a informação que as estirpes de MRSA eram consideradas resistentes a outros betalactâmicos, como ampicilina-sulbactam, amoxicilina/ácido clavulânico, piperacilina-tazobactam e os carbapenemos (NCCLS, 1997). A resistência à meticilina ocorre devido à expressão do gene *mecA*, responsável por codificar a proteína ligadora de penicilina 2a (PBP2a), a qual possui baixa afinidade pelos antibióticos β -lactâmicos. No momento que o MRSA entra em contato com algum antibiótico, as PBP (proteínas ligadoras de penicilina) habituais não se expressam e a PBP2a realiza toda a transpeptidação, proporcionando a formação do peptidoglicano e a sobrevivência da bactéria (De Jonge et al., 1993).

O gene *mecA* está presente em diferentes espécies de *Staphylococcus*, embora inúmeras cepas meticilina resistentes são descendentes de um número limitado de clones, muitos de origem multiclonal, sugerindo a transmissão horizontal do gene (Archer et al., 1994; Kreiswirth, et al., 1993). Outros genes estafilocócicos, incluindo *bla* (para β -lactamase) e *fem* (para fatores essenciais para resistência a meticilina), influenciam a expressão de resistência (Chambers et al., 1983).

1.9 Tratamento de infecções por *Staphylococcus aureus* meticilina resistente

A penicilina é o antimicrobiano de escolha quando o isolado é sensível ao fármaco. A penicilina semi-sintética (nafcillina ou oxacillina) é indicada para cepas produtoras de β -lactamase. Nos casos em que pacientes apresentam histórico de alergia a penicilina do tipo tardia, a cefalosporina (cefazolina ou cefalotina) é uma alternativa no tratamento (Karchmer, 1991).

O tratamento das doenças desencadeadas pelo MRSA deve ser instituído utilizando protocolos terapêuticos adequados às condições do paciente, com objetivo de minimizar ou cessar os sinais clínicos da doença (Luna et al., 2010).

Na última década o tratamento preconizado para MRSA é baseado no uso de vancomicina via intravenosa (Luna et al., 2010), classificada como glicopeptídeo, a vancomicina é eficaz contra o MRSA, apesar de atualmente já existirem relatos de isolados com sensibilidade reduzida ao fármaco por conta de uma mutação no DNA, que determinou o espessamento da parede bacteriana, resultando na necessidade de maiores concentrações do antibiótico para inibir as enzimas bacterianas (Hiramatsu, 2001). Pesquisas realizadas com casos clínicos indicam como principais fatores de risco, o uso de vancomicina e infecções por MRSA (prévias) em pacientes que foram

novamente infectados, com consequente surgimento da resistência e diminuição da sensibilidade a vancomicina (Fridkin, et al., 2003). No Brasil, o isolamento e identificação de *S. aureus* resistente a vancomicina (VRSA) identificou 3,6% (5/140) dos isolados obtidos de pacientes com queimaduras (n = 4) e osteomielites (n = 1) de um hospital de São Paulo, SP (Oliveira, et al., 2001).

Outra medida terapêutica é a imunização passiva, que consiste na administração de anticorpos neutralizantes que bloqueiam proteínas essenciais da bactéria, eficazes em pacientes imunodeprimidos, incapazes de responder a uma forma de imunização ativa como a vacinação. Para pacientes cujo sistema imunológico está apto a reagir à doença, vacinas de DNA contendo um fragmento do gene *mecA* se mostraram seguras e eficazes, além de exigirem baixo custo de produção (Chippaux, 1998).

Alternativamente, a clindamicina tem apresentado grande eficiência, principalmente quando *S. aureus* expressa o gene de resistência *mecA*. Contudo, existem relatos clínicos de falha no tratamento quando este antimicrobiano é utilizado para o tratamento de cepas resistentes, devido a mudança do alvo ribossomal codificado pelo gene *erm* (Rao, 2000; Dinkovic et al., 2001; Siberry et al., 2003).

A vancomicina é o fármaco de escolha para os isolados resistentes à meticilina. Os pacientes incapazes de tolerar a vancomicina podem ser tratados com fluoroquinolonas, sulfametoxazol associado a trimetoprim, a clindamicina ou minociclina. As fluoroquinolonas possuem maior atividade antiestafilocócica. No entanto, seu uso também pode ser limitado pelo desenvolvimento de resistência durante a terapia (Chambers et al., 1983; Michel e Gutmann, 1997). Estudos tem investigado medicamentos potencialmente ativos contra estafilococos, incluindo quinupristina-dalfopristina (carbapenemo), e uma nova família de medicamentos antimicrobianos, as oxazolidinonas (Michel e Gutmann, 1997).

A rifampicina possui ação antiestafilocócica, porém se observa resistência quando não associada a outro fármaco. Embora a eficácia da rifampicina como fármaco alternativo em pacientes com infecções graves permanece controversa, recomenda-se ainda associação com gentamicina e vancomicina ou nafcilina para o tratamento de endocardite em prótese valvar (Wilson et al., 1995).

O tratamento instituído na síndrome do choque tóxico é direcionado contra as consequências da toxina, visando a reposição hidroeletrólítica, monitoração cuidadosa e antibioticoterapia para eliminar a colonização ou infecção estafilocócica e remoção do

material infectado. Estudos *in vitro* têm demonstrado que a utilização de imunoglobulinas por via intravenosa, com títulos elevados de anticorpos antienterotoxina, impede a estimulação de células T por enterotoxinas, o que sugere que a imunoglobulina assume importante papel no tratamento da síndrome do choque tóxico (Takei et al., 1993).

1.10 Prevenção

O uso de agentes tópicos demonstrou diminuir infecções subsequentes nos pacientes de risco, como imunodeficientes ou submetidos a cirurgias (Yu et al., 1986).

O mupirocin, um agente antiestafilocócico de uso tópico, inibe a síntese de RNA e proteínas, elimina a colonização nasal em portadores e pode reduzir a incidência de infecções em feridas (Wenzel e Perl, 1995).

O uso de vacinas de polissacarídeo capsular conjugado contra a proteína estafilocócica possui melhor fagocitose *in vitro*, promovendo maior proteção a modelos experimentais, incluindo endocardite (Fatton et al., 1996; Lee et al., 1997).

1.11 Diagnóstico

A pele e as cavidades nasais de equinos são os principais locais de amostragem para a identificação dos estafilococos (Weese et al., 2005a,b). Em humanos, a cavidade nasal é o local ideal para o isolamento, mais especificamente o vestíbulo nasal (Williams, 1963; Kluytmans et al., 1997; Loeffler, et al., 2005).

O diagnóstico é firmado com a identificação do micro-organismo. As amostras são colhidas preferencialmente por suabe nasal ou de feridas abertas (Loeffler, et al., 2005; Van den Eede et al., 2013). A amostra obtida pode ser cultivada em diversos meios de culturas convencionais ou seletivos como: ágar sangue bovino, ou MRSA específicos, podendo ser enriquecidos previamente com colistina, ácido nalidíxico e/ou BHI (infusão de cérebro-coração). O agente é diagnosticado fenotipicamente por testes bioquímicos como catalase, coagulase e maltose, cujos resultados devem ser positivos para confirmar a espécie de *S. aureus* (Bergström et al., 2012a; Van den Eede et al., 2012a; Van den Eede et al., 2013).

A análise do DNA cromossômico utilizando a restrição endonuclease *SmaI* e eletroforese em gel de campo pulsado (PFGE) tem sido amplamente adotada como o "padrão ouro" para a "impressão digital" (*fingerprinting*) do DNA de MRSA, o que proporciona informações sobre a propagação de clones epidêmicos da bactéria

(Murchan et al., 2003). Além disso, a eletroforese em gel de campo pulsado, e a técnica de *spa typing* têm por objetivo identificar fragmentos (banda específica do clone) e genes específicos (tipagem gênica) que determinam fatores de virulência (proteína A), respectivamente, o que possibilita avaliar a similaridade genética entre cepas humanas e de animais domésticos (Harrison et al., 2014).

A técnica de *Multi Locus Sequence Typing* (MLST) possibilita avaliar a filogenia ancestral da população estafilocócica e sequenciar sete genes conservados (*housekeeping genes*), visando submeter a sequência gênica obtida para uma base de dados e comparar com a sequência de outros isolados (Enright et al., 2002).

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Determinar a prevalência e distribuição dos clones de *Staphylococcus* spp. resistentes a meticilina (MRS) em equinos em ambiente hospitalar e profissionais contactantes (médicos veterinários e funcionários), bem como avaliar a existência da transmissão interespécies, provenientes do Hospital Veterinário [Clínica de Grandes Animais (CGA), Clínica Cirúrgica de Grandes Animais (CCGA) e Reprodução de Grandes Animais (RGA)] da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” (Unesp – Câmpus de Botucatu), São Paulo.

2.2 Objetivos específicos

- Isolar e identificar espécies coagulase positivas de *Staphylococcus* da cavidade nasal de equinos e humanos.
- Detectar o gene *mecA* nos isolados de origem humana e equina.
- Determinar a Concentração Inibitória Mínima (CIM) dos isolados, à oxacilina, clindamicina, amicacina, eritromicina, linezolida, quinupristina/dalfopristina e vancomicina, nas amostras *mecA* positivas.
- Determinar o perfil clonal dos isolados de *Staphylococcus* spp. pela técnica de eletroforese em campo pulsado (PFGE).
- Avaliar a filogenia ancestral da população estafilocócica pela técnica de MLST.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Equinos, humanos contactantes e local de estudo

Foram colhidas 131 amostras de suabe nasal de equinos (machos e fêmeas, independente da raça ou idade) e de 35 humanos (tratadores, enfermeiros, residentes, estagiários, médicos veterinários, de ambos os sexos) que trabalham diretamente com estes animais. O número de animais amostrados foi calculado utilizando o site *OpenEpi*, com intervalo de confiança de 95% e erro padrão de 2% (Dean et al., 2015).

O estudo foi conduzido com a permissão do Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA), concedido ao projeto intitulado “Estudo da frequência de detecção de *Staphylococcus aureus* metilicina resistente (MRSA) em equinos hospitalizados”, protocolo número 74/2015. A colheita de amostras humanas teve consentimento e aprovação do CAAE: 56025716.8.0000.5411, comprovante número 042532/2016.

3.2 Colheita das amostras

As amostras foram colhidas durante o internamento de equinos, e de humanos em contato direto com esta espécie, realizado com suabe estéril, friccionando-o na mucosa nasal com no mínimo dez movimentos de rotação, na região de vestíbulo nasal segundo Van den Eede et al., 2013). A técnica de coleta nasal em humanos consiste na introdução do suabe em ambas às narinas, realizando movimento de rotação da haste pressionando a extremidade contra a mucosa.

Após a colheita, as amostras foram mantidas em meio *Stuart* (4 °C) até o cultivo nos Laboratórios de Microbiologia da FMVZ e Instituto de Biociências (IB) da Unesp/Botucatu-SP.

3.3 Cultivo e isolamento de *Staphylococcus* spp.

Todas as amostras de suabe nasal foram semeadas no meio de ágar de ovo-telurite-glicina-piruvato (BD Baird-Parker Agar[®]) acrescido de gema de ovo com telurito de potássio (Difco[™] EY Tellurite Enrichment), mantidas em condições de aerobiose a 37° C, por 48 horas, avaliadas a cada 24 horas, com vistas ao isolamento de *Staphylococcus* spp.

3.4 Identificação de *S. aureus*

Os micro-organismos isolados foram submetidos à coloração de Gram, com o objetivo de observar a morfologia e coloração específica dos isolados. Após a visualização de cocos Gram positivos agrupados em formato de cachos, foram

realizadas as provas de identificação da catalase e coagulase, e provas bioquímicas como maltose, trealose e manitol para diferenciação de *S. aureus* de outras espécies de estafilococos coagulase positiva (CoPS) (Koneman et al., 1997).

3.5 Determinação da concentração inibitória mínima (CIM)

A sensibilidade microbiana “in vitro” dos isolados de *Staphylococcus* spp. portadores do gene *mecA* foi determinada pela técnica de CIM para oxacilina, clindamicina, eritromicina, amicacina, linezolida, quinupristina/dalfopristina e vancomicina. A escolha dos antimicrobianos supracitados é justificada pelo uso em pacientes humanos e equinos, cujo tratamento é instituído principalmente em ambiente hospitalar.

A CIM dos isolados foi avaliada por um kit comercial (E-testTM). Este procedimento é um método quantitativo, que utiliza fitas de plástico inertes e transparente, medindo 60 mm de comprimento por 5,5 mm de largura, o qual é incorporado a um gradiente decrescente de concentração estabilizado do antimicrobiano, disposto em ágar Mueller-Hinton contendo o isolado. As placas contendo as fitas foram incubadas a 37°C em condições de aerobiose, por 24h. A leitura foi realizada pela verificação na escala da parte anterior da fita, do valor correspondente à intersecção da zona de elipse de inibição do crescimento bacteriano. O isolado foi classificado como sensível ou resistente a cada antimicrobiano de acordo com as especificações do *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI, 2016).

3.6 Extração do ácido nucléico (DNA) bacteriano

O ácido nucleico foi extraído a partir de linhagens de *Staphylococcus* spp., cultivadas em ágar sangue, inoculadas individualmente em caldo Infusão de Cérebro e Coração (BHI) e incubadas a 37°C por 24 h. A extração foi realizada com o Kit Illustra[®] (GE Healthcare[®]) que consiste na digestão inicial das células de estafilococos com lisozima (10 mg/mL) e proteinase K (20 mg/mL). A seguir, 500µl da solução de extração foi adicionada à mistura e centrifugada a 5.000 x g por 1 min. Em seguida, o sobrenadante foi transferido para a coluna GFX e centrifugado a 5.000 x g por 1 minuto. O líquido coletado foi descartado e 500µL de solução de extração foram adicionadas novamente à coluna. Após a centrifugação e descarte do líquido coletado, 500µL da solução de lavagem foi adicionada à coluna que foi submetida à centrifugação a 14.000 x rpm por 3 min. A coluna foi adicionada para a eluição. As amostras foram

centrifugadas novamente a 5000 x g por 1 minuto, e a coluna de GFX desprezada. O DNA extraído foi mantido a -20 °C.

3.7 Amplificação do ácido nucléico (PCR)

A confirmação genotípica para os isolados de *S. aureus* foi realizada com base na detecção do gene *sau* especificada porção RNAr 23S, seguindo o protocolo descrito por Straub et al. (1999), no qual é utilizado os primers Staur4 (5'-ACGGAGTTACAAAGGACGAC - 3') e Staur6 (5'-AGCTCAGCCTTAACGAGTAC -3') com produto final de 1250 pb.

A identificação de *Staphylococcus* spp. foi confirmada utilizando a técnica de espaçador interno transcrito-PCR (ITS-PCR), descrita por Couto et al. (2001). Os isolados que não puderam ser identificados por ITS-PCR, foram submetidos ao sequenciamento do gene *rpoB*. A condição de ciclagem térmica para amplificar o gene *rpoB* parcial (899 pb) foi de 35 ciclos de desnaturação a 94°C durante 45 s (300 s para o primeiro ciclo), anelamento (60s a 52°C) e extensão (90s a 72°C; 600 s para o último ciclo). As reacções de sequenciação foi realizada num volume total de 25µL contendo 12,5µL de enzima (GoTaq® Green Master Mix), 8.5µL de H₂O (DNase RNase free), 1µL de cada primer, [Staph *rpoB* 1418f (5'- CAATTCATGGACCAAGC -3') e Staph *rpoB* 3554r (5'- CCGTCCCAAGTCATGAAAC -3')] e 2µL de DNA de cada amostra (Mellmann et al., 2006).

Os produtos amplificados foram purificados com um kit comercial, de acordo com a recomendação do fabricante. Após purificação, a concentração foi normalizada para 10 ng/µL para submissão à reacção de sequenciação. A reacção de sequenciação foi preparada contendo um volume final de 10 µL: 1,0 ul do *primer forward* ou *reverse* utilizado na reacção de PCR, a uma concentração de 5 uM, 2 µL (aproximadamente 20 ng) do produto amplificado purificado, com 1,0 µL de mix comercial (BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA), 1,5 µL de solução tampão (BigDye® Terminator v1.1 e v3.1 5X Sequencing Buffer (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) e qsp de água "livre de nuclease". Após a preparação das reacções de todos os espécimes foram submetidos a sequenciação automatizada directa com 3500 Genetic Analyzer (AppliedBiosystems, Foster City, CA, EUA). Após sequenciação, o controle de qualidade das sequências e os eletroferogramas obtidos foram realizados utilizando o software apropriado Sequencing Analysis 5.3.1 (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). As sequências de

nucleotídeos obtidas foram alinhadas utilizando a ferramenta BLAST-NCBI (www.ncbi.nlm.nih.gov/blast) para correta identificação da espécie.

3.8 Detecção do gene de resistência à meticilina (*mecA*) em *Staphylococcus* spp.

As reações de PCR para a detecção do gene *mecA* foram realizadas conforme os parâmetros descritos por Murakami et al. (1991). Em todas as reações realizadas foram utilizadas linhagens de referência internacional, como controle positivo (*S. aureus* ATCC 33591) e negativo (*S. aureus* ATCC 25923).

As reações de PCR para a detecção do gene *mecA* foram realizadas em tubos de microcentrífuga de 0,2 mL em volumes totais de 25 µL contendo 10 pmol de cada *primer* (Tabela 1), 2,5U de Taq DNA polimerase, 200µM de desoxirribonucleotídeos trifosfatados, 20 mM de Tris-HCl (pH 8,4), 0,75mM de MgCl₂ e 3µL de DNA MasterCycler gradient (Eppendorf, Hamburgo, Alemanha) empregando os seguintes parâmetros: 40 ciclos de desnaturação a 94° C por 30 segundos, anelamento dos *primers* a 55° C por 30 segundos e extensão a 72° C por um minuto. A eficiência das amplificações foi monitorada pela eletroforese da reação em gel de agarose 2% e corado com Syber Safe®. Os fragmentos de DNA amplificados foram visualizados e fotografados em transiluminador ultravioleta.

TABELA 1. Oligonucleotídeos para a detecção do gene *mecA*.

Função	Nome	Sequência de nucleotídeos 5'a 3'	Produto amplificado
Primer	<i>mecA1</i>	AAA ATC GAT GGT AAA GGT TGG	533 bp
Primer	<i>mecA2</i>	AGT TCT GCA GTA CCG GAT TTG	533 bp

Fonte: Murakami et al., 1991.

3.9 Pulsed-field gel electrophoresis (PFGE)

A tipagem por PFGE dos isolados foi realizada segundo o protocolo modificado de McDougal et al. (2003). As amostras foram colocadas em caldo BHI para crescimento durante 24h. Em um microtubo foi colocado 250µl da amostra crescida e centrifugada a 12.000rpm por 1 minuto. Depois de desprezado o sobrenadante e adicionado 150µl de solução TE (10mM de Tris,1mM EDTA [pH 8,0]), as amostras foram deixadas em banho maria por 10min a 37°C. Após agitação em vortex, foram adicionados 2,5µl de lisostafina (1mg/mL) e 150µl de agarose *low melt*. As amostras foram distribuídas nos moldes para plugues, após a solidificação foram colocadas em

placa de 24 poços com 2 mL de solução EC (6mM Tris-HCl, 1M NaCl, 100mMEDTA, 0,5% Brij-58, 0,2% deoxicolato de sódio, 0,5% laurilsarcosil sódico) e incubadas à 37°C por no mínimo 4 horas. O EC foi retirado e os plugues lavados com 2 mL de TE quatro vezes à temperatura ambiente com intervalos de meia hora. Para a restrição do DNA genômico foi utilizada a enzima *SmaI* (*FastDigestSmaI*, Fermentas Life Science, Canadá) e *ApaI* (Promega, Madison, WI) segundo Rasschaert et al. (2009).

A eletroforese foi realizada em aparelho CHEF-DRIII System® (BioRad Laboratories, EUA em gel de agarose a 1% preparado com TBE 0,5X (Pulsed Field Certified Agarose, BioRad Laboratories, EUA) sob as seguintes condições de corrida: intervalos de tempo de pulso de 5 a 40s por 21h; em rampa linear; 6V/cm; ângulo de 120°; 14 °C; 0,5M TBE como tampão de corrida. Foi utilizado Lambda Ladder PFG Marker (New England BioLabs) como marcador molecular. O gel foi corado com GelRed (10.000X em água, Biotium, EUA) por 1 hora, e fotografado sob transiluminação UV. A análise de similaridade foi realizada utilizando-se o software BioNumerics (versão 7.6; Applied Maths, Bélgica). A criação do dendrograma foi realizada pelo método UPGMA (Unweighted PairGroup Method with Arithmetic Mean), utilizando o software BioNumerics (versão 7.0; Applied Maths, Bélgica) com tolerância da posição das bandas e a otimização ajustadas para 1,25 e 0,5%, respectivamente. O coeficiente de similaridade de Dice $\geq 80\%$ foi escolhido para determinação dos clusters com uso da enzima de restrição *SmaI*. As amostras não identificadas no PFGE foram novamente submetidas ao teste com uso da enzima *ApaI*, cujo coeficiente de similaridade de Dice para escolha dos clusters foi $\geq 97\%$. Foi utilizada marcador Lambda Ladder PFG Marker (BioLabs) para normatização dos géis.

3.10 MLST – Multilocus Sequence Typing

O MLST foi realizado segundo as normas descritas por Enright et al. (2000). Cada par de primer amplificará um fragmento interno do gene *housekeeping* (cerca de 500pb), apresentados na tabela 2: carbamatoquinase (*arcc*) desidrogenase, do chiquimato (*aroE*), glicerol quinase (*glp*), guanilatoquinase (*gmk*), acetiltransferase fosfato (*pta*), triosefosfatoisomerase (*tpi*), e acetil coenzima A acetiltransferase (*yqiL*). Após a amplificação e sequenciamento dos sete genes *housekeeping*, as sequências foram analisadas e submetidas no site de forma a obter o número de identificação correspondente a cada um dos alelos. A combinação desses alelos indicou o tipo de sequência (ST) e o complexo clonal (CC) a que pertencem os isolados. A purificação foi realizada pelo Kit HiYield™ Gel/PCR Fragments

Extraction e a reação de sequenciamento foi descrita no item abaixo. A análise e comparação das sequências foram realizadas por banco de dados via internet (<http://www.mlst.net>).

TABELA 2. Sequência de primers utilizados na PCR

Gene	Iniciador	Sequência (5'-3')	Tamanho do produto Amplificado (pb)
Carbamato quinase	<i>arcC</i> -Up	TTGATTACACCAGCGGTATTGTC	570
	<i>arcC</i> -Dn	AGGTATCTGCTTCAATCAGCG	
Desidrogenase do chiquimato	<i>aroE</i> -Up	ATCGGAAATCCTATTTACATTC	536
	<i>aroE</i> -Dn	GGTGTGTATTAATAACGATATC	
Glicerol quinase	<i>glpF</i> -Up	CTAGGAAGTCAATCTTAATCC	534
	<i>glpF</i> -Dn	TGGTAAAATCGCATGTCCAATTC	
Guanilato quinase	<i>gmk</i> -Up	ATCGTTTTATCGGGACCATC	488
	<i>gmk</i> -Dn	TCATTAACTACAACGTAATCGTA	
Fosfato acetiltransferase	<i>pta</i> -Up	GTTAAATCGTATTACCTGAAGG	575
	<i>pta</i> -Dn	GACCCTTTTGTGAAAAGCTTAA	
Triose-fosfato isomerase	<i>tpi</i> -Up	TCGTTCAATTCTGAACGTCGTGAA	475
	<i>tpi</i> -Dn	TTTGCACCTTCTAACAATTGTAC	
Acetil coenzima A acetil transferase	<i>yqiL</i> -Up	CAGCATACAGGACACCTATTGGC	598
	<i>yqiL</i> -Dn	CGTTGAGGAATCGATACTGGAAC	

Fonte: Enright et al (2000).

3.11 Reação de sequenciamento

As reações foram realizadas em sequenciador 3500 Genetic Analyzer (AppliedBiosystems, Foster City, CA, EUA). A visualização das sequências (eletroforograma) foi realizada pelo programas Mega.

4. ANÁLISE ESTATÍSTICA

A análise dos dados e resultados foi realizada e apresentada descritivamente.

5. RESULTADOS

Foram analisados 131 amostras de suabe nasal de equinos e 35 de humanos colhidas entre fevereiro e agosto de 2016, provenientes dos setores ambulatoriais de Clínica Médica de Grandes Animais, Cirurgia de Grandes Animais e Reprodução Animal, do Hospital Veterinário (HV), na unidade da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia (FMVZ) da Universidade Estadual Paulista (UNESP), Câmpus de Botucatu, SP (Tabela 3).

Dos 131 suabes analisados de equinos, foram isolados micro-organismos em 94% (123/131) das amostras, enquanto nas amostras de origem humana houve 100% (35/35) de isolamento microbiano (Tabela 3).

TABELA 3. Percentual de equinos e humanos com isolamento microbiano, Botucatu, SP (2016).

	Amostras colhidas		
	Isolamento (BP)	Não isoladas (BP)	Total (n)
Equinos	123 (94%)	8 (6%)	131
Humanos	35 (100%)	0 (0,0%)	35

n = amostras testadas, BP = agar Baird Parker

Foi identificado *Staphylococcus* spp. em 23 amostras (17,5%) provenientes de equinos e 14 amostras (40%) de humanos. A detecção genotípica de *S. aureus* pela técnica de PCR para detecção do gene *sau*, confirmou *S. aureus* em 21,7% (5/23) das amostras de equinos e 100% (14/14) de humanos (Figura 1). A prevalência de equinos colonizados por um micro-organismo com o gene *mecA* foi de 0,8% (1/131), enquanto nas amostras de origem humana, não foi identificado o gene *mecA* (Figura 1).

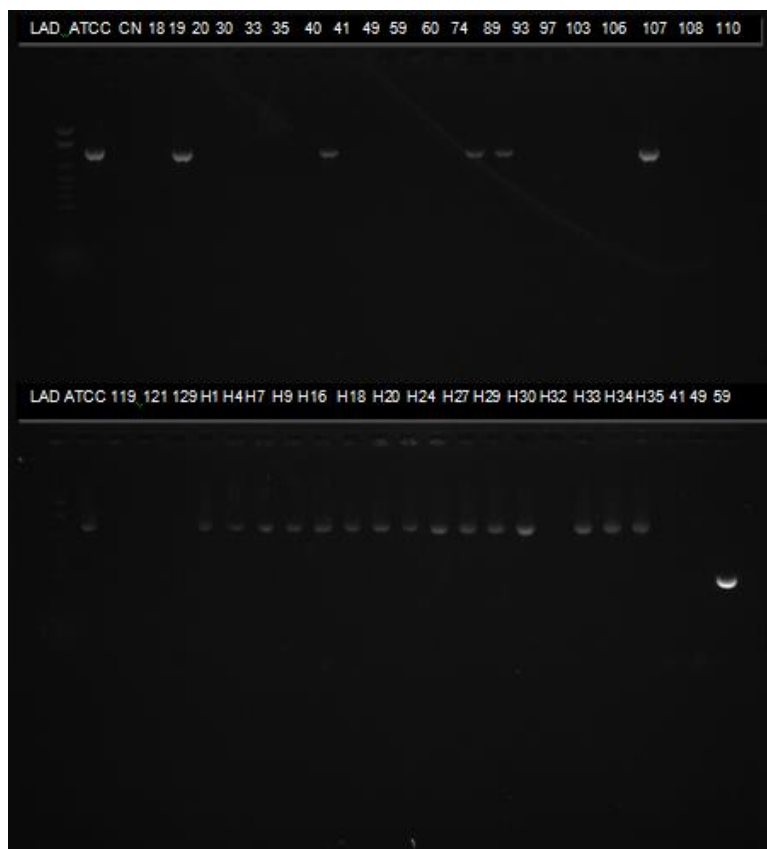


FIGURA 1. Gel de agarose após eletroforese para a identificação do gene *staur* (1250pb) e *mecA* (533bp - amostra 59), de estafilococos isolados de suabes nasais de equinos e humanos (representadas pela letra H). Botucatu, SP, 2016.

As estirpes coagulase positivas de equinos ($n = 19$), que não foram identificadas como *S. aureus* foram submetidas a técnica molecular de ITS-PCR (Figura 2). Nessas foi possível detectar 12 *S. hyicus*. Outros 3 não identificados, foram submetidos ao sequenciamento do gene *rpob*, dos quais foram identificados como uma amostra *S. pseudintermedius* (GenBank: [CP016073.1](#); [CP002439.1](#)) e outras duas como *S. schleiferi* (GenBank: [gi|928189965|AP014944.1](#); [gi|928189965|AP014944.1](#)).

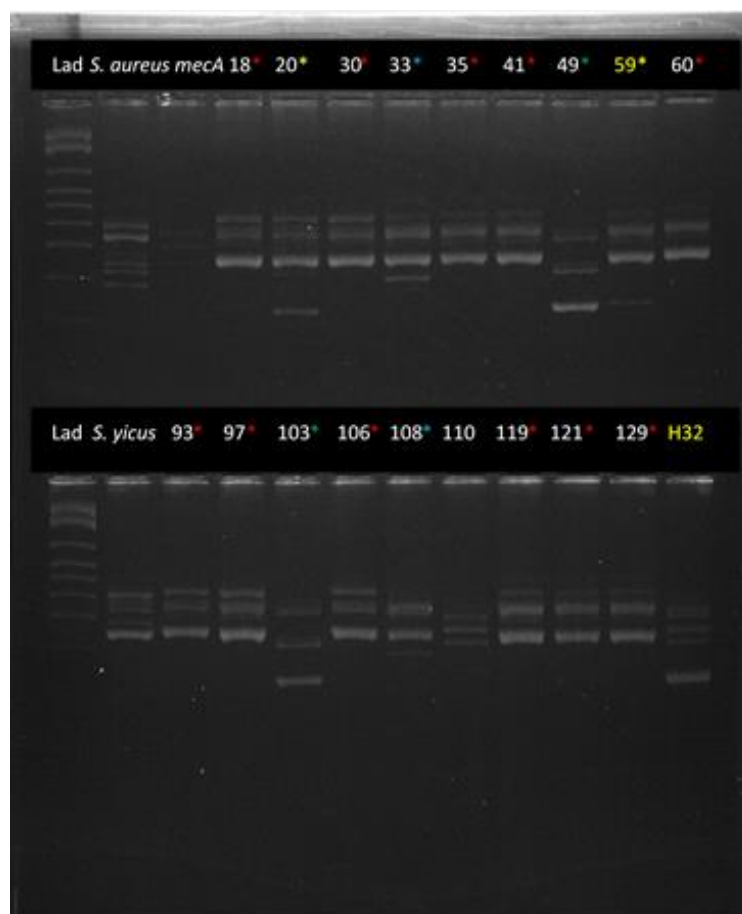


FIGURA 2. Gel de agarose após eletroforese (ITS-PCR) para a identificação de amostra de equinos, amostras controles (*S. aureus*, *S. hyicus* e *mecA*). Asterisco de cores semelhantes (junto a amostra) indica similaridade das bandas formadas.

Dos 23 isolados de equinos, submetidas a ITS-PCR, 47,8% (11/23) foram identificados como *Staphylococcus hyicus*, 21,7% *S. aureus*, 21,7% *S. pseudintermedius* e 8,6% *S. schleiferi*. Das amostras nasais humanas obteve-se frequência de 100% de *S. aureus*. Um isolado de equino (*S. pseudintermedius*) colhido no departamento de CCGA foi positivo para o gene *mecA* (Tabela 4).

TABELA 4. Identificação de *Staphylococcus* spp. (CoPS) isolados de equinos (n = 23) e humanos (n = 14), HV – Unesp (2016).

	<i>Staphylococcus</i> spp.					Total
	<i>S. aureus</i>	<i>S. hyicus</i>	<i>S. pseudintermedius</i> *	<i>Staphylococcus schleiferi</i>	Gene <i>mecA</i> *	
Equinos	21,7% (5)	47,8% (11)	21,7% (5)	8,6% (2)	4,3% (1)	23
Humanos	100% (14)	0	0	0	0	14

* = espécie de *Staphylococcus* spp. *mecA* positivo

No teste de concentração inibitória mínima, o isolado de *S. pseudintermedius* (equino), foi resistente a oxacilina. Houve sensibilidade para os demais antimicrobianos testados (vancomicina, amicacina, linezolida, quinopristina/dalfopristina) (Tabela 5).

TABELA 5. Resistência fenotípica aos antimicrobianos, de amostras de *Staphylococcus* spp. positivos para isolados do gene *mecA* de equinos e humanos, HV – Unesp (2016).

Espécie	Antimicrobianos (MIC)						Total
	Amicacina	Eritromicina	Linezolida	Quinopristina/ Dalfopristina	Oxacilina	Vancomicina	
Equinos	S (.50)	S (.094)	S (1.0)	S (.75)	R (1.0)	S (1.5)	1

MIC = concentração inibitória mínima, S = sensível ao antibiótico testado, R = resistente ao antibiótico testado

A frequência de isolamento de *Staphylococcus* spp. de equinos hospitalizados foi de 17,5% (23/131), dos quais, 8,4% (11/131) eram *S. hyicus*, 3,8% (5/131) *S. aureus*, 3,8% (5/131) *S. pseudintermedius* e 1,5% (2/131) identificados como *S. schleiferi*. Foi detectado o gene *mecA* em apenas uma amostra identificada como *S. pseudintermedius*.

A tipagem molecular por PFGE identificou um cluster dos isolados de *S. aureus*, que incluíam simultaneamente ≥ 3 amostras, com similaridade $\geq 80\%$ (Figura 1). Esse cluster (C1) conta com isolados de humanos, o que indica disseminação do micro-organismo entre duas pessoas da área CCGA e uma do departamento RGA. Foi possível observar similaridade ($\geq 80\%$) entre outros dois isolados de humanos obtidos do departamento de CCGA (C2), bem como duas estirpes dos departamentos de CCGA e RGA (C5) (Figura 3).

Nos isolados de equinos foi possível determinar similaridade ($\geq 80\%$) provindos da RGA e CGA (C3), e entre dois animais da CCGA (C4). Todos esses quatro equinos eram mantidos há mais de um ano em locais próximos e submetidos a mesmo manejo nutricional (Figura 3).

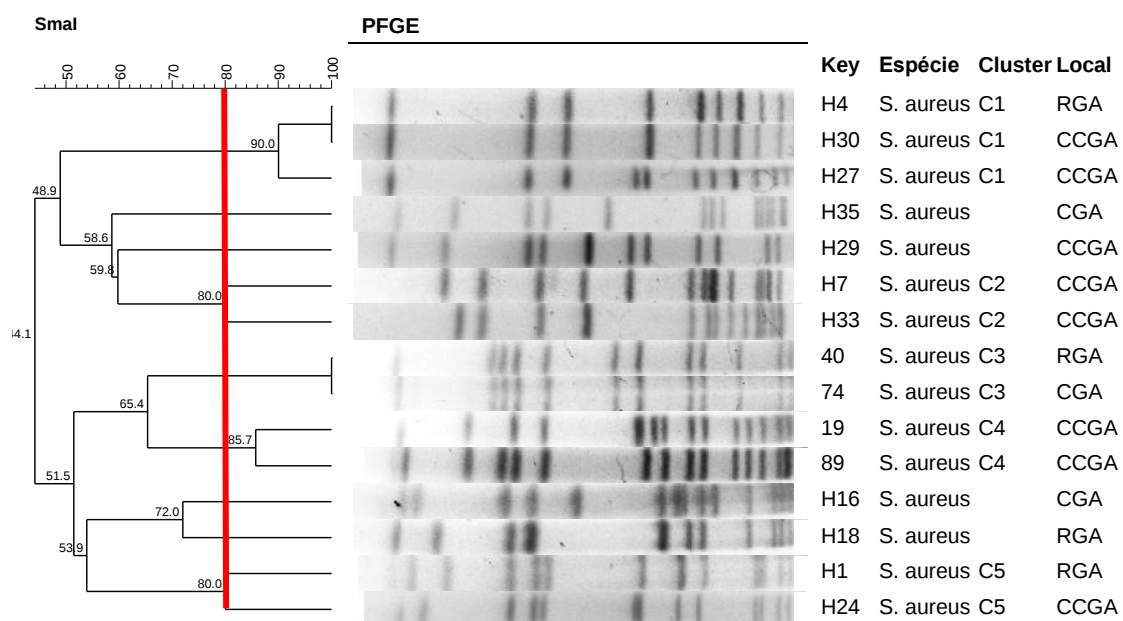


FIGURA 3. Dendrograma criado a partir do padrão eletroforético por PFGE (enzima de restrição *Sma*I) de 15 amostras de *S. aureus* (coeficiente de similaridade de DICE; método de clusterização: UPGMA) de equinos e humanos (identificação – H a frente do número da amostra). A linha vertical vermelha mostra o nível de delineamento de 80%.

Em quatro isolados foi possível determinar padrão eletroforético com uso da enzima *Apa*I, com similaridade de $\geq 97\%$, segundo Rasschaert et al., (2009), bem como uma estirpe de equino (107 – CCGA) e uma de humano (H20 – RGA) (Figura 4). A tipagem realizada pela técnica de MLST, possibilitou identificar que todas apresentaram o complexo clonal (CC) ST398.

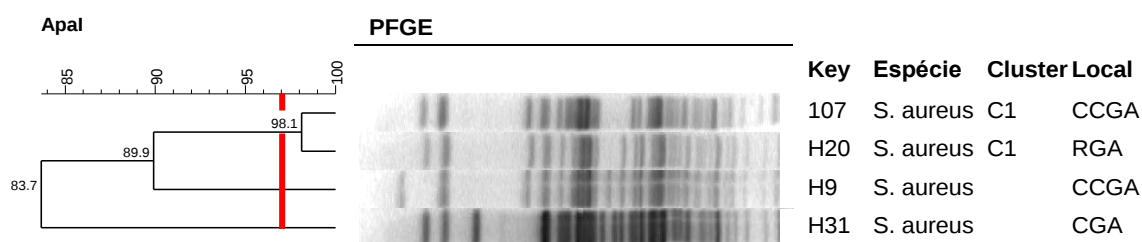


FIGURA 4. Dendrograma criado a partir do padrão eletroforético por PFGE (enzima de restrição *Apa*I) de 4 amostras de *S. aureus* (coeficiente de similaridade de DICE; método de clusterização: UPGMA) de equinos e humanos (identificação – H a frente do número da amostra). A linha vertical vermelha mostra o nível de delineamento de 97%.

A tipagem molecular por PFGE dos isolados de *S. hyicus* de equinos foram determinadas a partir de similaridade $\geq 80\%$. O cluster (C1) foi formado por três isolados da CCGA e uma da CGA, o (C2) por isolados oriundos de um único local (CCGA), e o cluster (C3) por equinos provindos da CCGA e CGA (Figura 3). Todos estes nove equinos eram submetidos a mesmo manejo nutricional (Figura 5).

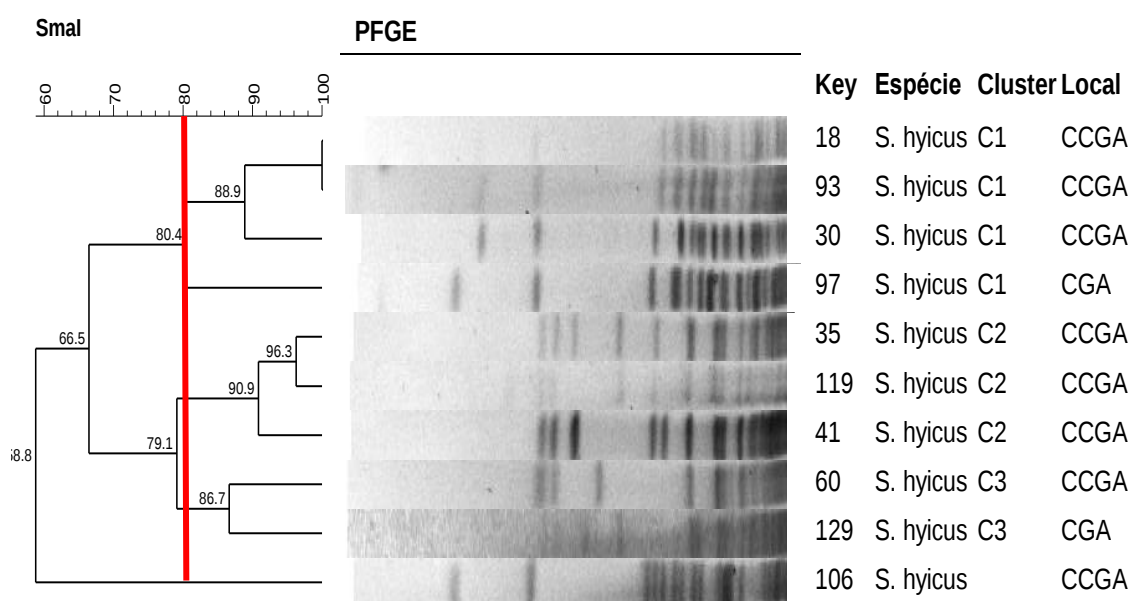


FIGURA 5. Dendrograma criado a partir do padrão eletroforético por PFGE (enzima de restrição *Sma*I) de 10 amostras de *S. hyicus* (coeficiente de similaridade de DICE; método de clusterização: UPGMA) de equinos. A linha vertical vermelha mostra o nível de delineamento de 80%.

A Tabela 6 representa o total de equinos hospitalizados e humanos contactantes do estudo, resultado do isolamento microbiológico, técnicas moleculares e identificação fenotípica dos estafilococos.

TABELA 6. Dados epidemiológicos de equinos hospitalizados e humanos contactantes, segundo isolamento microbiológico e detecção molecular de estafilococos, Botucatu, SP, 2016.

Espécie	Número da amostra	Local (departamento)	Sexo	Idade	Tempo de internamento	Micro-organismo detectado	CLUSTER (PFGE)	MLST
Equino	18	CCGA	M	9m	1d	<i>S. hyicus</i>	C1	*
	19	CCGA	F	5a	1d	<i>S. aureus</i>	C4	*
	20	CCGA	M	2a	*	<i>S. pseudintermedius</i>	*	*
	30	CCGA	M	*	*	<i>S. hyicus</i>	C1	*
	33	CCGA	F	2m	4d	<i>S. pseudintermedius</i>	*	*
	35	CCGA	M	2a	2d	<i>S. hyicus</i>	C2	*
	40	RGA	F	9a	9a	<i>S. aureus</i>	C3	*
	41	CCGA	M	2a	8d	<i>S. hyicus</i>	C2	*
	49	RGA	M	1a	1a	<i>S. schleiferi</i>	*	*
	59	CCGA	F	5m	6d	<i>S. pseudintermedius</i>	*	*
	60	CCGA	F	2a	10d	<i>S. hyicus</i>	C3	*
	74	CGA	M	6a	3d	<i>S. aureus</i>	C3	*
	89	CCGA	F	7a	4d	<i>S. aureus</i>	C4	*
	93	CCGA	M	4a	1d	<i>S. hyicus</i>	C1	*
	97	CGA	F	1a	3h	<i>S. hyicus</i>	C1	*
	103	RGA	M	9a	2d	<i>S. schleiferi</i>	*	*
	106	CCGA	M	4a	2d	<i>S. hyicus</i>	*	*
	107	CCGA	M	1a	7d	<i>S. aureus</i>	C1	ST398
	108	CCGA	F	16a	5d	<i>S. pseudintermedius</i>	*	*
	110	CCGA	M	7a	6d	<i>S. pseudintermedius</i>	*	*
	119	CCGA	M	3a	4h	<i>S. hyicus</i>	C2	*
Humano	121	CGA	M	16a	1a	<i>S. hyicus</i>	*	*
	129	CGA	M	18a	6a	<i>S. hyicus</i>	C3	*
	H1	RGA	M			<i>S. aureus</i>	C5	*
	H4	RGA	M			<i>S. aureus</i>	C1	*
	H7	CCGA	M			<i>S. aureus</i>	C2	*
	H9	CCGA	M			<i>S. aureus</i>	*	ST398
	H16	CGA	M			<i>S. aureus</i>	*	*
	H18	RGA	M			<i>S. aureus</i>	*	*
	H20	RGA	M			<i>S. aureus</i>	C1	ST398
	H24	CCGA	M			<i>S. aureus</i>	C5	*
	H27	CCGA	M			<i>S. aureus</i>	C1	*
	H29	CCGA	F			<i>S. aureus</i>	*	*
	H30	CCGA	M			<i>S. aureus</i>	C1	*
	H31	CGA	F			<i>S. aureus</i>	*	ST398
	H33	CCGA	F			<i>S. aureus</i>	C2	*
	H35	CGA	F			<i>S. aureus</i>	*	

Tempo de internamento = momento da colheita da amostra; CCGA = Clínica Cirúrgica de Grandes Animais; CGA = Clínica de Grandes Animais; RGA = Reprodução de Grandes Animais; M = macho; F = fêmea; a = ano; m = mês; d = dia; h = hora; * = não informado/detectado.

6. DISCUSSÃO

S. aureus é um patógeno reconhecidamente invasivo e oportunista para humanos com crescente aumento de morbimortalidade em hospitais, acometendo principalmente indivíduos com lesão de pele e, ocasionalmente, pessoas saudáveis. O predomínio de *S. aureus* isolado da cavidade nasal de humanos no presente estudo concorda com os achados de Frank et al. (2010), que verificou grande prevalência de *S. aureus* e *S. epidermidis* na narina e axilas de humanos sadios. No entanto, nos humanos amostrados outras bactérias além de *S. aureus* foram também encontradas, competindo e limitando a colonização por *S. aureus*.

O perfil clonal estabelecido pela técnica de PFGE, possibilitou entender melhor a distribuição dos equinos e humanos colonizados por *S. aureus*, principalmente nos casos em que animais e humanos coabitavam no mesmo local, em contato direto, ou estavam a mais de um ano internados (equinos). Apesar de não haver qualquer similaridade clonal entre *S. aureus* de equinos comparado aos de humanos, os clusters formados (C3 e C4) indicaram similaridade entre os isolados de equinos internados no mesmo departamento a mais de um ano, bem como por permanecerem em áreas/piquetes próximos. Esses achados confirmam a proximidade dos animais e o tempo prolongado de interação como fatores de risco para a disseminação e colonização do patógeno (Weese et al., 2005; Malhardo, et al., 2013).

O perfil clonal dos estafilococos de origem humana (C1, C2 e C5) foi caracterizado por médicos veterinários em contato diário no mesmo departamento (C1 e C2 - CCGA) e até mesmo de departamentos distintos, contudo convivendo em mesmo ambiente hospitalar (C5 – RGA e CCGA). Segundo estudo realizado por Weese et al. (2005), a colonização por *S. aureus* resistentes a meticilina em equinos e humanos do mesmo local de trabalho evidencia que o perfil clonal do micro-organismo seja o mesmo entre os equinos, entre os humanos, assim como entre as duas espécies estudadas.

Algumas espécies animais, incluindo os equídeos, são reservatórios de um novo complexo clonal (ST398), isolado na Europa, Ásia e America do Norte (Wulf e Voss, 2008). A transmissão destas estirpes podem ocorrer dentro de fazendas, entre fazendas e até mesmo da propriedades de criação para a população, e são objetos de estudo para melhor entendimento epidemiológico (Rasschaert, et al., 2009). Inicialmente isolados de *S. aureus* de humanos e animais foram tipificados utilizando a enzima de restrição

(*SmaI*) na técnica de PFGE. No entanto, a enzima *SmaI* pode ser bloqueada no sítio de metilação, sendo necessário o uso de outras enzimas, tais como *ApaI*, ou ainda, a utilização de outras técnicas como MLST para a tipagem gênica a partir de genes conservados, como realizado no presente estudo (Witte et al., 2007; Rasschaert, et al., 2009).

Embora os suínos sejam considerados o principal hospedeiro dos *S. aureus* ST398, resistente ou não a meticilina (Belkum et al., 2008), essa linhagem clonal não possui especificidade de hospedeiro, sendo capaz de se tornar endêmica em departamentos de cirurgia de hospitais veterinários (Cuny et al., 2008). Mesmo que, estafilococos ST398 predominem em isolados MRSA (Hermans et al., 2008; Van den Eede, et al., 2009; Van Duijkeren, et al., 2010; Loncaric et al., 2014), é possível detectar este clone em estirpes sensíveis a meticilina (MSSA) obtidos de suínos (Belkum et al., 2008; Kehrenberg et al., 2009; Kadlec e Schwarz, 2010), humanos (Wamel, et al., 2010; Uhlemann, et al., 2013), ovinos (Haarstad et al., 2014) e equinos (Sieber, et al., 2011), capaz de colonizar indivíduos saudáveis e causar infecções, fato que ressalta a virulência da estirpe e capacidade de causar doença em animais e humanos contactantes. Entre 2005 e 2011, Sieber, et al. (2011) na Suíça, relataram o isolamento de 17% (12/70) MSSA, onde 7 equinos apresentaram infecções de pele pós-cirúrgicas e 5 com tromboflebites, o que reforça a capacidade de causar doença mesmo não possuindo gene *mecA*.

No Brasil, a detecção do complexo clonal ST398 em medicina veterinária foi relatada em leite contaminado (Silva et al., 2014), na epidermite exsudativa em suínos (Moreno et al., 2016) e humanos. Ainda, Gales et al. (2015), identificaram um isolado de MSSA com complexo clonal ST398 em paciente humano apresentando o gene de resistência a múltiplos antimicrobianos (*cfr*), o qual ocasionou pneumonia e óbito. No entanto, não há descrição até o momento no Brasil, identificando a espécie equina como fonte de transmissão de ST398 para humanos contactantes. A detecção de ST398 no presente estudo, de uma amostra provinda de equino e três de humanos, indica a possibilidade de que estes indivíduos tenham sido colonizados a partir do contato com uma espécie animal. Tal evidência é reforçada pelo fato de um equino e um humano possuir similaridade clonal de 98,1% (ST398). Este resultado difere dos obtidos por Moodley et al. (2006), onde não foi possível obter qualquer similaridade clonal entre

estafilococos ST398 identificados em equinos e funcionários de um hospital veterinário no Reino Unido.

S. hyicus foi o micro-organismo isolado com maior frequência nos equinos amostrados. Esta espécie de estafilococos comumente é isolada em diversas espécies de animais domésticos, capaz de produzir toxinas esfoliativas, causando quadro de epidermite exudativa, chamada de “doença do suíno gorduroso” (*greasy pig disease*) (Wegener, et al., 1993; Andressen e Ahrens, 2004). *S. hyicus* possui a capacidade de transferir plasmídios de resistência aos antimicrobianos (Andressen e Ahrens, 2004). A relevância do isolamento de *S. hyicus* é demonstrada na pesquisa de Devriese et al. (1985), realizada na Bélgica, década de 1980, a qual avaliou equinos com e sem doenças de pele, e observaram que o patógeno foi responsável por 13% (17/128) dos casos de lesões cutâneas. No mesmo estudo, somente em um equino o micro-organismo foi isolado de pele íntegra e narina, o que sugere maior capacidade de causar infecção do que apenas colonizar a narina e pele dos animais. A frequência de *S. hyicus* (2%) nos equinos amostrados no presente estudo assemelha-se aos resultados de Biberstein et al. (1984), Universidade de Davis (Califórnia) onde obtiveram 1,9% de isolados de incisões cirúrgicas (infecção hospitalar). Em estudo similar, Devriese et al. (1983) identificaram 6,7% (6/90) de *S. hyicus* em equinos com lesões de pele a partir de suabe local.

No Brasil Motta et al. (2011) investigando a etiologia de mastite em éguas, identificaram *S. hyicus* em 2% (11/131) dos casos. Em humanos, *S. hyicus* causa infecções ocasionais, relatado pela primeira vez em humano após mordida de asinino (Osterlund e Nordlund, 1997).

PFGE é considerado um dos métodos mais discriminatórios para a tipagem de estafilococos, particularmente indicado no monitoramento de linhagens associadas a surtos. Ainda, este teste possibilita a diferenciação de linhagens específicas entre diferentes espécies de animais (Shimizu, et al., 1997). A ocorrência de *clusters* relacionados ao *S. hyicus* de amostras nasais provenientes de equinos confirma esta característica do PFGE, identificando maior frequência de isolados provindos da CCGA apresentando similaridade clonal, e menor ocorrência de animais provindos da CGA. A similaridade clonal de estirpes não garante que o micro-organismo possa causar doença, já que outras variáveis como a presença de fatores de virulência e susceptibilidade do hospedeiro também influenciam no estabelecimento da doença clínica (Wegener, et al.,

1993). No entanto, a presença de fatores de virulência aliada a similaridade gênica entre micro-organismos provindos de diferentes hospedeiros, favorece maior probabilidade da ocorrência de surtos. Esses achados possibilitam aos profissionais da área da saúde entenderem melhor a epidemiologia e ecologia deste micro-organismo e considerar diferentes espécies como possíveis hospedeiros, como relatado em estudos realizados com diferentes espécies animais colonizadas e/ou doentes (Wegener et al., 1993; Shimizu et al., 1997).

S. pseudintermedius é mais comumente isolado de cães e gatos (Cohn e Middleton, 2010). No presente estudo, *S. pseudintermedius* foi isolado em 3,8% dos equinos, dos quais um isolado positivo para o gene *mecA* (MRSP), resistente a oxacilina. Esse resultado difere de Gharsa et al. (2015) onde 100% dos isolados de *S. pseudintermedius* foram sensíveis aos antimicrobianos testados exceto uma estirpe resistência a tetraciclina. *S. pseudintermedius* tem sido provavelmente identificado equivocadamente como *S. intermedius* em testes microbiológicos convencionais, devido a similaridade bioquímica entre essas espécies. Neste contexto, Devriese et al. (2005), identificaram *S. pseudintermedius* de lesões cutâneas de equinos, e afirmou a necessidade do uso de técnicas moleculares para a confirmação do diagnóstico desta espécie de patógeno. Na Espanha, Gomez-Sanz et al. (2013) relataram a detecção de *S. aureus* e *S. pseudintermedius* resistentes a meticilina em equinos hospitalizados, com 10,2% (4/39) dos animais positivos para MRSA e um isolado para *S. pseudintermedius* resistente a meticilina (MRSP – Oxacilina).

Na Itália, MRS foi identificado em 1% dos isolados de equinos, dos quais 0,5% MRSP (Malhardo, et al., 2013) corroborando com os achados do presente estudo. Neste mesmo estudo, os demais estafilococos (66/191) dos equinos foram identificados como MRS (CoNS), representados por *Staphylococcus lentus* e *Staphylococcus sciuri*. Os autores atribuem a identificação do gene *mecA* ao fato destes animais apresentarem em comum, o mesmo tipo de uso (cavalos de corrida), com contato estreito com humanos e sujeitos a tratamentos com antibióticos. Salientam ainda a importância dos isolados de CoNS, como problema emergente de saúde animal e de saúde pública (Cohn e Middleton, 2010; Boost et al., 2011; Huber et al., 2011).

A ocorrência de *S. schleiferi* não é comum em equinos. No Brasil foi relatada pela primeira vez por Monteiro et al. (2005) em dois equinos, embora classificadas como *S. schleiferi* subsp. *schleiferi* (subsp. coagulase negativo), em animais com

foliculite bacteriana, sem presença de prurido. Em humanos o primeiro relato foi no final da década de 1980, identificando *S. schleiferi* sp. nov. (coagulase negativo) de amostras de um centro de referência de saúde na França (Freney et al., 1988). O presente estudo identificou *S. schleiferi* subesp. *coagulans*, não relatada em equinos até o momento. Esse micro-organismo foi descrito a primeira vez em animais no início da década de 1990, responsável por causar otite externa em cães (Igimi et al., 1990). Por conseguinte, *S. schleiferi* subesp. *coagulans* (coagulase positivo) tem sido relatado causando otites e/ou piodermites (Igimi et al., 1990; Frank et al., 2003; May et al., 2005; Kawakami et al., 2010) e endocardites (Leung et al., 1999) em cães, bem como descrito em humanos imunocomprometidos (Kumar et al., 2007). *S. schleiferi* pode apresentar o gene *mecA*, como no estudo retrospectivo realizado por Morris et al. (2006), onde 40% (49/122) dos isolados de cães apresentavam o gene de resistência.

A presença do gene *mecA* em diferentes espécies de *Staphylococcus* spp. (*S. pseudintermedius* - CoPS) confirma que *S. aureus* não é a única espécie de estafilococos capaz de apresentar resistência a meticilina (Gill et al., 2005). A virulência de *Staphylococcus* spp. coagulase negativo (CoNS), não deve ser negligenciada em medicina veterinária, como *S. epidermidis*, micro-organismo altamente patogênico e invasivo, incluindo a formação de biofilme (Vuong e Otto, 2002; Li et al., 2009). Essa espécie de CoNS é capaz de inibir a formação de biofilme e competir com a colonização nasal de *S. aureus* em humanos (Iwase et al., 2010). Na China, Li et al. (2009) caracterizaram por técnicas moleculares *S. epidermidis* em humanos e obtiveram 96,2% dos isolados resistentes a meticilina e a eritromicina. Ambos estudos supracitados alertaram para o risco à saúde dos pacientes humanos, bem como profissionais da área da saúde, que incluem funcionários de hospitais veterinários, que mantêm contato direto com equinos.

A crescente resistência bacteriana aos antimicrobianos tem se tornado um problema de saúde pública de âmbito global. É importante ressaltar que vários estudos suportam a evidência que a resistência a meticilina pode ser transmitida entre micro-organismos de equinos e humanos (Ubukata et al., 1989; Weese, 2010). Além deste fato, é notório que animais possam servir como reservatórios de micro-organismos resistentes aos antimicrobianos, agravado pela capacidade de transmissão horizontal de genes de resistência (*mecA*) entre as espécies de estafilococos (Andressen e Ahrens, 2004).

7. CONCLUSÕES

S. hyicus foi a espécie mais prevalente de estafilococos na população equina estudada, e deve ser objeto de estudo nos ambientes hospitalares veterinários.

O principal fator de risco para a colonização do *S. aureus* e *S. hyicus* (de mesmo perfil clonal), nos equinos e humanos amostrados foi o contato interespécie no ambiente hospitalar. Estirpes com mesma similaridade clonal sugerem transmissão interespécie.

A identificação da linhagem ST398 com similaridade clonal interespécie reforça a importância do diagnóstico e controle bacteriano dentro do ambiente hospitalar, devido a capacidade desta estirpe em causar doença em diferentes espécies.

O isolamento de *S. pseudintermedius* (*mecA*) resistentes a oxacilina, confirma que outras espécies de estafilococos também devem ser motivo de preocupação no tocante a resistência dos isolados a meticilina, e que outros estudos devem ser realizadas particularmente com isolados CoNS.

A identificação de *S. schleiferi subesp. coagulans* descrito pela primeira vez em equinos, denota a capacidade do patógeno colonizar a narina desta espécie, bem como a possibilidade de colonizar e causar doença em humanos contactantes.

8. BIBLIOGRAFIA

ANDRESSEN, L.O.; AHRENS, P. A multiplex PCR for detection of genes encoding exfoliative toxins from *Staphylococcus hyicus*. **Journal of Applied Microbiology**. 96:1265-1270, 2004.

AQUINO, G.D.V.; MALUTA, R.P.; ÁVILA, F.A. Prevalence of Methicillin-Resistant Staphylococci on a Farm: Staff can Harbour MRS When Animals Do Not. **Zoonoses and Public Health**. 59:1-3, 2012.

ARCHER, G.L.; NIEMEYER, D.M. Origin and evolution of DNA associated with resistance to methicillin in staphylococci. **Trends in Microbiology**. 2:343-347, 1994.

ARCIOLA, C.R.; BALDASSARRI, L.; MONTANARO, L. Presence of *icaA* and *icaD* genes and slime production in a collection of Staphylococcal strains from catheter-associated infections. **Journal Clinical Microbiol.** 39(6): 2151-2156, 2001.

BELKUM, A.V.; MELLES, D.C.; PEETERS, J.K.; VAN LEEUWEN, W.B.; DUIJKEREN, E.V.; HUIJSDENS, X.W.; VERBRUGH, H.A. Methicillin-resistant and-susceptible *Staphylococcus aureus* sequence type 398 in pigs and humans. **Emerging Infectious Diseases**, 14:479-483, 2008.

BERGSTRÖM, K.; ASPAN, A.; LANDÉN, A.; JOHNSTON, C.; GRÖNLUND-ANDERSSON, U. The first nosocomial outbreak of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in horses in Sweden. **Acta Veterinaria Scandinavica**. 54:1-9, 2012a.

BERGSTRÖM, K.; NVMAN, G.; WIDGREN, S.; JOHNSTN, C; GRÖNLUND-ANDERSSON, U.; RANSJÖ, U. Infection prevention and control interventions in the first outbreak of methicillin -resistant *Staphylococcus aureus* infections in an equine hospital in Swede. **Acta Veterinaria Scandinavica**. 2012b.

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

BHAKDI, S.; TRANUM-JENSEN, J. Alpha-toxin of *Staphylococcus aureus*. **Microbiological Reviews**. 55:733-751, 1991.

BOOST, M. V.; SO, S. Y. C.; PERRETEN, V. Low Rate of Methicillin-resistant Coagulase-positive Staphylococcal Colonization of Veterinary Personnel in Hong Kong. **Zoonoses and Public Health**. 58:36-40, 2011.

BOURN, J. The Management and Control of Hospital Acquired Infection in Acute NHS Trusts in England. **National Audit Office Press Notice HC 230 1999/2000**. 2000.

CASEY, L.C.; BALK, R.A.; BONE, R.C. Plasma cytokine and endotoxin levels correlate with survival in patients with the sepsis syndrome. **Annals of Internal Medicine**. 119:771-778, 1993.

CASEWELL, M.W. Epidemiology and control of the 'modern' methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. **Journal of Hospital Infection**. 7:1-11, 1986.

CASEWELL M.W.; HILL R.L.R. The carrier state: methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. **Journal Antimicrobial Chemotherapy**. 18:1-12, 1986b.

CHEUNG, A.L.; FISCHETTI, V.A. The role of fibrinogen in staphylococcal adherence to catheters in vitro. **Journal of Infectious Diseases**. 161: 1177-1186, 1990.

CHEUNG, A.L.; EBERHARDT, K.J.; CHUNG, E.; YEAMAN, M.R.; SULLAM, P.M.; RAMOS, M.; BAYER A.S. Diminished virulence of a *sa* agr mutant of *Staphylococcus aureus* in the rabbit model of endocarditis. **Journal Clinical Investigation**. 94:1815-1822, 1994.

CHESNEY, P.J.; DAVIS, J.P.; PURDY, W.K.; WAND, P.J.; CHESNEY, R.W. Clinical manifestations of toxic shock syndrome. **JAMA**. 246:741-748, 1981.

CHIPPAUX, J. P. The development and use of immunotherapy in Africa. **Toxicon**. 36:1503-1506, 1998.

CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing: 24th informational supplement (M100-S24). Wayne, PA: CLSI. 2014.

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

COSTA, G.M.D.; PEREIRA, U.D.P.; CUSTÓDIO, D.A.D.C.; SILVA, N.D. Caracterização de *Staphylococcus* coagulase-positiva utilizando plasmas de diferentes espécies animais. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**. 70, 2011.

COUTO, I., S. PEREIRA, M. MIRAGAIA, I.S. SANCHES, H. LENCASTRE. Identification of clinical staphylococcal isolates from humans by Internal Transcribed Spacer PCR. I. **Clin Microbiol**. 39:3099–3103, 2001.

CUNHA, M.L.R.S.; PERESI, E.; CALSOLARI, R.A.O.E.; ARAÚJO, J.P. Detection of Enterotoxins genes in coagulase-negative *Staphylococci* isolated from foods. **Brazilian Journal Microbiology**. 37:64-69, 2006.

CUNY, C.; KUEMMERLE, J.; STANEK, C.; WILLEY, B.; STROMMINGER, B.; WITTE, W. Emergence of MRSA infections in horses in a veterinary hospital: strain characterisation and comparison with MRSA from humans. **Eurosurveillance**. 11:44-47, 2006.

CUNY, C.; STROMMINGER, B.; WITTE, W.; STANEK, C. Clusters of infections in horses with MRSA ST1, ST254, and ST398 in a veterinary hospital. **Microbial Drug Resistance**. 14:307-310, 2008.

DEAN, A.G.; SULLIVAN, K.M.; SOE, M.M. OpenEpi: Open Source Epidemiologic Statistics for Public Health, Versão. www.OpenEpi.com, atualizado 04/05/2015, acessado 08/09/2015.

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

DEVRIESE, L.A.; VLAMINCK, K.; NUYTTEN, J.; KEERSMAECKER, P. *Staphylococcus hyicus* in skin lesions of horses. **Equine veterinary journal**. 15:263-265, 1983.

DEVRIESE, L.A.; NZUAMBE, D.; GODARD, C. Identification and characteristics of staphylococci isolated from lesions and normal skin of horses. **Veterinary Microbiology**. 10:269-277, 1985.

DEVRIESE, L.A.; VANCANNEYT, M.; BAELE, M.; VANEECHOUTTE, M.; DE GRAEF, E.; SNAUWAERT, C.; HAESEBROUCK, F. *Staphylococcus pseudintermedius* sp. nov., a coagulase-positive species from animals. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**. 55:1569-1573, 2005.

DINKOVIC, D.; FULLER, E.R.; SHORE, K.P.; HOLLAND, D.J.; ELLIS-PEGLER, R. Clindamycin treatment of *Staphylococcus aureus* expressing inducible clindamycin resistance. **Journal Antimicrobial Chemotherapy**. 48:315–316, 2001.

ENRIGHT, M.C.; DAY, N.P.J.; DAVIES, C.E.; PEACOCK, S.J.; SPRATT, B.G. Multilocus Sequence Typing for Characterization of Methicillin- Resistant and Methicillin-Susceptible Clones of *Staphylococcus aureus*. **Journal Clinical Microbiology**. 38(3):1008–1015, 2000.

ENRIGHT, M.C.; ROBINSON, D.A.; RANDLE, G.; FEIL, E.J.; GRUNDMANN, H.; SPRATT, B.G. The evolutionary history of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). **National Academy of Sciences**. 99:7687–7692, 2002.

FANG, G.; KEYS, T.F.; GENTRY, L.O.; HARRIS, A.A.; RIVERA, N.; GETZ, K.; VICTOR, L.Y. Prosthetic valve endocarditis resulting from nosocomial bacteremia: a prospective, multicenter study. **Annals of Internal Medicine**. 119:560-567, 1993.

FATTOM, A.I.; SARWAR, J.; ORTIZ, A.; NASO, R. A *Staphylococcus aureus* capsular polysaccharide (CP) vaccine and CP-specific antibodies protect mice against bacterial challenge. **Infection and Immunity**. 64:1659-1665, 1996.

FERNÁNDEZ-GUERRERO, M.L.; VERDEJO, C.; AZOFRA, J.; DE GÓRGOLAS, M. Hospital-acquired infectious endocarditis not associated with cardiac surgery: an emerging problem. **Clinical Infectious Diseases**. 20:16-23, 1995.

FRANK, D. N.; FEAZEL, L. M.; BESSESEN, M. T.; PRICE, C. S.; JANOFF, E. N.; PACE, N. R. The human nasal microbiota and *Staphylococcus aureus* carriage. **PloS One**. 5:10598, 2010.

FRANK, L.A.; KANIA, S.A.; HNILICA, K.A.; WILKES, R.P.; BEMIS, D.A. Isolation of *Staphylococcus schleiferi* from dogs with pyoderma. **Journal of the American Veterinary Medical Association**. 222:451-454, 2003.

FRENEY, J.; BRUN, Y.; BES, M.; MEUGNIER, H.; GRIMONT, F.; GRIMONT, P.A.; FLEURETTE, J. *Staphylococcus lugdunensis* sp. nov. and *Staphylococcus schleiferi* sp. nov., two species from human clinical specimens. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**. 38:168-172, 1988.

FRIDKIN, S.K.; HAGEMAN, J.; MCDOUGAL, L. K.; MOHAMMED, J.; JARVIS, W.R.; PERL, T.M.; TENOVER, F.C. Vancomycin-Intermediate *Staphylococcus aureus* Epidemiology Study Group. (2003). Epidemiological and microbiological characterization of infections caused by *Staphylococcus aureus* with reduced susceptibility to vancomycin, United States, 1997–2001. **Clinical Infectious Diseases**. 36:429-439, 2003.

GALES, A.C.; DESHPANDE, L.M.; DE SOUZA, A.G.; PIGNATARI, A.C.C.; MENDES, R.E. MSSA ST398/t034 carrying a plasmid-mediated Cfr and Erm (B) in Brazil. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**. 70:303-305, 2015.

GHARSA, H.; SLAMA, K. B.; GÓMEZ-SANZ, E.; GÓMEZ, P.; KLIBI, N.; ZARAZAGA, M.; BOUDABOUS, A.; TORRES, C. Characterisation of nasal *Staphylococcus delphini* and *Staphylococcus pseudintermedius* isolates from healthy donkeys in Tunisia. **Equine Veterinary Journal**. 47:463-466, 2015.

GILL, S.R.; FOUTS, D.E.; ARCHER, G.L.; MONGODIN, E.F.; DEBOY, R.T.; RAVEL, J.; FRASER, C.M. Insights on Evolution of Virulence and Resistance from the Complete Genome Analysis of an Early Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Strain and a Biofilm-Producing Methicillin-Resistant *Staphylococcus epidermidis* Strain. **Journal of Bacteriology**. 187:2426–2438, 2005. <http://doi.org/10.1128/JB.187.7.2426-2438.2005>.

GÓMEZ-SANZ, E.; SIMÓN, C.; ORTEGA, C.; GÓMEZ, P.; LOZANO, C.; ZARAZAGA, M.; TORRES, C. First Detection of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* ST398 and *Staphylococcus pseudintermedius* ST68 from Hospitalized Equines in Spain. **Zoonoses and Public Health**. 61:192-201, 2014.

HAARSTAD, A.C.; EISENSCHENK, M.C.; HEINRICH, N.A.; WEESE, J.S.; MCKEEVER, P.J. Isolation of bacterial skin flora of healthy sheep, with comparison

between frequent and minimal human handling. **Veterinary Dermatology**. 25(3), 215-e56, 2014.

HAMILL, R.J.; VANN, J.M.; PROCTOR, R.A. Phagocytosis of *Staphylococcus aureus* by cultured bovine aortic endothelial cells: model for postadherence events in endovascular infections. **Infection and Immunity**. 54:833-836, 1986.

HARRIS, T.O.; GROSSMAN, D.; KAPPLER, J.W.; MARRACK, P.; RICH, R.R.; BETLEY, M.J. Lack of complete correlation between emetic and T-cell-stimulatory activities of staphylococcal enterotoxins. **Infection and Immunity**. 61:3175-3183, 1993.

HARRISON, E.M.; WEINER, L.A.; HOLDEN, M.T.G.; WELCH, J.J.; WILSON, K.; MORGAN, F.J.E.; HARRIS, S.R.; LOEFFLER, A.; BOAG, A.K.; PEACOCK, S.J.; PATERSON, G.K.; WALLER, A.S.; PARKHILL, J.; HOLMES, M.A. A Shared Population of Epidemic Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* 15 Circulates in Humans and Companion Animals. **American Society For Microbiology**. 5, 2014.

HERMANS, K.; LIPINSKA, U.; DENIS, O.; DEPLANO, A.; STRUELENS, M.; NEMATİ, M.; HAESBROUCK, F. MRSA clone ST398-SCCmec IV as a cause of infections in an equine clinic. **Vlaams Diergeneeskundig Tijdschrift**, 77:429-433, 2008.

HIRAMATSU, K.; SUZUKI, E.; TAKAYAMA, H.; KATAYAMA, Y.; YOKOTA, T. Role of penicillinase plasmids in the stability of the *mecA* gene in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**. 34:600–604, 1990.

HIRAMATSU, K.; ARITAKA, N.; HANAKI, H.; KAWASAKI, S.; HOSODA, Y.; HORI, S.; FUKUCHI, Y.; KOBAYASHI, I. Dissemination in Japanese hospitals of strains of *Staphylococcus aureus* heterogeneously resistant to vancomycin. **The Lancet**. 350:670-1673, 1997.

HIRAMATSU, K. Vancomycin-resistant *Staphylococcus aureus*: a new model of antibiotic resistance. **The Lancet Infectious Diseases**. 1:147-155, 2001.

HUBER, H.; ZIEGLER, D.; PFLÜGER, V.; VOGEL, G.; ZWEIFEL, C.; STEPHAN, R. Prevalence and characteristics of methicillin-resistant coagulase-negative

staphylococci from livestock, chicken carcasses, bulk tank milk, minced meat, and contact persons. **BMC Veterinary Research**. 7:1, 2011.

IGIMI, S.; TAKAHASHI, E.; MITSUOKA, T. *Staphylococcus schleiferi* subsp. coagulans subsp. nov., isolated from the external auditory meatus of dogs with external ear otitis. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**. 40:409-411, 1990.

IWASE, T.; UEHARA, Y.; SHINJI, H.; TAJIMA, A.; SEO, H.; TAKADA, K.; AGATA, T.; MIZUNOE, Y. *Staphylococcus epidermidis* Esp inhibits *Staphylococcus aureus* biofilm formation and nasal colonization. **Nature**. 465:346-349, 2010.

JAMROZY, D. M.; FIELDER, M. D.; BUTAYE, P.; COLDHAM, N. G. Comparative Genotypic and Phenotypic Characterisation of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* ST398 Isolated from Animals and Humans. **Journal Pone**. 2012.

JI, G.; BEAVIS, R.C.; NOVICK, R.P. Cell density control of staphylococcal virulence mediated by an octapeptide pheromone. **Proceedings National Academy of Science USA**. 92:12055-12059, 1995.

JOHNSON, W.M.; TYLER, S.D.; EWAN, E.P.; ASHTON, F.E.; POLLARD, D.R.; ROZEE, K.R. Detection of Genes for Enterotoxins, Exfoliative Toxins, and Toxic Shock Syndrome Toxin 1 in *Staphylococcus aureus* by the Polymerase Chain Reaction. **Journal Clinical Microbiology**. 29(3):426-430, 1991.

KADLEC, K.; SCHWARZ, S. Identification of the novel dfrK-carrying transposon Tn559 in a porcine methicillin-susceptible *Staphylococcus aureus* ST398 strain. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**. 54:3475-3477, 2010.

KARCHMER, A.W. *Staphylococcus aureus* and vancomycin: the sequel. **Annals of Internal Medicine**. 115:739-741, 1991.

KAWAKAMI, S.; MURAYAMA, N.; NAGATA, M.; NISHIFUJI, K.; IWASAKI, T.; FUKATA, T. Antimicrobial susceptibility and methicillin resistance in *Staphylococcus pseudintermedius* and *Staphylococcus schleiferi* subsp. coagulans isolated from dogs with pyoderma in Japan. **Journal of Veterinary Medical Science**. 72:1615-1619, 2010.

KEHRENBURG, C.; CUNY, C.; STROMMINGER, B.; SCHWARZ, S.; WITTE, W. Methicillin-resistant and-susceptible *Staphylococcus aureus* strains of clonal lineages ST398 and ST9 from swine carry the multidrug resistance gene cfr. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**. 53:779-781, 2009.

KONEMAN, E.W.; ALLEN, S.D.; JANDA, W.M.; SCHRECKENBERGER, P.C.; WINN J.R. W.C. **Color Atlas and Textbook of Diagnostic Microbiology**, 5th ed., Lippincott, Philadelphia, + 1395p, 1997.

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

KUMAR, D.; CAWLEY, J.J.; IRIZARRY- ALVARADO, J.M.; ALVAREZ, A.; ALVAREZ, S. Case of *Staphylococcus schleiferi* subspecies coagulans endocarditis and metastatic infection in an immune compromised host. **Transplant Infectious Disease**. 9:336-338, 2007.

LANGE, C.; CARDOSO, M.; SENCZEK, D.; SCHWARZ, S. Molecular subtyping of *Staphylococcus aureus* isolates from cases of bovine mastitis in Brazil. **Veterinary Microbiology**. 67:127-141, 1999.

LEE, J.C.; PARK, J.S.; SHEPHERD, S.E.; CAREY, V.; FATTOM, A. Protective efficacy of antibodies to the *Staphylococcus aureus* type 5 capsular polysaccharide in a modified model of endocarditis in rats. **Infection and Immunity**. 65:4146-4151, 1997.

LEUNG, M.J.; NUTTALL, N.; MAZUR, M.; TADDEI, T.L.; MCCOMISH, M.; PEARMAN, J.W. Case of *Staphylococcus schleiferi* endocarditis and a simple scheme to identify clumping factor-positive staphylococci. **Journal of Clinical Microbiology**. 37:3353-3356, 1999.

LI, M.; WANG, X.; GAO, Q.; LU, Y. Molecular characterization of *Staphylococcus epidermidis* strains isolated from a teaching hospital in Shanghai, China. **Journal of Medical Microbiology**. 58:456–461, 2009.

LIN, Y.; BARKER, E.; KISLOW, J.; KALDHNE, P.; STEMPER, M.E.; PANTRANGI, M.; MOORE, F.M.; HALL, M.; FRITSCHKE, T.R.; NOVICKI, T.; FOLEY, S.L.; SHUKA, S.K. Evidence of Multiple Virulence Subtypes in Nosocomial and

Community-Associated MRSA Genotypes in Companion Animals from the Upper Midwestern and Northeastern United States. **Clinical Medicine & Research**. 9:7-16, 2011.

LINA, G.; PIÉMONT, Y.; GODAIL-GAMOT, F.; BES, M.; PETER, M.O.; GAUDUCHON, V.; VANDENESCH, F.; ETIENNE, J. Involvement of Panton-Valentine leukocidin-producing *Staphylococcus aureus* in primary skin infections and pneumonia. **Clinical Infections Diseases**. 29:1128-1132, 1999.

LINDSAY, J.A.; HOLDEN, M.T.G. Understanding the rise of the superbug: investigation of the evolution and genomic variation of *Staphylococcus aureus*. **Functional & Integrative Genomics**. 6:186-201, 2006.

LINDSAY, J.A. Genomic variation and evolution of *Staphylococcus aureus*. **International Journal of Medical Microbiology**. 300:98-103, 2010.

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

LONCARIC, I.; KÜNZEL, F.; LICKA, T.; SIMHOFER, H.; SPERGSE, J.; ROSENGARTEN, R. Identification and characterization of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) from Austrian companion animals and horses. **Veterinary Microbiology**, 168:381-387, 2014.

LUNA, C.M.; RODRIGUEZ-NORIEGA, E.; BAVESTRELLO, L.; GOTUZZO, E. Tratamento de *Staphylococcus aureus* resistente à metilina na América Latina. **Brazilian Journal of Infectious Diseases**. 14:2010.

MACDOUGAL L.K.; STEWARD C.D.; KILLGORE G.E.; CHAITRAM, J.M.; MCALLISTER S.K.; TENOVER F.C. Pulsed-Field Gel Eletroforesis Typing of oxacillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates from the United States: Establishing a National Database. **Journal Clinical Microbiology**. 41:5113-5120, 2003.

MAJCHERCZYK, P.A.; RUBLI, E.; HEUMANN, D.; GLAUSER, M.P.; MOREILLON, P. Teichoic acids are not required for *Streptococcus pneumoniae* and

Staphylococcus aureus cell walls to trigger the release of tumor necrosis factor by peripheral blood monocytes. **Infection and Immunity**. 71:3707-3713, 2003.

MALLARDO, K.; NIZZA, S.; FIORITO, F.; PAGNINI, U.; DE MARTINO, L. A comparative evaluation of methicillin-resistant staphylococci isolated from harness racing-horses, breeding mares and riding-horses in Italy. **Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine**. 3:169-173, 2013.

MALUTA, R.P.; STELLA, A.E.; RIGOBELLO, E.C.; OLIVEIRA, A.C.D.; LEMOS, F.; VICTOR, M.; ÁVILA, F.A.D. Prevalence and antimicrobial resistance patterns of methicillin-resistant staphylococci (MRS) isolated in a Veterinary Teaching Hospital in Brazil. **African Journal of Microbiology Research**. 4:1879-1883, 2010.

MARRACK, P.; KAPPLER, J. The staphylococcal enterotoxins and their relatives. **Science**. 248:705-711, 1990.

MARCONI, C.; CUNHA, M.L.R.S.; ARAÚJO, JR J.P.; RUGOLO, L.M.S.S. Standardization of the PCR technique for the detection of delta toxin in *Staphylococcus* spp. **Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases**. 11:117-128, 2005.

MARTINO, L. D.; LUCIDO, M.; MALLARDO, K.; FACELLO, B.; IOVANE, G.; PAGNINI, G.; TUFANO, M. A.; CATALANOTTI, P. Methicillin-Resistant Staphylococci Isolated from Healthy Horses and Horse Personnel in Italy. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**. 22:77-82, 2010.

MARTINEAU F.; PICARD F.J.; ROY P.H.; OUELLETTE M.; BERGERON M.G. Species-specific and ubiquitous-DNA-based assays for rapid identification of *Staphylococcus aureus*. **Journal Clinical Microbiology**. 36:618-23, 1998.

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

MCDUGAL, L.K.; STEWARD, C.D.; KILLGORE, G.E.; CHAITRAM, J.M.; MCALLISTER, S.K.; TENOVER, F.C. Pulsed-field gel electrophoresis typing of oxacillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates from the United States: establishing a national database. **Journal of Clinical Microbiology**. 41:5113-5120, 2003.

MELLMANN A.; WENIGER T.; BERSSENBRÜGGE C.; ROTHGÄNGER J.; SAMMETH M.; STOYE J.; HARMSSEN D. Based Upon Repeat Pattern (BURP): an algorithm to characterize the long-term evolution of *Staphylococcus aureus* populations based on spa polymorphisms. **BMC Microbiology**. 7:98-102, 2007.

MELZER, M.; EYKYN, S.J.; GRANSDEN, W.R.; CHINN, S. Is methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* more virulent than methicillin-susceptible *S. aureus*? A comparative cohort study of British patients with nosocomial infection and bacteremia. **Clinical Infectious Diseases**. 37:1453-1460, 2003.

MICHEL, M.; GUTMANN, L. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and vancomycin-resistant enterococci: therapeutic realities and possibilities. **The Lancet**. 349:1901-1906, 1997.

MILHEIRIÇO C.; OLIVEIRA D.C.; LENCASTRE H. Update to the Multiplex PCR Strategy for Assignment of mec Element Types in *Staphylococcus aureus*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**. 51:3374–3377, 2007.

MONTEIRO, G.A.; DE SOUZA, M.V.; CONCEIÇÃO, L.G.; DE LACERDA BALBI, C.; BORBA, R.; MOREIRA, M.A.S.; MOREIRA, J.D.C.L. Diagnóstico das dermatoses alopecias multifocais em eqüinos da Zona da Mata mineira do Brasil. **Veterinária e Zootecnia**. 15:139-149, 2005.

MOODLEY, A.; STEGGER, M.; BAGCIGIL, A.F.; BAOTISTE, K.E.; LOEFFLER, A.; LLOYD, D.; WILLIAM, N.J.; LEONARD, N.; ABBOTT, Y.; SKOV, R.; GUARDABASSI, L. spa typing of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolated from domestic animals and veterinary staff in the UK and Ireland. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**. 58:1118-1123, 2006.

MORENO, L.Z.; DUTRA, M.C.; MORENO, M.; FERREIRA, T.S.; DA SILVA, G.F.; MATAJIRA, C.E.; MORENO, A.M. Vancomycin-intermediate livestock-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* ST398/t9538 from swine in Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, 111:659-661, 2016.

MORGAN, M. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and animals: zoonosis or humanosis? **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**. 62:1181-1187, 2006.

MORRIS, D.O.; ROOK, K.A.; SHOFER, F.S.; RANKIN, S.C. Screening of *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus intermedius*, and *Staphylococcus schleiferi* isolates obtained from small companion animals for antimicrobial resistance: a retrospective review of 749 isolates (2003–04). **Veterinary Dermatology**. 17:332-337, 2006.

MOTTA, R.G.; RIBEIRO, M.G.; LANGONI, H.; MOTTA, D.G.; FRANCO, M.M.J.; ALMEIDA, A.C.S.; PERROTI, I.B.M.; LISTONI, F.J.P.; MENOZZI, B.D. Estudo dos métodos de rotina diagnóstica de mastite no leite de éguas. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**. 63:1028-1032, 2011.

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

MURCHAN, S.; KAUFMANN, M.E.; DEPLANO, A.; DE RYCK, R.; STRUELENS, M.; ZINN, C. E.; FUSSING, V.; SALMENLINNA, S.; VUOPIO-VARKILA, J.; EL SOLH, N.; CUNY, C.; WITTE, W.; TASSIOS, P.T.; LEGAKIS, N.; VAN LEEUWEN, W.; VAN BELKUM, A.; VINDEL, A.; LACONCHA, I.; GARAIZAR, J.; HAEGGMAN, S.; OLSSON-LILJEQUIST, B.; RANSJO, U.; COOMBES, G.; COOKSON, B. Harmonization of pulsed-field gel electrophoresis protocols for epidemiological typing of strains of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: a single approach developed by consensus in 10 European laboratories and its application for tracing the spread of related strains. **Journal of clinical microbiology**. 41:1574-1585, 2003.

MUSHER, D.M.; LAMM, N.; DAROUICHE, R.O.; YOUNG, E.J.; HAMILL, R.J.; LANDON, G.C. The current spectrum of *Staphylococcus aureus* infection in a tertiary care hospital. **Medicine**. 73:186-208, 1994.

National Committee for Clinical Laboratory Standards. Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically. Approved standards. NCCLS document M7-A4. **National Committee for Clinical Laboratory Standards**, Wayne, Pa. 1997.

NOBLE, W.C.; VALKENBURG, H.A.; WOLTERS, C.H. Carriage of *Staphylococcus aureus* in random samples of a normal population. **Journal of Hygiene**. 65:567-573, 1967.

NOVICK, R.P. Autoinduction and signal transduction in the regulation of staphylococcal virulence. **Molecular Microbiology**. 48:1429-1449, 2003.

OGAWA, S. K.; YURBERG, E. R.; HATCHER, V. B.; LEVITT, M. A.; LOWY, F. D. Bacterial adherence to human endothelial cells in vitro. **Infection Immunity**. 50:218-241, 1985.

ÖSTERLUND, A.; NORDLUND, E. Wound infection caused by *Staphylococcus hyicus* subspecies *hyicus* after a donkey bite. **Scandinavian Journal of Infectious Diseases**. 29:95-95, 1997.

OKUMA, K.; IWAKAMA, K.; TURNIDGE, J. D.; GRUBB, W. B.; BELL, J. M.; O'BRIEN, F. G.; Geoffrey, W. C.; John W. P.; Fred, C. T.; Maria, K.; Chuntima, T.; TERUYO, I.; KEIICHI, H. Dissemination of new Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clones in the community. **Journal Clinical Microbiology**. 40:4289-4294, 2002.

OLIVEIRA, D.C.; LENCASTRE, H. Multiplex PCR strategy for rapid identification of structural types and variants of the *mec* element in Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*. **Antimicrobiology Agents Chemotherapy**. 46:2155-61, 2002.

PATTI, J.M.; BREMELL, T.; KRAJEWSKA-PIETRASI, D.; ABDELNOUR, A.; TARKOWSKI, A.; RYDÉN, C.; HÖÖK, M. The *Staphylococcus aureus* collagen adhesin is a virulence determinant in experimental septic arthritis. **Infection and Immunity**. 62:152-161, 1994.

PULVIRENTI, J.J.; KERNS, E.; BENSON, C.; LISOWSKI, J.; DEMARAIS, P.; WEINSTEIN, R.A. Infective endocarditis in injection drug users: importance of human immunodeficiency virus serostatus and degree of immunosuppression. **Clinical Infectious Diseases**. 22:40-45, 1996.

RAO, G.G. Should clindamycin be used in treatment of patients with infections caused by erythromycin-resistant staphylococci? **Journal Antimicrobial Chemotherapy**. 45:715–716, 2000.

RASSCHAERT, G.; VANDERHAEGHEN, W.; DEWAELE, I.; JANEŽ, N.; HUIJSDENS, X.; BUTAYE, P.; HEYNDRICKX, M. Comparison of fingerprinting methods for typing methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* sequence type 398. **Journal of Clinical Microbiology**. 47:3313-3322, 2009.

ROHDE, H.; BURANDT, E.C.; SIEMSEN, N.; FROMMELT, L.; BURDELSKI, C.; WURSTER, S.; SCHERPE, S.; DAVIES, A.P.; HARRIS, L.G.; HORSTKOTTE, M.A.; KNOBLOCH, J.K.; RAGUNATH, C.; KAPLAN, J.B.; MACK, D. Polysaccharide intercellular adhesin or protein factors in biofilm accumulation of *Staphylococcus epidermidis* and *Staphylococcus aureus* isolated from prosthetic hip and knee joint infections. **Biomaterials**. 28:1711-1720, 2007.

SANDRE, R.M.; SHAFRAN, S.D. Infective endocarditis: review of 135 cases over 9 years. **Clinical Infectious Diseases**. 22:276-286, 1996.

SANFORD, M.D.; WIDMER, A.F.; BALE, M.J.; JONES, R.N.; WENZEL, R.P. Efficient detection and long-term persistence of the carriage of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. **Clinical Infectious Diseases**. 19:1123-1128, 1994.

SEGUIN, J.C., WALKER, R.D., CARON, J.P., KLOOS, W.E., GEORGE, C.G., HOLLIS, R.J.; PFALLER, M.A. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* outbreak in a veterinary teaching hospital: potential human-to-animal transmission. **Journal of Clinical Microbiology**. 37:1459-1463, 1999.

SHIMIZU, A.; KLOOS, W.E.; BERKHOFF, H.A.; GEORGE, C.G.; BALLARD, D.N. Pulsed-field gel electrophoresis of *Staphylococcus hyicus* and *Staphylococcus chromogenes* genomic DNA and its taxonomic, epidemiologic and ecologic applications in veterinary medicine. **Journal of Veterinary Medical Science**. 59:443-450, 1997.

SHINEFIELD, H.; BLACK, S.; FATTOM, A.; HORWITH, G.; RASGON, S.; ORDONEZ, J.; YEOH, H.; LAW, D.; ROBBINS, J.B.; SCHNEERSON, R.; MUENZ, L.; NASO, R. Use of a *Staphylococcus aureus* conjugate vaccine in patients receiving hemodialysis. **New England Journal of Medicine**. 346:491-496.

SHOPSIN B.; GOMEZ M.; MONTGOMERY S.O.; SMITH D.H.; WADDINGTON M.; DODGE D.E. Evaluation of protein A gene polymorphic region DNA sequencing

for typing of *Staphylococcus aureus* strains. **Journal Clinical Microbiology**. 37:3556–3563, 1999.

SHUTER, J.; HATCHER, V.B.; LOWY, F.D. *Staphylococcus aureus* binding to human nasal mucin. **Infection and Immunity**. 64:310-318, 1996.

SIBERRY, G.K.; TEKLE, T.; CARROLL, K.; DICK, J. Failure of clindamycin treatment of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* expressing inducible clindamycin resistance in vitro. **Clinical Infectious Disease**. 37:1257–1260, 2003.

SIEBER, S.; GERBER, V.; JANDOVA, V.; ROSSANO, A.; EVISON, J.M.; PERRETEN, V. Evolution of multidrug-resistant *Staphylococcus aureus* infections in horses and colonized personnel in an equine clinic between 2005 and 2010. **Microbial Drug Resistance**, 17:471-478, 2011.

SILVA, N.C.C.; GUIMARÃES, F.F.; MANZI, M.P.; JÚNIOR, A.F.; GÓMEZ- SANZ, E.; GÓMEZ, P.; TORRES, C. Methicillin- resistant *Staphylococcus aureus* of lineage ST398 as cause of mastitis in cows. **Letters in Applied Microbiology**. 59:665-669, 2014.

SPIKA, J.S.; PETERSON, P.K.; WILKINSON, B.J.; HAMMERSCHMIDT, D.E.; VERBRUGH, H.A.; VERHOEF, J.; QUIE, P.G. Role of peptidoglycan from *Staphylococcus aureus* in leukopenia, thrombocytopenia, and complement activation associated with bacteremia. **Journal of Infectious Diseases**. 146:227-234, 1982.

STRAUB, J.A.; HERTEL, C.; HAMMES, W.P. A23S rDNA-targeted polymerase chain reaction-based sstem for detection of *Staphylococcus aureus* in meat starter cultures and dairy products. **Journal of Food Protection**.62:1150-1156, 1999.

TAKEI, S; ARORA, Y.K.; WALKER, S.M. Intravenous immunoglobulin contains specific antibodies inhibitory to activation of T cells by staphylococcal toxin superantigens. **Journal of Clinical Investigation**. 91:602, 1993.

TIMMERMAN, C.P.; MATTSSON, E.; MARTINEZ-MARTINEZ, L.; DE GRAAF, L.; VAN STRIJP, J.A.; VERBRUGH, H.A.; FLEER, A. Induction of release of tumor necrosis factor from human monocytes by staphylococci and staphylococcal peptidoglycans. **Infection and Immunity**. 61:4167-4172, 1993.

TOMPKINS, D.C.; HATCHER, V.B.; PATEL, D.; ORR, G.A.; HIGGINS, L.L.; LOWY, F.D. A human endothelial cell membrane protein that binds *Staphylococcus aureus* in vitro. **Journal of Clinical Investigation**. 85:1248, 1990.

UBUKATA, L.; NONOGUCHI, R.; MATSUHASHI, M.; KONNO, M. Expression and Inducibility in *Staphylococcus aureus* of the *mecA* Gene, Which Encodes a Methicillin-Resistant *S. aureus*-Specific Penicillin-Binding Protein. **Journal of Bacteriology**. 171:2882-2885, 1989.

UHLEMANN, A.C.; HAER, C.; MIKO, B.A.; SOWASH, M.G.; SULLIVAN, S.B.; SHU, Q.; LOWY, F. D. Emergence of sequence type 398 as a community-and healthcare-associated methicillin-susceptible *Staphylococcus aureus* in northern Manhattan. **Clinical Infectious Diseases**, 57:700-703, 2013.

VAN DEN EEDE, A.; MARTENS, A.; LIPINSKA, U.; STRUELENS, M.; DEPLANO, A.; DENIS, O.; HERMANS, K. High occurrence of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* ST398 in equine nasal samples. **Veterinary Microbiology**, 133:138-144, 2009.

VAN DEN EEDE, A.; HERMANS, K.; VAN DEN ABEELE, A.; FLORÉ, K.; DEWULF, J.; VANDERHAEGHEN, W.; F. CROMBÉ, F.; BUTAYE, P.; GASTHUYS F.; HAESBROUCK, F.; MARTENS, A. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) on the skin of long-term hospitalised horses. **The Veterinary Journal**. 193:408-411, 2012.

VAN DEN EEDE, A.; HERMANS, K.; VAN DEN ABEELE, A.; FLORÉ, K.; DEWULF, J.; VANDERHAEGHEN, W.; MARTENS, A. The nasal vestibulum is the optimal sampling site for MRSA screening in hospitalised horses. **The Veterinary Journal**. 197:415-419, 2013.

VAN DEN EEDE, A.; MARTENS, A.; FERYN, I.; VANDERHAEGHEN, W.; LIPINSKA, U.; GASTHUYS, F.; BUTAYE, P.; HAESBROUCK, F.; HERMANS, K. Low MRSA prevalence in horses at farm level. **BMC Veterinary Research**. 8:213, 2012.

VAN DUIJKEREN, E.; MOLEMAN, M.; VAN OLDRUITENBORGH-OOSTERBAAN, M.S.; MULTEM, J.; TROELSTRA, A.; FLUIT, A. C.;

WAGENAAR, J.A. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in horses and horse personnel: an investigation of several outbreaks. **Veterinary Microbiology**, 141:96-102, 2010.

VUONG, C.; OTTO, M. *Staphylococcus epidermidis* infections. **Microbes and Infection**. 4:481-489, 2002.

VAN WAMEL, W.J.B.; MAŇÁSKOVÁ, S.H.; FLUIT, A.C.; VERBRUGH, H.; DE NEELING, A.J.; VAN DUIJKEREN, E.; VAN BELKUM, A. Short term micro-evolution and PCR-detection of methicillin-resistant and-susceptible *Staphylococcus aureus* sequence type 398. **European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases**. 29:119-122, 2010.

WEGENER, H. C.; ANDRESEN, L. O.; BILLE-HANSEN, V. *Staphylococcus hyicus* virulence in relation to exudative epidermitis in pigs. **Canadian Journal of Veterinary Research**. 57:119, 1993.

WEESE, J.S.; ROUSSEAU, J.; TRAUB-DARGATZ, J. L.; WILLEY, B. M.; McGEER, A. J.; LOW, D. E. Community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in horses and humans who work with horses. **Journal of the American Veterinary Medical Association**. 226:580-583, 2005a.

WEESE, J.S.; ARCHAMBAULT, M.; WILLEY, B.M.; HEARN, P.; KREISWIRTH, B.N.; SAID-SALIM, B.; McGEER, A.; LIKHOSHVAY, Y.; LOW, D.E. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in horses and horse personnel, 2000–2002. **Emerging Infectious Diseases**. 11:430-435, 2005b.

WEESE, J.S.; CALDWELL, F.; WILLEY, B.M.; KREISWIRTH, B.N.; MCGEER, A.; ROUSSEAU, J.; & LOW, D.E. An outbreak of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* skin infections resulting from horse to human transmission in a veterinary hospital. **Veterinary Microbiology**. 114:160-164, 2006a.

WEESE, J.S.; ROUSSEAU, J.; WILLEY, B.M.; ARCHAMBAULT, M.; LOW, D. E. Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* in Horses at a Veterinary Teaching Hospital: Frequency, Characterization, and Association with Clinical Disease, **Journal of Veterinary Internal Medicine**. 20: 182-186, 2006b.

WEESE, J.S.; LEFEBVRE, S.L. Risk factors for methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* colonization in horses admitted to a veterinary teaching hospital. **The Canadian Veterinary Journal**. 48:921-926, 2007.

WEESE, J.S. Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* in Animals. **Ilar Journal**. 51:233-244, 2010.

WEGENER, H.C.; ANDRESEN, L.O.; BILLE-HANSEN, V. *Staphylococcus hyicus* virulence in relation to exudative epidermitis in pigs. **Canadian Journal of Veterinary Research**. 57:119, 1993.

WEIGEL, L.M.; CLEWELL, D.B.; GILL, S.R.; CLARK, N.C.; MCDOUGAL, L.K. FLANNAGAN, S.E.; KOLONAY, J.F.; SHETTY, J.; KILLGORE, G.E.; TENOVER, F.C. Genetic analysis of a high-level vancomycin-resistant isolate of *Staphylococcus aureus*. **Science**. 302:1569-1571, 2003.

WITTE, W.; STEOMMINGER, B.; STANEK, C.; CUNY, C. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* ST398 in Humans and Animals, Central Europe. **Emerging Infectious Diseases**. 13:255-258, 2007.

WULF, M.; VOSS, A. MRSA in livestock animals—an epidemic waiting to happen?. **Clinical Microbiology and Infection**. 14:519-521, 2008.

YAO, L.; BENGUALID, V.; LOWY, F.D.; GIBBONS, J.J.; HATCHER, V.B.; BERMAN, J.W. Internalization of *Staphylococcus aureus* by endothelial cells induces cytokine gene expression. **Infection and Immunity**. 63:1835-1839, 1995.

YU, V.L.; GOETZ, A.; WAGENER, M.; SMITH, P.B.; RIHS, J.D.; HANCHETT, J.; ZURAVLEFF, J.J. *Staphylococcus aureus* nasal carriage and infection in patients on hemodialysis. **New England Journal of Medicine**. 315:91-96, 1986.



ISSN Eletrônico: 1678-4596

1

2 **9. Trabalho a ser enviado para a revista Ciência Rural.**

3 ***Staphylococcus* spp. resistentes a meticilina e complexo clonal ST398 em equinos**

4 **hospitalizados e humanos contactantes**

5 ***Staphylococcus* spp. methicillin resistant and clonal complex ST398 in hospitalized**

6 **horses and human contactors**

7 Giovane Olivo^I, Márcio Garcia Ribeiro^{II}, Maria de Lourdes Ribeiro de Souza da

8 Cunha^{III}, Danilo Flávio Moraes Riboli^{III}, Priscila Luiza Mello^{III}, Nathalia Bibiana

9 Teixeira^{III}, César Erineudo Tavares de Araújo^I, José Paes de Oliveira-Filho^I, Alexandre

10 Secorun Borges*^I

11

12 **RESUMO**

13 *Staphylococcus* spp. causam inúmeras enfermidades e o desenvolvimento de resistência

14 bacteriana aos antimicrobianos convencionais e linhagens virulentas, dificulta o

15 tratamento das infecções causadas por esses micro-organismos, tornando um problema

16 de saúde humana e animal. O objetivo desta pesquisa foi estudar a distribuição de

17 *Staphylococcus* spp. resistentes a meticilina (MRS) em equinos hospitalizados e

18 profissionais da área (médicos veterinários e funcionários), bem como avaliar possível

19 transmissão interespécies. Identificação de *Staphylococcus* spp. resistente a meticilina,

20 determinação do perfil clonal e identificação de linhagens virulentas em hospital

21 veterinário no Brasil. Foram colhidas 131 amostras de suabe nasal de equinos e 35 de

1 humanos, cultivados em ágar de ovo-telurite-glicina-piruvato (BD Baird-Parker
2 Agar®). Os micro-organismos foram identificados por provas bioquímicas e métodos
3 genotípicos por PCR convencional, espaçador interno transcrito (ITS-PCR) e
4 sequenciamento gênico para caracterização das espécies. A sensibilidade aos
5 antimicrobianos foi determinada pelo método de concentração inibitória mínima (CIM).
6 O perfil clonal dos *Staphylococcus* spp. foi caracterizado por Eletroforese em Gel de
7 Campo Pulsado (PFGE), enquanto o *Multilocus sequence Typing* (MLST) foi realizado
8 para identificar a genética da população do patógeno. O gênero *Staphylococcus* spp. foi
9 isolado em 17,5% (23/131) dos equinos, dos quais, 8,4% (11/131) eram *S. hyicus*, 3,8%
10 (5/131) *S. aureus*, 3,8% (5/131) *S. pseudintermedius* e 1,5% (2/131) *S. schleiferi*.
11 subesp. *coagulans*. Foi detectado o gene *mecA* em um isolado de *S. pseudintermedius*.
12 Em quatro amostras de *S. aureus* foi identificado o perfil clonal ST398, dentre estas,
13 similaridade clonal de 98,1% entre uma amostra de equino e humano. Houve maior
14 prevalência de *S. hyicus* em equinos e *S. aureus* em humanos. Primeiro relato de *S.*
15 *schleiferi* subesp. *coagulans* em equinos. O gene *mecA* está presente em outras espécies
16 de estafilococos, capazes de causar doença. ST398 foi encontrada em humanos e um
17 equino, com provável transmissão interespecie.

18

19 **Palavras-chave:** colonização, equino, humano, meticilina resistente, ST398,
20 *Staphylococcus* spp.

21

22 ABSTRACT

23 *Staphylococcus* spp. cause numerous diseases, development of bacterial resistance to
24 conventional antimicrobials and virulent strains, that make it difficult to treat infections

1 caused by these microorganisms, making it a human and animal health problem. The
2 objective of this research was to study the distribution of *Staphylococcus* spp.
3 methicillin resistant (MRS) in hospitalized horses and area professionals (veterinarians
4 and staff) as well as assessing possible interspecies transmission. Identification of
5 *Staphylococcus* spp. resistant to methicillin, determination of the clonal profile and
6 identification of virulent strains in a veterinary hospital in Brazil. A total of 131 samples
7 from nasal swabs of horses and 35 humans were grown on egg-tellurite-glycine-pyruvate
8 agar (BD Baird-Parker Agar®). The microorganisms were identified by biochemical
9 tests and genotypic methods by conventional PCR, internal transcript spacer (ITS-PCR)
10 and gene sequencing for characterization of the species. Antimicrobial susceptibility
11 was determined by the minimum inhibitory concentration (MIC) method. The clonal
12 profile of *Staphylococcus* spp. was characterized by Pulsed Field Gel Electrophoresis
13 (PFGE), while Multilocus Sequence Typing (MLST) was performed to identify the
14 genetics of the pathogen population. The genus *Staphylococcus* spp. was isolated in
15 17.5% (23/131) of the equines, which 8.4% (11/131) were *S. hyicus*, 3.8% (5/131) *S.*
16 *aureus*, 3.8% (5/131) *S. pseudintermedius* and 1.5% (2/131) *S. schleiferi* subsp.
17 *coagulans*. The *mecA* gene was detected in a *S. pseudintermedius* isolate. In four
18 samples of *S. aureus* the clonal profile ST398 was identified, among them, clonal
19 similarity of 98.1% between equine and human sample. There was a higher prevalence
20 of *S. hyicus* in horses and *S. aureus* in humans. First report of *S. schleiferi* subsp.
21 *coagulans* in horses. The *mecA* gene is present in other species of staphylococci, can be
22 able to causing disease. ST398 was found in humans and an equine, with likely
23 interspecies transmission.

1 **Key words:** colonization, equine, human, methicillin resistant, ST398, *Staphylococcus*
2 spp.

3 **Introdução**

4 Os micro-organismos do gênero *Staphylococcus* apresentam pouca
5 especificidade e são capazes de causar doença em humanos e diversas espécies de
6 animais. Equinos hospitalizados podem carrear e disseminar o micro-organismo,
7 tornando-se um risco de infecção nosocomial tanto para humanos quanto para outras
8 espécies animais (WEESE, et al., 2005; VAN den EEDE et al., 2012; 2013).

9 A importância do diagnóstico nos animais e humanos acometidos não se
10 restringe apenas ao isolamento do micro-organismo, mas também a detecção do gene
11 *mecA* (responsável por conferir resistência do micro-organismo à meticilina) e vários
12 fatores de virulência que conferem ao *Staphylococcus* spp. a capacidade de se
13 multiplicar no hospedeiro e dificultar a ação de anticorpos e antimicrobianos.
14 *Staphylococcus aureus*, em particular, apresenta populações clonais com linhagens
15 disseminadas globalmente, refletindo na tipificação molecular (CLSI, 2014). A
16 *Multilocus Sequence Typing* (MLST) é o método de escolha para determinar a genética
17 da população do patógeno estudado, capaz de reconhecer pequenas evoluções de
18 linhagens por sequenciamento de sete *housekeeping genes* para identificar o
19 sequenciamento gênico (ST) dos isolados (ENRIGHT et al., 2000).

20 A ocorrência de surtos de MRSA em hospitais humanos e veterinários é
21 atribuída a fatores, como a exposição prévia aos antimicrobianos e a colonização dos
22 susceptíveis, agravados pelo estado de debilidade dos pacientes, principalmente no pós
23 operatório, resultando em septicemias e óbitos (WEESE, 2010). Outra possibilidade é
24 de que *S. aureus* sensível a meticilina seja amplamente disseminado entre os humanos e,

1 posteriormente, transferido para cavalos, onde podem adquirir um elemento SCCmec
2 diferente daqueles verificados em humanos (MRSA - ST254) (CUNY et al., 2006).

3 Com a crescente resistência bacteriana aos antimicrobianos convencionais, como
4 β -lactâmicos, tem se observado baixa eficácia dos tratamentos relacionados ao MRSA,
5 de modo que atualmente o protocolo terapêutico baseia-se no uso da vancomicina,
6 embora, já tenham sido relatadas cepas resistentes a esse fármaco (HIRAMATSU, et al.,
7 1997; WEIGEL, et al., 2003).

8 A detecção do MRSA é rotineira em países da América do Norte (SEGUIN et
9 al., 1999; WEESE & LEFEBVRE, 2007) e Europa (WEESE et al., 2006; WITTE et al.,
10 2007; BERGSTRÖM et al., 2012), enquanto no Brasil poucos estudos têm se
11 preocupado em investigar o impacto de estafilococos, coagulase positiva e negativa,
12 meticilina resistentes em animais domésticos (LANGE et al., 1999; MALUTA, et al.,
13 2010; AQUINO et al., 2012). O objetivo foi determinar a prevalência e distribuição das
14 diversas espécies de *Staphylococcus* em equinos hospitalizados e humanos contactantes
15 em mesmo ambiente hospitalar.

16 MATERIAL E MÉTODOS

17 Seleção dos animais, humanos e local de estudo

18 Foram colhidas 131 amostras de suabe nasal de equinos (machos e fêmeas,
19 independente da raça ou idade) e de 35 humanos (tratadores, enfermeiros, residentes,
20 estagiários, médicos veterinários, de ambos os sexos) que trabalham diretamente com
21 estes animais. O número de animais amostrados, foi calculado utilizando o site
22 *OpenEpi*, com intervalo de confiança de 95% e erro padrão de 2% (DEAN et al., 2015).

23 O estudo foi conduzido com a permissão do Comitê de Ética no Uso de Animais
24 (CEUA), protocolo número 74/2015. A colheita de amostras humanas teve
25 consentimento e aprovação do CAAE: 56025716.8.0000.5411, comprovante número
26 042532/2016.

1

2

3 **Colheita e processamento das amostras**

4 As amostras foram colhidas durante o internamento de equinos e também de
5 humanos em contato direto com esta espécie, conduzido em mesmo ambiente hospitalar
6 [Clínica Médica de Grandes Animais (CGA), Clínica Cirúrgica de Grandes Animais
7 (CCGA) e Reprodução de Grandes Animais (RGA)], durante período de 6 meses
8 (2016). Foi realizada a coleta com suabe estéril, friccionando-o na mucosa nasal com no
9 mínimo dez movimentos de rotação, na região de vestíbulo nasal segundo VAN den
10 EEDE et al. (2013). A técnica de coleta nasal em humanos consistiu na introdução do
11 suabe em ambas às narinas, realizando movimento de rotação da haste pressionando a
12 extremidade contra a mucosa. Após a colheita, as amostras foram mantidas em meio
13 *Stuart* (4 °C) até o cultivo.

14 **Cultivo e isolamento de *Staphylococcus* spp.**

15 Todas as amostras de suabe nasal foram semeadas no meio de ágar de ovo-
16 telurite-glicina-piruvato (BD Baird-Parker Agar[®]) acrescido de gema de ovo com
17 telurito de potássio (Difco[™] EY Tellurite Enrichment), mantidas em condições de
18 aerobiose a 37° C, por 48 horas, avaliadas a cada 24 horas, com vistas ao isolamento de
19 *Staphylococcus* spp.

20 **Identificação fenotípica dos *Staphylococcus* spp.**

21 Os micro-organismos isolados foram submetidos à coloração de Gram, com o
22 objetivo de observar a morfologia e coloração específica dos isolados. Após a
23 visualização de cocos Gram positivos agrupados em cachos, foram realizadas as provas
24 de identificação da catalase e coagulase, e provas bioquímicas como maltose, trealose e

1 manitol para diferenciação de *S. aureus* de outras espécies de estafilococos coagulase
2 positiva (CoPS) (KONEMAN et al., 1997).

3 **Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM)**

4 A sensibilidade microbiana “*in vitro*” dos isolados de *Staphylococcus* spp.
5 portadores do gene *mecA* foi determinada pela técnica de CIM para oxacilina,
6 clindamicina, eritromicina, amicacina, linezolida, quinupristina/dalfopristina e
7 vancomicina. A escolha desses antimicrobianos é justificada pelo uso em pacientes
8 equinos e/ou humanos em ambiente hospitalar.

9 A CIM dos isolados foi avaliada pelo método comercial (E-testTM). Os isolados
10 foram classificados como sensíveis ou resistentes a cada antimicrobiano de acordo com
11 as especificações do *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI, 2016).

12 **Extração do ácido nucléico (DNA) bacteriano**

13 O ácido nucleico foi extraído a partir de linhagens de *Staphylococcus* spp.,
14 cultivadas em ágar sangue, inoculadas individualmente em caldo Infusão de Cérebro e
15 Coração (BHI) e incubadas a 37°C por 24 h. A extração foi realizada com o Kit
16 Illustra[®] (GE Healthcare[®]) conforme as indicações do fabricante.

17 **Identificação genotípica dos *Staphylococcus* spp.**

18 A confirmação genotípica para os isolados de *S. aureus* foi realizada com base
19 na detecção do gene específico Staur4 e Staur6, no qual foi utilizado os primers Staur4
20 (5' - ACGGAGTTACAAAGGACGAC - 3') e Staur6 (5'-
21 AGCTCAGCCTTAACGAGTAC -3') com produto final de 1250 pb (STRAUB et al.,
22 1999).

23 A genotipagem para a identificação de *Staphylococcus* spp. foi confirmada
24 utilizando a técnica de espaçador interno transcrito-PCR (ITS-PCR) COUTO et al.
25 (2001). Os isolados que não puderam ser identificados por ITS-PCR, foram submetidos

1 a amplificação e sequenciamento do gene *rpoB*, previamente descrito (Mellmann et al.,
2 2006).

3 **Deteção do gene de resistência à metilina (*mecA*) em *Staphylococcus* spp.**

4 As reações de PCR para a detecção do gene *mecA* foram realizadas conforme os
5 parâmetros descritos por Murakami et al. (1991). Em todas as reações realizadas foram
6 utilizadas linhagens de referência internacional, como controle positivo (*S. aureus*
7 ATCC 33591) e negativo (*S. aureus* ATCC 25923).

8 **Pulsed-field gel electrophoresis (PFGE)**

9 A tipagem por PFGE dos isolados foi realizada segundo o protocolo previamente
10 definido por McDougal et al. (2003). As amostras foram colocadas em caldo BHI para
11 crescimento durante 24h. Em um microtubo foi colocado 250µl da amostra crescida e
12 centrifugada a 12.000g. por 1 minuto. Depois de desprezado o sobrenadante e
13 adicionado 150µl de solução TE (10mM de Tris, 1mM EDTA [pH 8,0]), as amostras
14 foram deixadas em banho maria por 10min a 37°C. Após agitação em vortex, foram
15 adicionados 2,5µl de Lisostafina (1mg/mL) e 150µl de agarose *low melt*. As amostras
16 foram distribuídas nos moldes para plugues, após a solidificação foram colocadas em
17 placa de 24 poços com 2 mL de solução EC (6mM Tris-HCl, 1M NaCl, 100mMEDTA,
18 0,5% Brij-58, 0,2% deoxicolato de sódio, 0,5% laurilsarcosil sódico) e incubadas à
19 37°C por no mínimo 4 horas. O EC foi retirado e os plugues lavados com 2 mL de TE
20 quatro vezes à temperatura ambiente com intervalos de meia hora. Para a restrição do
21 DNA genômico foi utilizada a enzima *SmaI* (*Fast Digest SmaI*, Fermentas Life Science,
22 Canadá) e *ApaI* (Promega, Madison, WI) (RASSCHAERT et al., 2009).

23 A eletroforese foi executada em aparelho CHEF-DRII System®
24 (BioRadLaboratories, EUA) em gel de agarose a 1% preparado com TBE 0,5X (Pulsed
25 Field Certified Agarose, BioRadLaboratories, EUA) sob as seguintes condições de

1 corrida: intervalos de tempo de pulso de 5 a 40s por 21h; em rampa linear; 6V/cm;
2 ângulo de 120°; 14°C; 0,5M TBE como tampão de corrida. Foi utilizado Lambda Ladder
3 PFG Marker (New EnglandBioLabs) como marcador molecular. O gel foi corado com
4 GelRed (10.000X em água, Biotium, EUA) por 1 hora, e fotografado sob
5 transiluminação UV. A análise de similaridade foi realizada utilizando-se o software
6 BioNumerics (versão 7.6; AppliedMaths, Bélgica). A criação do dendrograma foi
7 realizada pelo método UPGMA (Unweighted Pair Group Method with Arithmetic
8 Mean), utilizando o software BioNumerics (versão 7.0; Applied Maths, Bélgica) com
9 tolerância da posição das bandas e a otimização ajustadas para 1,25 e 0,5%
10 respectivamente. O coeficiente de similaridade de Dice $\geq 80\%$ foi escolhido para
11 determinação dos clusters com uso da enzima de restrição *Sma*I. As amostras não
12 identificadas no PFGE foram novamente submetidas ao teste com uso da enzima *Apa*I,
13 cujo coeficiente de similaridade de Dice para escolha dos clusters foi $\geq 97\%$. Foi
14 utilizada marcador Lambda Ladder PFG Marker (BioLabs) para normatização dos géis.

15 **MultilocusSequenceTyping (MLST)**

16 O MLST foi realizado segundo as normas descritas por ENRIGHT et al. (2000).
17 Cada par de primer amplificou um fragmento interno do gene *housekeeping* (cerca de
18 500pb), carbamatoquinase (*arcc*) desidrogenase, do chiquimato (*aroE*), glicerol quinase
19 (*glp*), guanilatoquinase (*gmk*), acetiltransferase fosfato (*pta*), triosefosfatoisomerase
20 (*tpi*), e acetil coenzima A acetiltransferase (*yqiL*). Após a amplificação, realizou-se a
21 purificação do produto amplificado pelo Kit HiYield™ Gel/PCR
22 *FragmentsExtraction*. e sequenciamento dos sete genes *housekeeping*. A análise e
23 comparação das sequências foram realizadas por banco de dados via internet
24 (<http://www.mlst.net>), de forma a obter o número de identificação correspondente a

1 cada um dos alelos. A combinação desses alelos indica o tipo de sequência (ST) e o
2 complexo clonal (CC) a que pertencem os isolados.

3

4 REAÇÃO DE SEQUENCIAMENTO

5 As reações foram realizadas em sequenciador 3500 GeneticAnalyzer
6 (AppliedBiosystems, Foster City, CA, EUA). A visualização das sequências
7 (eletroforograma) foi realizada pelo programa Mega.As sequências de nucleotídeos
8 obtidas foram alinhadas utilizando a ferramenta BLAST-NCBI
9 (www.ncbi.nlm.nih.gov/blast) para correta identificação da espécie.

10

11 RESULTADOS

12 Dos 131 suabes analisados de equinos, foram isolados micro-organismos em
13 94% (123/131) das amostras, enquanto nas amostras de origem humana houve 100%
14 (35/35) de isolamento microbiano.

15 Foram isolados *Staphylococcus* spp.em 23 amostras (17,5%) provenientes de
16 equinos e 14 amostras (40%) de humanos. Foi confirmado *S. aureus* em 21,7% (5/23)
17 das amostras de equinos e 100% (14/14) de humanos (Figura 1). A prevalência de
18 equinos colonizados por um micro-organismo com o gene *mecA* foi de 0,8% (1/131),
19 enquanto nas amostras de origem humana, não foi identificado o gene *mecA*.

20 A frequência de isolamento de *Staphylococcus* spp. de equinos hospitalizados foi
21 de 17,5% (23/131), dos quais, 8,4% (11/131) eram *S. hyicus*, 3,8% (5/131) *S. aureus*,
22 3,8% (5/131) *S. pseudintermedius* e em 1,5% (2/131) (GenBank: CP016073.1;
23 CP002439.1) identificados como *S. schleiferi* (GenBank: gi|928189965|AP014944.1;

gi|928189965|AP014944.1). Foi detectado o gene *mecA* em apenas uma amostra identificada como *S. pseudintermedius*.

No teste de concentração inibitória mínima, o isolado de *S. pseudintermedius* (equino), foi resistente à oxacilina. Para os demais antimicrobianos testados (vancomicina, amicacina, linezolida, quinopristina/dalfopristina) houve sensibilidade.

A tipagem molecular por PFGE gerou um cluster dos isolados de *S. aureus*, que incluíram simultaneamente ≥ 3 amostras, com similaridade $\geq 80\%$ (Figura 1). Esse cluster (C1) conta com isolados de humanos, o que indica disseminação do micro-organismo entre duas pessoas da área CCGA e uma do departamento RGA. Foi possível observar similaridade ($\geq 80\%$) entre outros dois isolados de humanos obtidos do departamento de CCGA (C2), bem como duas estirpes dos departamentos de CCGA e RGA (C5) (Figura 1).

Nos isolados de *S. aureus* dos equinos foi possível determinar similaridade ($\geq 80\%$) provindos da RGA e CGA (C3), e entre dois animais da CCGA (C4). Todos esses quatro equinos eram mantidos a mais de um ano em locais próximos e submetidos a mesmo manejo nutricional (Figura 1).

Em quatro isolados foi possível determinar padrão eletroforético com uso da enzima *ApaI*, com similaridade de $\geq 97\%$ [26], bem como uma estirpe de equino (107 – CCGA) e uma de humano (H20 – RGA) (Figura 4) (Figura 2). Após identificação destas estirpes, foi realizado a técnica de MLST, sendo possível identificar que todas pertenciam ao complexo clonal (CC) ST398.

A tipagem molecular por PFGE dos isolados de *S. hyicus* de equinos, foram determinadas a partir de similaridade $\geq 80\%$. O cluster (C1) foi formado por três isolados da CCGA e uma da CGA, o (C2) por isolados oriundos de um único local

1 (CCGA), e o cluster (C3) por equinos provindos da CCGA e CGA (Figura 3). Todos
2 estes nove equinos eram submetidos a mesmo manejo nutricional (Figura 3).

3 A Tabela 2 representa o total de equinos hospitalizados e humanos contactantes
4 do estudo, resultado do isolamento microbiológico, técnicas moleculares e identificação
5 fenotípica dos estafilococos.

6

7 DISCUSSÃO

8 *S. aureus* é um patógeno reconhecidamente invasivo e oportunista para humanos
9 com crescente aumento de morbimortalidade em hospitais, acometendo principalmente
10 indivíduos com lesão de pele e, ocasionalmente, pessoas saudáveis. O predomínio de *S.*
11 *aureus* isolado da cavidade nasal de humanos no presente estudo concorda com os
12 achados de prevalência de *S. aureus* e *S. epidermidis* na narina e axilas de humanos
13 saudáveis (FRANK et al., 2010). No entanto, nos humanos amostrados outras bactérias
14 além de *S. aureus* foram também encontradas, competindo e limitando a colonização
15 por *S. aureus* (FRANK et al., 2010).

16 O perfil clonal estabelecido pela técnica de PFGE, possibilitou entender melhor
17 a distribuição dos equinos e humanos colonizados por *S. aureus*, principalmente nos
18 casos em que animais e humanos coabitavam no mesmo local, em contato direto, ou
19 estavam a mais de um ano internados (equinos). Apesar de não haver qualquer
20 similaridade clonal entre *S. aureus* de equinos comparado aos de humanos, os clusters
21 formados (C3 e C4) indicaram similaridade entre os isolados de equinos internados no
22 mesmo departamento a mais de um ano, bem como por permanecerem em áreas/piquetes
23 próximos. Esses achados confirmam a proximidade dos animais e o tempo prolongado

1 de interação como fatores de risco para a disseminação e colonização do patógeno
2 (WEESE et al., 2005; MALHARDO, et al., 2013).

3 O perfil clonal dos estafilococos de origem humana (C1, C2 e C5) foi definido
4 por médicos veterinários em contato diário no mesmo departamento (C1 e C2 - CCGA)
5 e até mesmo de departamentos distintos, contudo convivendo em mesmo ambiente
6 hospitalar (C5 – RGA e CCGA). A colonização por *S. aureus* sensível a meticilina em
7 equinos e humanos do mesmo local de trabalho evidencia que o perfil clonal do micro-
8 organismo seja o mesmo entre os equinos, entre os humanos, assim como entre as duas
9 espécies estudadas, corroborando, em parte, aos resultados encontrados no presente
10 estudo, posto que não ocorreu similaridade interespecie (WEESE et al., 2005).

11 Algumas espécies animais, dentre estas os equinos são reservatórios de um novo
12 complexo clonal (ST398), isolado na Europa, Ásia e America do Norte (WULF &
13 VOSS, 2008). A transmissão destas estirpes podem ocorrer de três formas, tais como,
14 dentro da propriedade de origem, entre fazendas e até mesmo das propriedades de
15 criação para a população, sendo informações importantes para estudo e melhor
16 entendimento epidemiológico (RASSCHAERT, et al., 2009). Inicialmente isolados de
17 *S. aureus* de humanos e animais foram tipificados utilizando a enzima de restrição
18 (*SmaI*) na técnica de PFGE. No entanto, a enzima *SmaI* pode ser bloqueada no sítio de
19 metilação, sendo necessário o uso de outras enzimas, tais como *ApaI*, ou ainda, a
20 utilização de outras técnicas como MLST para a tipagem gênica a partir de genes
21 conservados, como realizado no presente estudo (WITTE et al., 2007; RASSCHAERT,
22 et al., 2009).

23 Embora suínos sejam considerados o maior hospedeiro dos *S. aureus* ST398,
24 resistente ou não a meticilina (BELKUM et al., 2008), essa linhagem clonal não possui
25 especificidade de hospedeiro, sendo capaz de se tornar endêmica em departamentos de
26 cirurgia de hospitais veterinários (CUNY et al., 2008). Mesmo que, estafilococos ST398
27 predominem em isolados MRSA (HERMANS et al., 2008; VAN den EEDE, et al.,
28 2009; VAN DUIJKEREN, et al., 2010; LONCARIC et al., 2014), é possível detectar

1 este clone em estirpes sensíveis a metilicina (MSSA) obtidos de suínos (BELKUM et
2 al., 2008; KEHRENBURG et al., 2009; KADLEC & SCHWARZ, 2010), humanos
3 (WAMEL, et al., 2010; UHLEMANN, et al., 2013), ovinos (HAARSTAD et al., 2014)
4 e equinos (SIEBER, et al., 2011), capaz de colonizar indivíduos saudáveis e causar
5 infecções, fato que ressalta a virulência da estirpe e capacidade de causar doença em
6 animais e humanos contactantes. Entre 2005 e 2011, relataram na Suíça, o isolamento
7 de 17% (12/70) MSSA, onde, 7 equinos apresentaram infecções de pele pós-cirúrgico e
8 5 com tromboflebitas, o que reforça a capacidade de causar doença mesmo não
9 possuindo gene *mecA* (SIEBER, et al., 2011).

10 No Brasil, a detecção do complexo clonal ST398 em medicina veterinária foi
11 relatada em leite contaminado (SILVA et al., 2014), na epidermite exsudativa em suínos
12 (MORENO et al., 2016) e humanos, onde identificaram uma cepa MSSA com
13 complexo clonal ST398 em paciente humano apresentando o gene de resistência a
14 múltiplos antimicrobianos (*cfrr*), o qual ocasionou pneumonia e óbito Gales et al. (2015).
15 No entanto, não há descrição até o momento no Brasil, identificando a espécie equina
16 como fonte de transmissão de ST398 para humanos contactantes. A detecção de ST398
17 no presente estudo, de uma amostra provinda de equino e três de humanos, indica a
18 possibilidade de que estes indivíduos tenham sido colonizados a partir do contato com
19 uma espécie animal, reforçado pelo fato de um equino e um humano possuir
20 similaridade clonal de 98,1% (ST398), o que difere dos resultados obtidos por outros
21 estudos, onde não foi possível obter qualquer similaridade clonal entre amostras de
22 equinos e funcionários de um hospital veterinário no Reino Unido (MOODLEY et al.,
23 2006)

24 *S. hyicus* foi o micro-organismo isolado com maior frequência nos equinos
25 amostrados. Esta espécie de estafilococos comumente é isolada em diversas espécies de

1 animais domésticos, capaz de produzir toxinas esfoliativas, causando quadro de
2 epidermite exudativa, chamada de “doença do suíno gorduroso” (*greasy pig disease*)
3 (WEGENER, et al., 1993; ANDRESSEN & AHRENS, 2004). *S. hyicus* possui a
4 capacidade de transferir plasmídios de resistência aos antimicrobianos (ANDRESSEN
5 & AHRENS, 2004). A relevância do isolamento de *S. hyicus* é demonstrada em uma
6 pesquisa realizada na década de 1980, que avaliou equinos com e sem doenças de pele,
7 e observaram que o patógeno foi responsável por 13% (17/128) dos casos de lesões
8 cutâneas (DEVRIESE et al., 1985). No mesmo estudo, somente em um equino o micro-
9 organismo foi isolado de pele íntegra e narina, o que sugere maior capacidade de causar
10 infecção do que apenas colonizar a narina e pele dos animais (DEVRIESE et al., 1985).
11 A frequência de *S. hyicus* (2%) nos equinos amostrados no presente estudo assemelha-
12 se a outros resultados de uma pesquisa realizada na Universidade de Davis (Califórnia),
13 onde obtiveram 1,9% de isolados de incisões cirúrgicas (infecção hospitalar)
14 (BIBERSTEIN et al., 1984). Em estudo similar, identificaram 6,7% (6/90) de *S. hyicus*
15 em equinos com lesões de pele a partir de suabe local (DEVRIESE et al., 1983).

16 No Brasil investigando a etiologia de mastite em éguas, identificou *S. hyicus* em
17 2% (11/131) dos casos (MOTTA et al., 2011). Em humanos, *S. hyicus* causa infecções
18 ocasionais, relatado pela primeira vez em humano após mordida de asinino
19 (OSTERLUND & NORDLUND, 1997).

20 PFGE é considerado um dos métodos mais discriminatórios para a tipagem de
21 estafilococos, particularmente indicado no monitoramento de linhagens associadas a
22 surtos. Ainda, este teste possibilita a diferenciação de linhagens específicas entre
23 diferentes espécies de animais (SHIMIZU, et a., 1997). A ocorrência de *clusters*
24 relacionados ao *S. hyicus* de amostras nasais provenientes de equinos confirma esta
25 característica do PFGE, identificando maior frequência de isolados provindos da CCGA

1 apresentando similaridade clonal, e menor ocorrência de animais provindos da CGA. A
2 similaridade clonal de estirpes não garante que o micro-organismo possa causar doença,
3 já que outras variáveis como a presença de fatores de virulência e susceptibilidade do
4 hospedeiro também influenciam no estabelecimento da doença clínica (WEGENER, et
5 al., 1993). No entanto, a presença de fatores de virulência aliada a similaridade gênica
6 entre micro-organismos provindos de diferentes hospedeiros, favorece maior
7 probabilidade da ocorrência de surtos. Esses achados possibilitam aos profissionais da
8 área da saúde entenderem melhor a epidemiologia e ecologia deste micro-organismo e
9 considerar diferentes espécies como possíveis hospedeiros, como relatado em estudos
10 realizando com diferentes espécies animais colonizadas e/ou doentes (WEGENER, et
11 al., 1993; SHIMIZU, et al., 1997).

12 *S. pseudintermedius* é mais comumente isolado de cães e gatos (COHN &
13 MIDDLETON, 2010). No presente estudo *S. pseudintermedius* foi isolado em 3,8% dos
14 equinos, dos quais um isolado positivo para o gene *mecA* (MRSP), e apresentou-se
15 resistente a oxacilina. Esse resultado difere de um estudo onde 100% dos isolados de *S.*
16 *pseudintermedius* foram sensíveis aos antimicrobianos testados exceto uma estirpe
17 resistência a tetraciclina. *S. pseudintermedius* tem sido provavelmente identificado
18 equivocadamente como *S. intermedius* em testes microbiológicos convencionais, devido
19 a similaridade bioquímica entre essas espécies (GHARSA, et al., 2015). Neste contexto,
20 identificaram *S. pseudintermedius*, e afirmou a necessidade do uso de técnicas
21 moleculares para a confirmação do diagnóstico desta espécie de patógeno (DEVRIESE,
22 et al., 2005). Na Espanha, relataram a detecção de *S. aureus* e *S. pseudintermedius*
23 resistentes a meticilina em equinos hospitalizados, com 10,2% (4/39) dos animais
24 positivos para MRSA e um isolado para *S. pseudintermedius* resistente a meticilina
25 (MRSP – Oxacilina) (GOMEZ-SANZ, et al., 2013).

1 Na Itália, MRS foi identificado em 1% dos isolados de equinos, dos quais, 0,5%
2 MRSP (MALHARDO, et al., 2013), corroborando com os achados do presente estudo.
3 Neste mesmo estudo, os demais estafilococos (66/191) dos equinos foram identificados
4 como MRS (CoNS), representados por *Staphylococcus lentus* e *Staphylococcus sciuri*.
5 Os autores atribuem a identificação do gene *mecA* ao fato destes animais apresentarem
6 em comum, o mesmo tipo de uso (cavalos de corrida), com contato estreito com
7 humanos e sujeitos a tratamentos com antibióticos. Salientam ainda a importância dos
8 isolados de CoNS, como problema emergente de saúde animal e de saúde pública
9 (COHN & MIDDLETON, 2010; BOOST, et al., 2011; HUBER et al., 2011).

10 A ocorrência de *S. schleiferi* não é comum em equinos. No Brasil foi relatada
11 pela primeira vez, onde dois animais foram diagnosticados, embora classificados como
12 *S. schleiferi* subsp. *Schleiferi* (subsp. coagulase negativo), em animais com foliculite
13 bacteriana, sem presença de prurido (MONTEIRO et al., 2005). Em humanos o
14 primeiro relato foi no final da década de 1980, identificando *S. schleiferi* sp. nov. (coagulase
15 negativo) de amostras de um centro de referência de saúde na França (FRENEY et al.,
16 1988). O presente estudo identificou *S. schleiferi* subsp. *coagulans*, não relatada em
17 equinos até o momento. Esse micro-organismo foi descrito a primeira vez em animais
18 no início da década de 1990, responsável por causar otite externa em cães (IGIMI et al.,
19 1990). Por conseguinte, *S. schleiferi* subsp. *coagulans* (coagulase positivo) tem sido
20 relatado causando otites e/ou piodermites (IGIMI et al., 1990; FRANK et al., 2003;
21 MAY et al., 2005; KAWAKAMI et al., 2010) e endocardites em cães (LEUNG et al.,
22 1999), bem como descrito em humanos imunocomprometidos (KUMAR et al., 2007). *S.*
23 *schleiferi* pode apresentar o gene *mecA*, como no trabalho retrospectivo, onde 40%
24 (49/122) dos isolados de cães apresentavam o gene de resistência (MORRIS et al.,
25 2006).

26 A presença do gene *mecA* em diferentes espécies de *Staphylococcus* spp. (*S.*
27 *pseudintermedius* - CoPS) confirma que *S. aureus* não é a única espécie de estafilococos

1 capaz de apresentar resistência a meticilina (GILL et al., 2005). A virulência de
2 *Staphylococcus* spp. coagulase negativo (CoNS), não deve ser negligenciada em
3 medicina veterinária, como *S. epidermidis*, micro-organismo altamente patogênico e
4 invasivo, incluindo a formação de biofilme (VUONG & OTTO, 2002; LI et al., 2009).
5 Essa espécie de CoNS é capaz de inibir a formação de biofilme e competir com a
6 colonização nasal de *S. aureus* em humanos (IWASE et al., 2010). Na China,
7 caracterizaram por técnicas moleculares *S. epidermidis* em humanos e obtiveram 96,2%
8 dos isolados resistentes a meticilina e a eritromicina (LI et al., 2009). Ambos estudos
9 supracitados alertaram para o risco a saúde dos pacientes humanos, bem como
10 profissionais da área da saúde, que incluem funcionários de hospitais veterinário, que
11 mantêm contato direto com equinos.

12 A crescente resistência bacteriana aos antimicrobianos tem se tornado um
13 prolema de saúde pública de âmbito global. É importante ressaltar que vários estudos
14 suportam a evidência que a resistência a meticilina pode ser transmitida entre micro-
15 organismos de equinos e humanos (UBUKATA et al., 1989; WEESE, 2010). Além
16 deste fato, é notório que animais possam servir como reservatórios de micro-organismos
17 resistentes aos antimicrobianos, agravado pela capacidade de transmissão horizontal de
18 genes de resistência (*mecA*) entre as espécies de estafilococos (ANDRESSEN &
19 AHRENS, 2004).

20 CONCLUSÃO

21 *S. hyicus* foi a espécie mais prevalente de estafilococos na população equina
22 estudada, e deve ser objeto de estudo nos ambientes hospitalares veterinários.

23 O principal fator de risco para a colonização do *S. aureus* e *S. hyicus* (de mesmo
24 perfil clonal), nos equinos e humanos amostrados foi o contato interespecie no ambiente
25 hospitalar. Apesar de não haver identificação do gene *mecA* nos isolados de *S. aureus*

1 ST398, outros genes de resistência deverão ser testados. Estirpes com mesma
2 similaridade clonal sugerem transmissão interespecie.

3 O isolamento de *S. pseudintermedius* (*mecA*) resistentes a oxacilina, confirma
4 que outras espécies de estafilococos também devem ser motivo de preocupação no
5 tocante a resistência dos isolados a metilicina, e que outros estudos devem ser realizadas
6 particularmente com isolados CoNS.

7 A identificação de *S. schleiferisubsp.coagulans* descrito pela primeira vez em
8 equinos, denota a capacidade do patógeno colonizar a narina desta espécie, bem como a
9 possibilidade de colonizar e causar doença em humanos contactantes.

10 Uma melhor compreensão da genética e pressão seletiva que sustentam o
11 comportamento adaptativo do gênero *Staphylococcus* spp. pode ser utilizado no futuro
12 para prever novos surtos de doenças estafilocócicas e investigar novas estratégias de
13 controle necessárias em um momento de resistência crescente aos agentes
14 antimicrobianos.

15

16 **DECLARAÇÃO DE INTERESSES DOS AUTORES**

17 Os autores revelam que não existem conflitos de interesse com relação à pesquisa,
18 autoria e/ou publicação deste artigo

19

20 **AGRADECIMENTOS**

21 Os autores desejam agradecer a Fernando José Paganini Listoni por fornecer assistência
22 em laboratório.

23

24

1 REFERÊNCIAS

- 2 WEESE, J.S. et al. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in horses and horse
3 personnel, 2000–2002. **Emerging Infectious Diseases**. v.11, p.430-435, 2005.
- 4 VAN DEN EEDE, A. et al.. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) on
5 the skin of long-term hospitalised horses. **The Veterinary Journal**. v.193, p.408-411,
6 2012.
- 7 VAN DEN EEDE, A. et al. The nasal vestibulum is the optimal sampling site for
8 MRSA screening in hospitalised horses. **The Veterinary Journal**. v.197, p.415-419,
9 2013.
- 10 CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE. Performance standards
11 for antimicrobial susceptibility testing: 24st informational supplement (M100-S24).
12 Wayne, PA: CLSI. 2014.
- 13 ENRIGHT, M.C. et al. Multilocus Sequence Typing for Characterization of Methicillin-
14 Resistant and Methicillin-Susceptible Clones of *Staphylococcus aureus*. **Journal**
15 **Clinical Microbiology**. v.38, p.1008–1015, 2000.
- 16 WEESE, J.S. Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* in Animals. *Ilar Journal*.
17 v.51, p.233-244, 2010.
- 18 CUNY, C. et al. Emergence of MRSA infections in horses ina veterinary hospital: strain
19 characterisation and comparison with mrsa from humans. **Eurosurveillance**. v.11, p.44-
20 47, 2006.
- 21 HIRAMATSU, K. et al. Dissemination in Japanese hospitals of strains of
22 **Staphylococcus aureus** heterogeneously resistant to vancomycin. **The Lancet**. v.350,
23 p.670-1673, 1997.
- 24 WEIGEL, L.M. et al. Genetic analysis of a high-level vancomycin-resistant isolate of
25 *Staphylococcus aureus*. **Science**. v.302, p.1569-1571, 2003.
- 26 SEGUIN, J.C. et al. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* outbreak in a
27 veterinary teaching hospital: potential human-to-animal transmission. **Journal of**
28 **Clinical Microbiology**. v.37, p.1459-1463, 1999.

- 1 WEESE, J.S., LEFEBVRE, S.L. Risk factors for methicillin-resistant *Staphylococcus*
2 *aureus* colonization in horses admitted to a veterinary teaching hospital. **The Canadian**
3 **Veterinary Journal**. v.48, p.921-926, 2007.
- 4 WEESE, J.S. et al. Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* in Horses at a
5 Veterinary Teaching Hospital: Frequency, Characterization, and Association with
6 Clinical Disease, **Journal of Veterinary Internal Medicine**. v.20, p.182-186, 2006.
- 7 WITTE, W. et al. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* ST398 in Humans and
8 Animals, Central Europe. **Emerging Infectious Diseases**. v.13, p.255-258, 2007.
- 9 BERGSTRÖM, K. et al. Infection prevention and control interventions in the first
10 outbreak of methicillin -resistant *Staphylococcus aureus* infections in an equine hospital
11 in Swede. **Acta Veterinaria Scandinavica**. 2012.
- 12 LANGE, C. et al. Molecular subtyping of *Staphylococcus aureus* isolates from cases of
13 bovine mastitis in Brazil. **Veterinary Microbiology**. v.67, p.127-141, 1999.
- 14 MALUTA, R.P. et al. Prevalence and antimicrobial resistance patterns of methicillin-
15 resistant staphylococci (MRS) isolated in a Veterinary Teaching Hospital in Brazil.
16 **African Journal of Microbiology Research**. v.4, p.1879-1883, 2010.
- 17 AQUINO, G.D.V.; et al. Prevalence of Methicillin-Resistant Staphylococci on a Farm:
18 Staff can Harbour MRS When Animals Do Not. **Zoonoses and Public Health**. v.59,
19 p.1-3, 2012.
- 20 DEAN, A.G. et al. OpenEpi: Open Source Epidemiologic Statistics for Public Health,
21 Versão. www.OpenEpi.com, atualizado 04/05/2015, acessado 08/09/2015.
- 22 KONEMAN, E.W. et al. **Color Atlas and Textbook of Diagnostic Microbiology**, 5th
23 ed., Lippincott, Philadelphia, 1395p, 1997.
- 24 CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE. (2016) Performance
25 standards for antimicrobial susceptibility testing: 26st informational supplement (M100-
26 S24). Wayne, PA: CLSI.
- 27 STRAUB, J.A.; et al. A 23S rDNA-targeted polymerase chain reaction-based sstem for
28 detection of *Staphylococcus aureus* in meat starter cultures and dairy products. **Journal**
29 **of Food Protection**. v.62, p.1150-1156, 1999.

- 1 COUTO, I. et al. Identification of clinical staphylococcal isolates from humans by
2 Internal Transcribed Spacer PCR. I. **Clin Microbiol.** v.39, p.3099–3103, 2001.
- 3 MELLMANN A. et al. Based Upon Repeat Pattern (BURP): an algorithm to
4 characterize the long-term evolution of *Staphylococcus aureus* populations based on spa
5 polymorphisms. **BMC Microbiology.** v.7, p.98-102, 2007.
- 6 MURAKAMI K. et al. Identification of methicillin-resistant strains of staphylococci by
7 polymerase chain reaction. **Journal Clinical Microbiology.** v.29, p.2240-2244, 1991.
- 8 MCDOUGAL, L.K. et al. Pulsed-field gel electrophoresis typing of oxacillin-resistant
9 *Staphylococcus aureus* isolates from the United States: establishing a national database.
10 **Journal of Clinical Microbiology.** v.41, p.5113-5120, 2003.
- 11 RASSCHAERT, G. et al. Comparison of fingerprinting methods for typing methicillin-
12 resistant *Staphylococcus aureus* sequence type 398. **Journal of Clinical Microbiology.**
13 v.47, p.3313-3322, 2009.
- 14 FRANK, D.N. et al. The human nasal microbiota and *Staphylococcus aureus* carriage.
15 **PloS One.** v.5, p.10598, 2010.
- 16 WEESE, J.S. et al. Community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*
17 in horses and humans who work with horses. **Journal of the American Veterinary**
18 **Medical Association.** v.226, p.580-583, 2005.
- 19 MALHARDO, K. et al. comparative evaluation of methicillin-resistant staphylococci
20 isolated from harness racing-horses, breeding mares and riding-horses in Italy. **Asian**
21 **Pacific Journal of Tropical Biomedicine.** v.3, p.169-173, 2013.
- 22 WULF, M.; VOSS, A. MRSA in livestock animals—an epidemic waiting to happen?.
23 **Clinical Microbiology and Infection.** v.14, p.519-521, 2008.
- 24 BELKUM, A.V. et al. Methicillin-resistant and-susceptible *Staphylococcus aureus*
25 sequence type 398 in pigs and humans. **Emerging Infectious Diseases,** v.14, p.479-
26 483, 2008.
- 27 CUNY, C. et al. Clusters of infections in horses with MRSA ST1, ST254, and ST398 in
28 a veterinary hospital. **Microbial Drug Resistance.** v.14, p.307-310, 2008.
- 29 HERMANS, K. et al. MRSA clone ST398-SCCmec IV as a cause of infections in an
30 equine clinic. **Vlaams Diergeneeskundig Tijdschrift,** v.77, p.429-433, 2008.

- 1 VAN DEN EEDE, A. et al. High occurrence of methicillin-resistant *Staphylococcus*
2 *aureus* ST398 in equine nasal samples. **Veterinary Microbiology**, v.133, p.138-144,
3 2009.
- 4 VAN DUIJKEREN, E. et al. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in horses and
5 horse personnel: an investigation of several outbreaks. **Veterinary Microbiology**,
6 v.141, p.96-102, 2010.
- 7 LONCARIC, I. et al. Identification and characterization of methicillin-resistant
8 *Staphylococcus aureus* (MRSA) from Austrian companion animals and horses.
9 **Veterinary Microbiology**, v.168, p.381-387, 2014.
- 10 KEHRENBURG, C. et al. Methicillin-resistant and-susceptible *Staphylococcus aureus*
11 strains of clonal lineages ST398 and ST9 from swine carry the multidrug resistance
12 gene cfr. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**. v.53, p.779-781, 2009.
- 13 KADLEC, K.; SCHWARZ, S. Identification of the novel dfrK-carrying transposon
14 Tn559 in a porcine methicillin-susceptible *Staphylococcus aureus* ST398 strain.
15 **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**. v.54, p.3475-3477, 2010.
- 16 VAN WAMEL, W.J.B. et al. Short term micro-evolution and PCR-detection of
17 methicillin-resistant and-susceptible *Staphylococcus aureus* sequence type 398.
18 **European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases**. v.29, p.119-122,
19 2010.
- 20 UHLEMANN, A.C. et al. Emergence of sequence type 398 as a community-and
21 healthcare-associated methicillin-susceptible *Staphylococcus aureus* in northern
22 Manhattan. **Clinical Infectious Diseases**, v.57, p.700-703, 2013.
- 23 HAARSTAD, A.C. et al. Isolation of bacterial skin flora of healthy sheep, with
24 comparison between frequent and minimal human handling. **Veterinary Dermatology**.
25 v.25, p.215-e56, 2014.
- 26 SIEBER, S. et al. Evolution of multidrug-resistant *Staphylococcus aureus* infections in
27 horses and colonized personnel in an equine clinic between 2005 and 2010. **Microbial**
28 **Drug Resistance**, v.17, p.471-478, 2011.
- 29 SILVA, N.C.C. et al. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* of lineage ST398 as
30 cause of mastitis in cows. **Letters in Applied Microbiology**. v.59, p.665-669, 2014.

- 1 MORENO, L.Z. et al. Vancomycin-intermediate livestock-associated methicillin-
2 resistant *Staphylococcus aureus* ST398/t9538 from swine in Brazil. **Memórias do**
3 **Instituto Oswaldo Cruz**, v.111, p.659-661, 2016.
- 4 GALES, A.C. et al. MSSA ST398/t034 carrying a plasmid-mediated Cfr and Erm (B) in
5 Brazil. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**. v.70, p.303-305, 2015.
- 6 MOODLEY, A. et al. spa typing of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolated
7 from domestic animals and veterinary staff in the UK and Ireland. **Journal of**
8 **Antimicrobial Chemotherapy**. v.58, p.1118-1123, 2006.
- 9 WEGENER, H.C. et al. *Staphylococcus hyicus* virulence in relation to exudative
10 epidermitis in pigs. **Canadian Journal of Veterinary Research**. v.57, p.119, 1993.
- 11 ANDRESSEN, L.O.; AHRENS, P. A multiplex PCR for detection of genes encoding
12 exfoliative toxins from *Staphylococcus hyicus*. **Journal of Applied Microbiology**.
13 v.96, p.1265-1270, 2004.
- 14 DEVRIESE, L.A. et al. Identification and characteristics of staphylococci isolated from
15 lesions and normal skin of horses. **Veterinary Microbiology**. v.10, p.269-277, 1985.
- 16 BIBERSTEIN, E.L. et al. Species distribution of coagulase-positive staphylococci in
17 animals. **Journal of Clinical Microbiology**. v.19, p.610-615, 1984.
- 18 DEVRIESE, L.A. et al. *Staphylococcus hyicus* in skin lesions of horses. **Equine**
19 **Veterinary Journal**. v.15, p.263-265, 1983.
- 20 MOTTA, R.G. et al. Estudo dos métodos de rotina diagnóstica de mastite no leite de
21 éguas. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**. v.63, p.1028-1032,
22 2011.
- 23 ÖSTERLUND, A.; NORDLUND, E. Wound infection caused by *Staphylococcus hyicus*
24 subspecies *hyicus* after a donkey bite. **Scandinavian Journal of Infectious Diseases**.
25 v.29, p.95-95, 1997.
- 26 SHIMIZU, A. et al. Pulsed-field gel electrophoresis of *Staphylococcus hyicus* and
27 *Staphylococcus chromogenes* genomic DNA and its taxonomic, epidemiologic and
28 ecologic applications in veterinary medicine. **Journal of Veterinary Medical Science**.
29 v.59, p.443-450, 1997.

- 1 WEGENER, H. C. et al. *Staphylococcus hyicus* virulence in relation to exudative
2 epidermitis in pigs. **Canadian Journal of Veterinary Research**. v.57, p.119, 1993.
- 3 COHN, L.A.; MIDDLETON, J.R.A. Veterinary perspective on methicillin-resistant
4 staphylococci. **Journal of Veterinary Emergency and Critical Care**. v.20, p.31-45,
5 2010.
- 6 GHARSA, H. et al. Characterisation of nasal *Staphylococcus delphini* and
7 *Staphylococcus pseudintermedius* isolates from healthy donkeys in Tunisia. **Equine**
8 **Veterinary Journal**. v.47, p.463-466, 2015.
- 9 DEVRIESE, L.A. et al. *Staphylococcus pseudintermedius* sp. nov., a coagulase-positive
10 species from animals. **International Journal of Systematic and Evolutionary**
11 **Microbiology**. v.55, p.1569-1573, 2005.
- 12 GÓMEZ-SANZ, E. et al. First Detection of Methicillin-Resistant *Staphylococcus*
13 *aureus* ST398 and *Staphylococcus pseudintermedius* ST68 from Hospitalized Equines
14 in Spain. **Zoonoses and Public Health**. v.61, p.192-201, 2014.
- 15 BOOST, M. V. et al. Low Rate of Methicillin-resistant Coagulase-positive
16 Staphylococcal Colonization of Veterinary Personnel in Hong Kong. **Zoonoses and**
17 **Public Health**. v.58, p.36-40, 2011.
- 18 HUBER, H. et al. Prevalence and characteristics of methicillin-resistant coagulase-
19 negative staphylococci from livestock, chicken carcasses, bulk tank milk, minced meat,
20 and contact persons. **BMC Veterinary Research**. v.7, p.1, 2011.
- 21 MONTEIRO, G.A. et al. Diagnóstico das dermatoses alopecicas multifocais em equinos
22 da Zona da Mata mineira do Brasil. **Veterinária e Zootecnia**. v.15, p.139-149, 2005.
- 23 FRENEY, J. et al. *Staphylococcus lugdunensis* sp. nov. and *Staphylococcus schleiferi*
24 sp. nov., two species from human clinical specimens. **International Journal of**
25 **Systematic and Evolutionary Microbiology**. v.38, p.168-172, 1988.
- 26 IGIMI, S. et al. *Staphylococcus schleiferi* subsp. *coagulans* subsp. nov., isolated from
27 the external auditory meatus of dogs with external ear otitis. **International Journal of**
28 **Systematic and Evolutionary Microbiology**. v.40, p.409-411, 1990.
- 29 FRANK, L.A. et al. Isolation of *Staphylococcus schleiferi* from dogs with pyoderma.
30 **Journal of the American Veterinary Medical Association**. v.222, p.451-454, 2003.

- 1 MAY, E.R. et al. Isolation of *Staphylococcus schleiferi* from healthy dogs and dogs
2 with otitis, pyoderma, or both. **Journal of the American Veterinary Medical**
3 **Association**. v.227, p.928-931, 2005.
- 4 KAWAKAMI, S. et al. Antimicrobial susceptibility and methicillin resistance in
5 *Staphylococcus pseudintermedius* and *Staphylococcus schleiferi* subsp. *coagulans*
6 isolated from dogs with pyoderma in Japan. **Journal of Veterinary Medical Science**.
7 v.72, p.1615-1619, 2010.
- 8 LEUNG, M.J. et al. Case of *Staphylococcus schleiferi* endocarditis and a simple scheme
9 to identify clumping factor-positive staphylococci. **Journal of Clinical Microbiology**.
10 v.37, p.3353-3356, 1999.
- 11 KUMAR, D. et al. Case of *Staphylococcus schleiferi* subspecies *coagulans* endocarditis
12 and metastatic infection in an immune compromised host. **Transplant Infectious**
13 **Disease**. v.9, p.336-338, 2007.
- 14 MORRIS, D.O. et al. Screening of *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus intermedius*,
15 and *Staphylococcus schleiferi* isolates obtained from small companion animals for
16 antimicrobial resistance: a retrospective review of 749 isolates (2003–04). **Veterinary**
17 **Dermatology**. 17:332-337, 2006.
- 18 GILL, S.R. et al. Insights on Evolution of Virulence and Resistance from the Complete
19 Genome Analysis of an Early Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Strain and a
20 Biofilm-Producing Methicillin-Resistant *Staphylococcus epidermidis* Strain. **Journal of**
21 **Bacteriology**. v.187, p.2426–2438, 2005. [http://doi.org/10.1128/JB.187.7.2426-](http://doi.org/10.1128/JB.187.7.2426-2438.2005)
22 2438.2005.
- 23 VUONG, C.; OTTO, M. *Staphylococcus epidermidis* infections. *Microbes and*
24 *Infection*. v.4, p.481-489, 2002.
- 25 LI, M. et al. Molecular characterization of *Staphylococcus epidermidis* strains isolated
26 from a teaching hospital in Shanghai, China. **Journal of Medical Microbiology**. v.58,
27 p.456–461, 2009.
- 28 IWASE, T. et al. *Staphylococcus epidermidis* esp. inhibits *Staphylococcus aureus*
29 biofilm formation and nasal colonization. **Nature**. v.465, p.346-349, 2010.

1 UBUKATA, L. et al. Expression and Inducibility in *Staphylococcus aureus* of the *mecA*
2 Gene, Which Encodes a Methicillin-Resistant *S. aureus*-Specific Penicillin-Binding
3 Protein. **Journal of Bacteriology**. v.171, p.2882-2885, 1989.

4

5

6

7

8

9

10

11

12

13

14

15

16

17

18

19

20

21

22

23

24

25

26

Tabelas

TABELA 1. Identificação de *Staphylococcus* spp. (CoPS) isolados de equinos (n = 23) e humanos (n = 14), HV – Unesp (2016).

	<i>Staphylococcus</i> spp.					Total
	<i>S. aureus</i>	<i>S. hyicus</i>	<i>S. pseudintermedius</i> *	<i>S. schleiferi</i>	Gene <i>mecA</i> *	
Equinos	21,7% (5)	47,8% (11)	21,7% (5)	8,6% (2)	4,3% (1)	23
Humanos	100% (14)	0	0	0	0	14

* = espécie de *Staphylococcus* spp. *mecA* positivo

TABELA 2. Identificação das amostras de *Staphylococcus* spp., de equinos (n = 23) e humanos (n = 24) a partir do isolamento microbiológico e técnicas moleculares, HV – UNESP/Botucatu (2016).

Espécie	Número da amostra	Local (departamento)	Sexo	Idade	Tempo de internamento	Micro-organismo detectado	CLUSTER (PFGE)	MLST
Equino	18	CCGA	M	9m	1d	<i>S. hyicus</i>	C1	*
	19	CCGA	F	5a	1d	<i>S. aureus</i>	C4	*
	20	CCGA	M	2a	*	<i>S. pseudintermedius</i>	*	*
	30	CCGA	M	*	*	<i>S. hyicus</i>	C1	*
	33	CCGA	F	2m	4d	<i>S. pseudintermedius</i>	*	*
	35	CCGA	M	2a	2d	<i>S. hyicus</i>	C2	*
	40	RGA	F	9a	9a	<i>S. aureus</i>	C3	*
	41	CCGA	M	2a	8d	<i>S. hyicus</i>	C2	*
	49	RGA	M	1a	1a	<i>S. schleiferi</i>	*	*
	59	CCGA	F	5m	6d	<i>S. pseudintermedius</i>	*	*
	60	CCGA	F	2a	10d	<i>S. hyicus</i>	C3	*
	74	CGA	M	6a	3d	<i>S. aureus</i>	C3	*
	89	CCGA	F	7a	4d	<i>S. aureus</i>	C4	*
	93	CCGA	M	4a	1d	<i>S. hyicus</i>	C1	*
	97	CGA	F	1a	3h	<i>S. hyicus</i>	C1	*
	103	RGA	M	9a	2d	<i>S. schleiferi</i>	*	*
	106	CCGA	M	4a	2d	<i>S. hyicus</i>	*	*
	107	CCGA	M	1a	7d	<i>S. aureus</i>	C1	ST398
	108	CCGA	F	16a	5d	<i>S. pseudintermedius</i>	*	*
	110	CCGA	M	7a	6d	<i>S. pseudintermedius</i>	*	*
	119	CCGA	M	3a	4h	<i>S. hyicus</i>	C2	*
	121	CGA	M	16a	1a	<i>S. hyicus</i>	*	*
	129	CGA	M	18a	6a	<i>S. hyicus</i>	C3	*
Humano	H1	RGA	M			<i>S. aureus</i>	C5	*
	H4	RGA	M			<i>S. aureus</i>	C1	*
	H7	CCGA	M			<i>S. aureus</i>	C2	*
	H9	CCGA	M			<i>S. aureus</i>	*	ST398
	H16	CGA	M			<i>S. aureus</i>	*	*
	H18	RGA	M			<i>S. aureus</i>	*	*
	H20	RGA	M			<i>S. aureus</i>	C1	ST398
	H24	CCGA	M			<i>S. aureus</i>	C5	*
	H27	CCGA	M			<i>S. aureus</i>	C1	*
	H29	CCGA	F			<i>S. aureus</i>	*	*
	H30	CCGA	M			<i>S. aureus</i>	C1	*
	H31	CGA	F			<i>S. aureus</i>	*	ST398
	H33	CCGA	F			<i>S. aureus</i>	C2	*
	H35	CGA	F			<i>S. aureus</i>	*	

CCGA = Clínica Cirúrgica de Grandes Animais; CGA = Clínica de Grandes Animais; RGA = Reprodução de Grandes Animais; M = macho; F = fêmea; a = ano; m = mês; d = dia; h = hora; * = não informado/detectado.

Figuras

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36

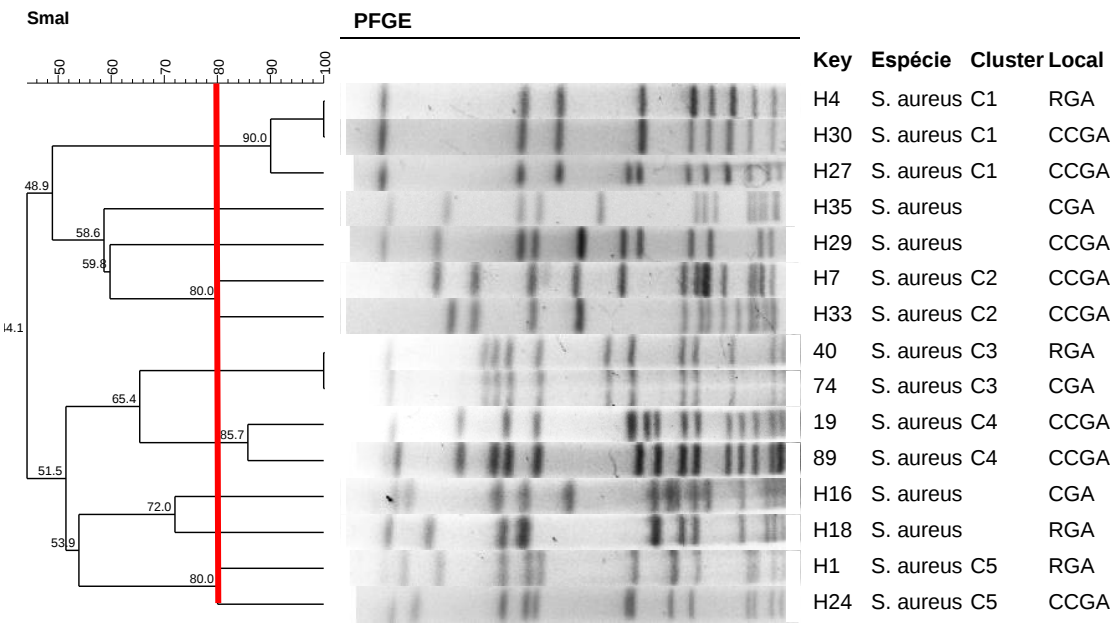


FIGURA 1. Dendrograma criado a partir do padrão eletroforético por PFGE (enzima de restrição *Sma*I) de 15 amostras de *S. aureus* (coeficiente de similaridade de DICE; método de clusterização: UPGMA) de equinos e humanos (identificação – H a frente do número da amostra). A linha vertical vermelha mostra o nível de delineamento de 80%.

1
2
3
4
5
6

7
8
9
10

11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40

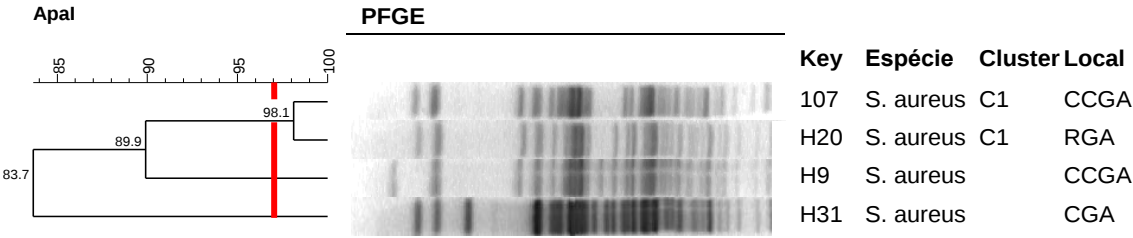


FIGURA 2. Dendrograma criado a partir do padrão eletroforético por PFGE (enzima de restrição *Apal*) de 4 amostras de *S. aureus* (coeficiente de similaridade de DICE; método de clusterização: UPGMA) de equinos e humanos (identificação – H a frente do número da amostra). A linha vertical vermelha mostra o nível de delineamento de 97%.

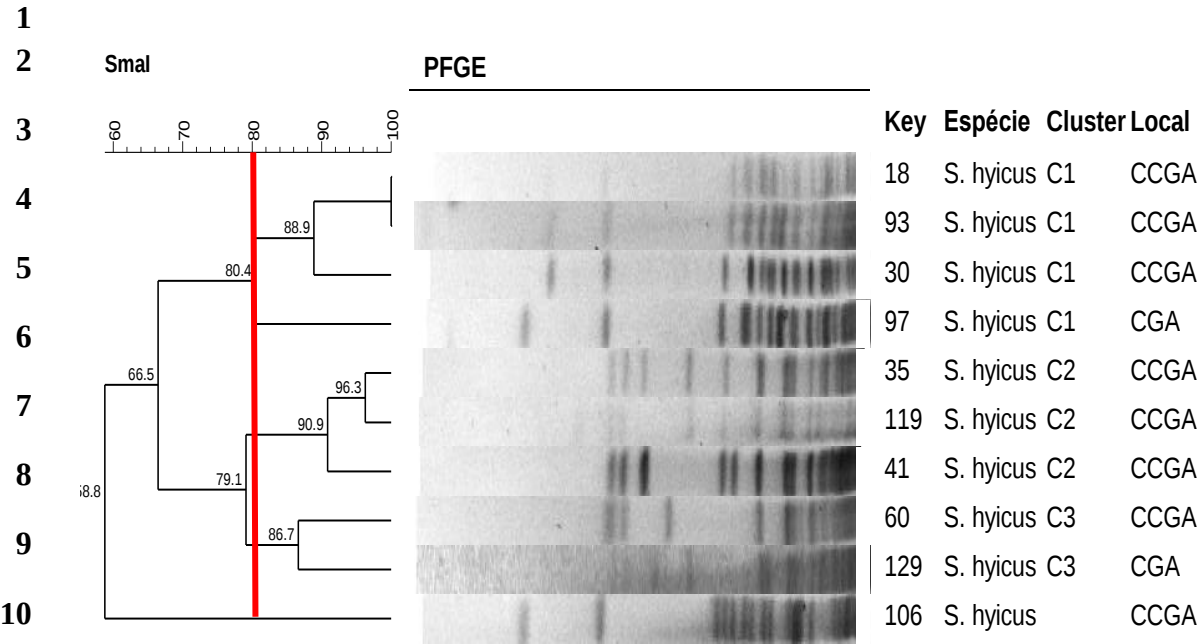


FIGURA 3. Dendrograma criado a partir do padrão eletroforético por PFGE (enzima de restrição *Sma*I) de 10 amostras de *S. hyicus* (coeficiente de similaridade de DICE; método de clusterização: UPGMA) de equinos. A linha vertical vermelha mostra o nível de delineamento de 80%.

1 Normas para publicação**2 Link:** <http://coral.ufsm.br/ccrrevista/normas.htm>**3****4****5****6****7****8****9****10****11****12****13****14****15****16****17****18****19****20****21****22****23****24****25****26****27****28****29****30****31****32****33****34****35****36****37****38****39****40****41**

