

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS
Programa de Pós-Graduação em Veterinária



**Pesquisa de *Staphylococcus* coagulase positiva
meticilina resistente e prospecção de plantas
medicinais para seu controle.**

Anna Beatriz Pizarro Chaffe

Pelotas, 2014

ANNA BEATRIZ PIZARRO CHAFFE

**Pesquisa de *Staphylococcus* coagulase positiva meticilina resistente e
prospecção de plantas medicinais para seu controle.**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Veterinária da Universidade Federal de Pelotas, como requisito parcial à obtenção do título de Doutor em Ciências - área do conhecimento: Diagnóstico, epidemiologia e controle das doenças infecciosas dos animais.

Orientador: Luiz Filipe Damé Schuch

Pelotas, 2014

Dados de catalogação na fonte:

Maria Beatriz Vaghetti Vieira – CRB 10/1032

Biblioteca de Ciência & Tecnologia - UFPel

C433p Chaffe, Anna Beatriz Pizarro

Pesquisa de *staphylococcus* coagulase positiva metilina resistente e prospecção de plantas medicinais para seu controle / Anna Beatriz Pizarro Chaffe. – 98f. : il. – Tese (Doutorado). Programa de Pós-Graduação em Veterinária. Universidade Federal de Pelotas. Faculdade de Veterinária. Pelotas, 2014. – Orientador Luiz Filipe Damé Schuch; co-orientador Silvia Regina Leal Ladeira.

**1.Veterinária. 2.*Staphylococcus spp.* 3.Mastite,cães
4.Coagulase positiva. 5.Metilina resistente. 6. Plantas
medicinais. I.Schuch, Luiz Filipe Damé. II. Ladeira, Silvia
Regina Leal. III. Título.**

Banca Examinadora:

Prof^a. Dra. Marlete Brum Cleff

Prof^a. Dra. Helenice Gonzalez

Prof^a. Dra. Fernanda de Rezende Pinto

Prof. Dr. Luiz Filipe Damé Schuch

Para meu esposo, minhas filhas
e a todos que contribuíram para realização
com carinho e gratidão dedico esse trabalho.

Agradecimentos

Nesta página muito especial deste trabalho, gostaria de agradecer a algumas pessoas, dentre as muitas que me ajudaram a realizá-lo.

Em especial ao meu esposo pelo incentivo e motivação, as minhas filhas queridas pelo apoio e auxílio nas horas difíceis.

As amigas e companheiras Dra. Silvia Ladeira, Médica Veterinária, Renata Costa Schramm e Carla Harwig pelo carinho e auxílio prestados ao longo desses anos e pelos momentos de descontração na hora do cafezinho.

Ao meu orientador Dr. Luiz Filipe Damé Schuch pela confiança e dedicação no desenvolvimento do trabalho.

Aos amigos e colegas de trabalho, em especial a Dóris Schuch, Roberta Motta Roselle Mendes, Isabel Madrid, Alexandre Vianna, Fernanda Almeida e Frankilin Neto pelo carinho e incentivo prestados.

A toda a equipe e grupo de pesquisa do laboratório de Doenças Infecciosas.

As amigas Fernanda Voigt e Katiúscia Bilhalva pela paciência nas horas difíceis.

As graduandas e estagiárias da Faculdade de Veterinária em especial Bianka Bonow e Lisiane Lessa pela amizade, dedicação e grande auxílio na realização do experimento.

Aos professores e funcionários do Departamento de Patologia da Faculdade de Veterinária pela colaboração prestada.

“A vida é uma peça de teatro que não permite ensaios.
Por isso, cante,
chore, dance, ria e viva intensamente, antes que a cortina se feche e a peça
termine sem aplausos”.

Charles Chaplin

Resumo

CHAFFE, Anna Beatriz Pizarro. **Pesquisa de *Staphylococcus coagulase positiva meticilina resistente* e prospecção de plantas medicinais para seu controle.** 2014. 93f. Tese de Doutorado – Programa de Pós-Graduação em Veterinária da Universidade Federal de Pelotas.

Staphylococcus spp é uma bactéria gram positiva ubíquo na natureza, freqüentemente presente na pele e mucosas de animais, inclusive nos seres humanos. Esse gênero está envolvido numa série de enfermidades localizadas, como infecções de feridas cutâneas ou mais profundas, mastite, otite externa e média; e em enfermidades sistêmicas, neste caso, fortemente relacionadas a procedimentos invasivos, tanto em medicina humana como veterinária. O objetivo deste trabalho foi avaliar a importância de *Staphylococcus coagulase positivo meticilina resistente* (MRSA) em cães hígidos domiciliados e não-domiciliados (mucosa nasal e anal), cães com enfermidades de pele (dermatite) e otite (local enfermo), leite de quartos bovinos mastísticos, estudantes do Curso de Medicina Veterinária - UFPel (mucosa nasal) e trabalhadores em saúde animal (mucosa nasal), bem como prospecção de plantas medicinais como alternativas de controle. Foram coletadas amostras de cães hígidos domiciliados com proprietário ($n \geq 83$) e cães hígidos não domiciliados ($n \geq 83$), estes últimos recolhidos ao módulo canil do Centro de Controle de Zoonoses da Prefeitura Municipal de Pelotas, RS. Cães com enfermidades de pele ou otite ($n > 50$) foram angariados junto a clínicas particulares e nos serviços de atendimento do Hospital Veterinário (HCV) da Faculdade de Veterinária - UFPel. Estudantes de veterinária do curso de Medicina Veterinária da UFPel ($n = 83$) e trabalhadores em saúde animal (n° não inferior a 50) foram convidados a participar do projeto. Amostras de leite de quartos bovinos mastísticos ($n > 500$) foram obtidas da rotina de trabalho do Laboratório de Doenças Infecciosas e de produtores da região sul do Rio Grande do Sul. Foi avaliada a atividade “*in vitro*” de extratos hidralcoólicos de 5 plantas com indicativo etnográfico, como carqueja (*Baccharis trimera*), capim-limão (*Andropogon ceriferus*), jambolão (*Syzygium cumini*), aroeira (*Schinus terebinthifolius raddi*), chinchilho (*Tagetes minuta L.*), frente a 9 cepas de *Staphylococcus coagulase positivo meticilina resistente* (MRSA), nas quais foram testadas através de uma triagem, com posterior cálculo da Concentração Inibitória Mínima (CIM) realizado pelo método de diluição em micro placa (Schuch, 2007). Os procedimentos laboratoriais foram executados no Laboratório de Doenças Infecciosas da Faculdade de Veterinária UFPel. Os resultados indicaram que amostras isoladas de cães hígidos domiciliados e não domiciliados apresentam *S. coagulase positiva* sendo que as amostras de cães não domiciliados apresentaram maior freqüência de *Staphylococcus spp.* (80%), *S. coagulase positiva* (44,3%) e *S. meticilina resistente* (MRSA) (10,3%), comparada às amostras de cães domiciliados. Os cães na faixa de um a seis anos apresentaram-se em maior número, sendo 107 amostras isoladas em relação às outras faixas de idade ($n=192$). Os cães de porte médio ($n = 93$) apresentaram maior percentual de *S. coagulase positiva* e resistência a meticilina. Não houve diferença significativa em relação ao sexo dos animais. Nas amostras isoladas de cães com otite ($n = 53$) / dermatite ($n = 9$) observa-se uma maior freqüência para *Staphylococcus coagulase positiva* e resistência a meticilina nas amostras coletadas de cães com otite. Foram também avaliadas as amostras *S. coagulase positivas* resistentes em relação à idade,

porte, sexo, pelagem e espécies encontradas. Em amostras de leite de bovinos com mastite (n = 497) observou-se um percentual de 32,8% de amostras isoladas *S. coagulase* positiva e 9,7% *S. coagulase* positivas meticilina resistentes (MRSA). Em 83 amostras nasais de alunos da graduação da Faculdade de Veterinária a maior representatividade de amostras *S. coagulase* positiva e *S. coagulase* positiva meticilina resistente ocorreu em alunos que estavam acima do 7° semestre, em relação ao total de amostras positivas para *Staphylococcus spp* (n=66) representando 20% de *S. coagulase* positiva resistência à meticilina. Dos 60 trabalhadores, 9% (n=43) eram do sexo feminino onde 7% (n=28) eram veterinários e 20% (n=5) serventes com amostras nasais *coagulase* positiva resistente à meticilina. Entre todas as amostras de *Staphylococcus coagulase* positiva, ocorreu uma maior frequência de *Staphylococcus pseudintermedius*, fazendo parte da normalidade da microflora cutânea, em particular as mucosas como nariz, boca e ânus.

Palavras chaves: *Staphylococcus spp*, mastite, cães, *coagulase* positiva, meticilina resistente, plantas medicinais.

Abstract

CHAFFE, Anna Beatriz Pizarro. **Pesquisa de *Staphylococcus coagulase positiva meticilina resistente e prospecção de plantas medicinais para seu controle***. 2014. 93f. Tese de Doutorado – Programa de Pós-Graduação em Veterinária da Universidade Federal de Pelotas.

Staphylococcus spp is a ubiquitous gram positive bacteria in nature, often present in the skin and mucosa of animals, including humans. This genre is involved in a number of localized diseases such as skin infections or deeper wounds, mastitis, otitis externa and media; and systemic diseases, in this case closely related invasive procedures, both in human and veterinary medicine. The objective of this study was to evaluate the importance of methicillin resistant *Staphylococcus coagulase positive* (MRSA) in healthy dogs domiciled and non- domiciled (nasal and anal mucosa, dogs with skin diseases (dermatitis) and otitis (patient site), milk room cattle with mastitis, students from Veterinary Medicine College - UFPel (nasal mucosa) and in animal health workers (nasal mucosa), as well as exploration of medicinal plants as alternative control. Were sampled healthy dogs domiciled with the owner (n≥83) and healthy dogs not domiciled (n≥83), these last ones carried to the module Kennel Center for Zoonosis Control of the City of Pelotas, RS. Dogs with skin diseases or otitis (n>50) were raised from the private clinics and Clinic Veterinary Hospital (CVH), from Veterinary College services – UFPel. Students from Veterinary Medicine - UFPel (n=83) and workers in animal health (number not less than 50) were invited to participate of research. Milk samples from the forth cattle with mastitis (n>500) were obtained from the routine work of the Infectious Diseases Lab and producers from southern Rio Grande do Sul to "in vitro" activity water-alcoholic extracts of 5 plants was evaluated ethnographic indicative as gorse (*Baccharis trimera*), lemongrass (*Andropogon ceriferus*), jambolan (*Syzygium cumini*), mastic (*Schinus terebinthifolius raddi*), Chinchilho (*Tagetes minuta L.*) against to 9 strains of *Staphylococcus coagulase positive methicillin resistant* (MRSA) which were tested through screening, with subsequent calculation of the minimum inhibitory concentration (MIC) performed by microplate dilution method (Schuch, 2007). Laboratory procedures were performed in the Infectious Diseases Lab, Veterinary College, UFPel. The results indicated that the samples from isolates of healthy dogs and not domiciled resident and resident dogs had a higher frequency of *Staphylococcus spp* (80 %), *S. coagulase positive* (44.3 %) and methicillin - resistant *S.* (MRSA) (10.3%) compared samples of pet dogs . Dogs in the range of 1 to 6 years showed up in greater numbers, being 107 samples isolated over other age groups (n=192). The medium-sized dogs (n = 93) showed a higher percentage of coagulase-positive *S.* and resistance to methicillin. There was no significant difference regarding to the sex of the animals. In isolates from dogs with otitis (n=53)/dermatitis (n=9) observed a higher frequency for *Staphylococcus coagulase positive* and methicillin resistance in the samples collected from dogs with otitis. We also rated the samples *S.* resistant coagulase positive in relation to age, size, sex, pelage and located species. In milk samples coming from cattle with mastitis (n=497) was observed a percentage of 32.8 % of isolated *S. coagulase positive* samples and 9.7 % *S. Methicillin Resistant Coagulase Positive* (MRSA). In 83 nasal samples from undergraduate students, Veterinary College, the most representative samples of *S. coagulase positive* and coagulase-positive methicillin resistant *S.* occurred in students

who were above the 7th semester in relation to total samples positive for *Staphylococcus spp* (n = 66) representing 20 % of coagulase-positive *S. methicillin* resistance. Among the 60 workers, 9 % (n=43) were female, where 7 % (n=28) were veterinarians, 20 % (n=5) servants with methicillin resistant coagulase positive nasal sample. Among all the samples of coagulase positive, were observed with most frequency *Staphylococcus pseudintermedius*, belonging to the usual microflora of the skin and mucous membranes, especially the nose, mouth and anus.

Key words: *Staphylococcus spp*, mastitis, dogs, coagulase - positive, methicillin resistant, medicinal plants.

Lista de Figuras

Figura 1	Concentração Bactericida Mínima (CBM) do extrato hidroalcoólico (EHA) de <i>Baccharis trimera</i> (Carqueja)	79
Figura 2	Concentração Bactericida Mínima (CBM) do extrato hidroalcoólico (EHA) de <i>Tagetes minuta</i> (Chinchilho).....	79
Figura 3	Concentração Bactericida Mínima (CBM) do extrato hidroalcoólico (EHA) de <i>Syzygiumcumini</i> (Jambolão).....	80
Figura 4	Concentração Bactericida Mínima (CBM) do extrato hidroalcoólico (EHA) de <i>Schinus terebinthifolius Raddi</i> (Aroeira).....	80

Lista de Tabelas

ARTIGO 1 Prevalência de *Staphylococcus spp* coagulase positiva resistentes à meticilina em amostras de cães da Zona Urbana do Município de Pelotas, RS.

Tabela 1 - Prevalência de *Staphylococcus spp*, *Staphylococcus coagulase positiva* e *Staphylococcus* meticilina resistente em amostras isoladas de cães hígidos não domiciliados e cães domiciliados do Município de Pelotas, RS..... 30

Tabela 2 - Prevalência *Staphylococcus spp.*, *Staphylococcus coagulase positiva* e *Staphylococcus* meticilina resistente em amostras isoladas relacionadas a idade, sexo, porte e administração medicamentosa (anti-inflamatório, antibiótico) em cães hígidos domiciliados e não domiciliados do Município de Pelotas, RS(2010-2013)..... 31

Tabela 3 - Taxonômia de *Staphylococcus* coagulase positiva isoladas de amostras de cães hígidos não domiciliados (n=97) oriundos do Canil Municipal de Pelotas; RS e de cães hígidos domiciliados (n=95) 32

ARTIGO 2 *Staphylococcus* coagulase positivo meticilina resistente em cães com otite/dermatite em Pelotas, RS.

Tabela 1 - Prevalência de *Staphylococcus spp.*, *S. coagulase positiva* e *S. meticilina* resistente de amostras isoladas de cães com dermatite ou otite externa de Clínicas particulares e atendimentos de rotina do Hospital Veterinário da Faculdade de Veterinária (HCV)-UFPel, Pelotas, RS 44

Tabela 2 - Prevalência de amostras *Staphylococcus spp.*, *S. coagulase positivas* e *S. meticilina* resistente isoladas de cães com Otite e dermatite em clínicas e Hospital Veterinário-HCV-UFPel por idade, porte, pelagem, sexo e uso de medicação (2011-2013) 45

Tabela 3 - Percentual de amostras *S. coagulase positiva* por espécies isoladas de cães com otite e dermatite em Clínicas e Hospital Veterinário HCV – UFPEL 46

ARTIGO 3 *Staphylococcus* coagulase positivo metilina resistente em leite de vacas com mastite.

Tabela 1 - Porcentagem de amostras *Staphylococcus spp*, *Staphylococcus* coagulase positivo e *S.coagulase* positiva metilina resistente em leite de vacas com mastite. 54

ARTIGO 4 *Staphylococcus* coagulase positivo metilina resistente em trabalhadores na área da saúde animal e alunos da Graduação da Faculdade de Medicina Veterinária-UFPel, Pelotas, RS.

Tabela 1 - Percentual da distribuição da frequência em Cluster 1 (1-3 semestres), Cluster 2 (4-6 semestres) e Cluster 3 (mais de 7 semestres) para *Staphylococcus spp*, *S. coagulase* positivas e *S. coagulase* resistentes a metilina em alunos da Faculdade de Veterinária-UFPel; RS..... 63

Tabela 2 - Percentual de amostras *Staphylococcus spp*, *S. coagulase* positiva e *S. coagulase* positiva resistentes à metilina em trabalhadores da área da saúde animal em Clínicas Veterinárias e Hospital Veterinário da Faculdade de Veterinária-UFPel (HCV) no Município de Pelotas; RS (2012-2013).....64

Tabela 3 - Percentual de amostras *Staphylococcus spp*, *S. coagulase* positiva e *S. coagulase* positiva resistentes à metilina em trabalhadores da área da saúde animal de acordo com o sexo, profissão, uso de antimicrobiano, proteção, tipo de proteção, a intensidade do contato com cães em Clínicas Veterinárias e Hospital Veterinário da Faculdade de Veterinária-UFPel (HCV) no Município de Pelotas; RS (2012-2013)..... 65

Lista de Abreviaturas

- CIM - Concentração Inibitória Mínima
- CMT - California Mastitis Test
- ECN - *Staphylococcus* coagulase negativos
- ECP - *Staphylococcus* coagulase positivos
- EHA - Extrato hidroalcoólico
- HCV - Hospital Veterinário da Faculdade de Veterinária
- MRSA - *Staphylococcus* meticilina resistentes
- MRSP - *Staphylococcus pseudintermedius* meticilina resistente
- MRSS - *Staphylococcus schleiferi* meticilina resistente
- PCR - Polymerase chain reaction (reação em cadeia da polimerase)
- MR - Meticilina resistente
- SRMA - *Staphylococcus aureus* resistente à meticilina
- UFPeI - Universidade Federal de Pelotas

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	15
2 OBJETIVOS	20
3 ARTIGOS	21
3.1 Artigo 1 Prevalência de <i>Staphylococcus spp</i> coagulase positiva resistentes à meticilina em amostras de cães da Zona Urbana do Município de Pelotas, RS.	22
3.2 Artigo 2 <i>Staphylococcus</i> coagulase positivo meticilina resistente em cães com otite/dermatite em Pelotas, RS.	37
3.3 Artigo 3 <i>Staphylococcus</i> coagulase positivo meticilina resistente em leite de vacas com mastite.	50
3.4 Artigo 4 <i>Staphylococcus</i> coagulase positivo meticilina resistente em trabalhadores na área da saúde animal e alunos da Graduação da Faculdade de Medicina Veterinária-UFPeI, Pelotas, RS.....	57
3.5 Artigo 5 Avaliação da atividade anti-microbiana de extratos hidroalcoólicos de plantas bioativas sobre <i>Staphylococcus</i> coagulase positivo meticilina resistente.....	70
4 CONCLUSÃO GERAL	87
5 REFERÊNCIAS.....	89
ANEXOS.....	91

1 INTRODUÇÃO

Em 1878, o estafilococo foi isolado e descrito, pela primeira vez, por Robert Koch, de um ferimento purulento. Em 1880, o médico escocês Alexander Ogston adotou o nome do gênero da palavra grega *staphylo* que significa cacho de uvas. Pasteur o multiplicou em meio de cultivo líquido e Ogston evidenciou sua patogenicidade para cobaias e camundongos (SOUZA, 2000).

Em 1884, Rosenbach admitiu duas espécies que as chamou de “*aureus*” e “*albus*”, relacionando a presença de pigmentos (SILVA, 2007).

Staphylococcus spp é uma bactéria Gram positiva ubíquo na natureza, frequentemente presente na pele e mucosas de animais, inclusive nos seres humanos (GREENE, 2006; LOEFFLER & LOYD, 2010). Segundo Euzéby (2013), há citação de 47 espécies e 24 subespécies incluídas no gênero *Staphylococcus*.

Esse gênero de bactéria é envolvida numa série de enfermidades localizadas como infecções de feridas cutâneas ou mais profundas, mastite, otite externa e média, ou sistêmicas, neste caso bastante relacionado a procedimentos invasivos, tanto em medicina humana como veterinária. Considerando exclusivamente as enfermidades de pele, podemos inferir tanto no lado estético, quanto na presença de doenças específicas que podem ser um fator de risco e contaminação para as pessoas que convivem diretamente com estes animais e ainda compartilham o uso de fômites. Desta forma a dermatologia em pequenos animais é uma área crescente na medicina veterinária, necessitando de abordagem detalhada desde a anamnese e exames complementares para o diagnóstico adequado, e as pesquisas nesta área têm sido motivadas visando o diagnóstico precoce, a manutenção da qualidade de vida e de protocolos de tratamentos inovadores. Existem muitas espécies de *Staphylococcus* descritas, genericamente, divididas pela presença da enzima coagulase, importante fator de patogenicidade (GREENE, 2006; LOEFFLER & LLOYD, 2010). A capacidade em produzir coagulase classifica as espécies em dois grupos: os *Staphylococcus* coagulase positivos (ECP), incluindo as espécies: *S. aureus* sub *aureus*; *S. aureus* sub *anaerobius*; *S. hyicus*; *S. lutrae*; *S. intermedius*; *S. pseudintermedius*; *S. schleiferi* sub

coagulans *S. delphiniae* e os *Staphylococcus* coagulase negativos (ECN), incluindo todas as demais espécies. Estas bactérias estão amplamente disseminadas, podendo ser considerados epidemiologicamente cosmopolitas. São membros residentes da microbiota normal da pele e das mucosas de humanos mamíferos e aves. Estão ainda frequentemente envolvidas em grandes variedades de infecções, tais como pneumonias, dermatites, piodermites, furunculoses, abscessos, conjuntivites, otites e septicemia (REMONATO, 2007).

A probabilidade dos animais serem portadores de *Staphylococcus spp* começou a ser explorada a partir de meados da década de 2000, tendo sido encontrado em várias espécies domésticas. O maior número de artigos encontrados tem os cães e gatos como espécies alvo, considerando o caráter de proximidade ao ser humano que os animais “pet” possuem (DEURENBERG, 2008). O potencial zoonótico dos *staphylococcus spp* vem sendo amplamente estudado e existem relatos de transmissão entre cães e proprietários (MENDES, 2011).

A convivência entre homem e animais de companhia, cães e gatos é cada vez mais intensa, formando laços afetivos importantes, o que tem determinado que estes animais tornem-se verdadeiros membros das famílias. Hoje independente do tamanho, aptidão dos cães, como guarda, caça, etc, e de terem ou não raça definida, eles são considerados cães de companhia, pois ao compartilharem a rotina diária com seus proprietários e desta forma o controle das enfermidades é extremamente importante (SILVA, 2007). Na Inglaterra, Loeffler *etal*, (2010) demonstraram a presença de *Staphylococcus* metilina resistente (SMRA) em veterinários, cães e seus proprietários.

Da mesma forma, Hanselman *et al.* (2009) no Canadá foram capazes de indentificar relação entre “pets” e seus proprietários para a presença de SMRA. Em cães, ao contrário de seres humanos e outras espécies domésticas, *S. pseudintermedius* é o mais comum *Staphylococcus* coagulase positiva encontrado, tanto em animais hígidos quanto em animais com enfermidades como dermatite e otite externa, embora diversos casos de infecção por SMRA serem descritos. Eles podem ser diferenciados pela capacidade de hidrolisar maltose e trealose. (GRIFFETH *et al.*, 2008; HANSELMAN *et al.*, 2009; FAIRES *et al.*, 2010)

Porém, a partir de um isolamento inicial em aborígenes da Austrália que nunca haviam utilizado antibióticos sintéticos, cepas de *staphylococcus* metilina resistente têm sido identificadas na microbiota de pessoas sem fatores de risco para desenvolvimento de resistência, indicando a circulação na comunidade de cepas metilina resistente (DEURENBERG & STOBBERING, 2008).

A resistência a metilina é conferida ao *Staphylococcus* através da inserção de um componente gênico móvel ao seu cromossomo, chamado *mecA*. Esse gene codifica para uma proteína de ligação da penicilina modificada (PBP 2a). O mecanismo de ação dos β -lactâmicos é através da capacidade de ligar a PBP nativa, impedindo a correta montagem do peptidoglicano da parede celular e, assim, rompendo a bactéria. A modificação introduzida pelo *mec A* impede essa ligação, tendo como consequência a sobrevivência do microrganismo. Esse gene pode ser transmitido horizontalmente entre bactérias e, ainda, pode aportar genes para resistência a outros grupos químicos, já tendo sido detectada resistência conferida a até sete princípios ativos diferentes. A detecção deste fragmento gênico por PCR é o método mais preciso para a identificação de SMRA (DEURENBERG & STOBBERING, 2009; YAMAMOTO *et al.*, 2010) Métodos de triagem para SMRA são utilizados baseados na sensibilidade do isolado a oxacilina, um análogo da metilina, seja por teste de diluição em caldo e cálculo da Concentração Inibitória Mínima ou por teste de difusão utilizando discos, sendo que segundo é mais rápido e econômico (BRANCO,2006).

A presença de SMRA em alimentos também apresenta risco à saúde pública já que favorece ao aparecimento de portadores e facilita a ocorrência de infecções. Um número importante de artigos tem sido publicado nos últimos anos demonstrando a presença de SMRA em animais de produção e alimentos de origem animal (de NEELING *et al.*, 2007; VAN DUIJKEREN, 2008; DE BOER *et al.*, 2009; MEEMKEN *et al.*, 2009). O leite bovino é um alimento de alto valor nutritivo, extremamente importante na dieta, principalmente de crianças. Para tal, deve ser produzido de forma segura e industrializada sobre rígidas condições de higiene. O uso abusivo de antibióticos na produção leiteira tem como grave consequência a geração de resistência em microrganismos. Apesar de ser relatado que SMR não é um patógeno comum no leite, a sua presença tem sido relatada recentemente (FAGUNDES, 2004). A pesquisa de

SMRA na matéria-prima leite deve ser uma importante ferramenta na segurança alimentar dos consumidores, dados do Brasil ainda são escassos. Gandra *et al.* (2009) detectarem cepas SMR em queijo e embutidos na região de Pelotas- RS.

Nos últimos anos, além do microorganismo ter demonstrado que o alto quadro infeccioso tem origem hospitalar, um número crescente de relatos de infecções de origem ambiental tem sido relatados (REMONATTO *et al.*, 2007) estes denominados como CA-MRSA e a bactéria de origem hospitalar denominada como HA-MRSA.

Muitas outras características conferem a *staphylococcus spp* maior ou menor patogenicidade, entre elas, fatores estruturais, produção de enzimas, toxinas e mecanismos de resistência a antimicrobianos. Já em 1942, dois anos após a introdução da penicilina para uso médico, foram identificadas cepas capazes de produzir penicilinase e resistir a doses terapêuticas do medicamento. Da mesma forma, em 1961, também dois anos após a introdução do medicamento, cepas resistentes a meticilina, um antibiótico β -lactâmico resistente a penicilinase, foram identificadas. Os *Staphylococcus* meticilina resistentes (SMRA) foram isolados em pacientes humanos hospitalizados e desde a década de 70 são os mais importantes microrganismos em infecções nosocomiais humanas.

A problemática referente aos profissionais da área de saúde, colonizados por microrganismos resistentes a múltiplas drogas, está em evidência no cenário mundial (MENDES, 2011).

A maioria dessas infecções não responde mais ao tratamento com os antimicrobianos anteriormente utilizados. O *Staphylococcus aureus* resistente a múltiplas drogas vem se disseminando nos serviços de saúde, com destaque aos resistentes à meticilina que repercutem em maior dificuldade de tratamento. Embora o SMRA seja agente tipicamente hospitalar, há relatos de sua disseminação na comunidade. (MOURA *et al.*, 2011)

Os dois principais fatores envolvidos no desenvolvimento da resistência aos antibióticos em bactérias são a pressão seletiva e a presença de genes de resistência (NEVES, 2007). *Staphylococcus aureus* resistente à meticilina (SRMA) transporte nasal na admissão ao hospital continua sendo um dos principais fatores de risco para a infecção subsequente. Em cães, ao contrário de seres humanos e outras espécies

domésticas, *Staphylococcus pseudintermedius* é o mais comum *Staphylococcus* coagulase positiva, encontrado tanto em animais hígidos quanto em animais com enfermidades como dermatite e otite externa, embora diversos casos de infecção por SMRA sejam descritos. Este gênero pode ser diferenciado pela capacidade de hidrolisar maltose e trealose (GRIFFETHET *et al.*, 2008; HALSELMAN *et al.*, 2009; FAIRES *et al.*, 2010).

A terapia antimicrobiana para infecções por este microorganismo inicialmente era simples. A primeira vez que um antimicrobiano foi utilizado clinicamente funcionou muito bem até a década de 1960, quando começaram as cepas de *Staphylococcus aureus*, a partir da descoberta da penicilina, se tornaram cepas resistentes a este antibiótico. (REMONATTO, 2007)

A prospecção de plantas medicinais que possam ser utilizadas preventiva ou curativamente para controle de SMRA parece ser uma alternativa viável e de baixo risco para animais, dependendo da demonstração da eficácia em estudos experimentais. Vários outros artigos reportam a atividade *in vitro* de extratos de plantas frente à SMRA (COUTINHO *et al.*, 2008; Da SILVA *et al.*, 2006; Da SILVA *et al.*, 2008).

A aroeira (*Schinus terebinthifolius Raddi*) tem sido estudada por vários pesquisadores pelo seu efeito cicatrizante e atividade antimicrobiana (LUCENA, 2006). O Chinchilho (*Tagetes minuta*) planta nativa da América do Sul é utilizada para tratamento de reumatismo, cólicas, vermes intestinais, digestiva e possui ação antimicrobiana. O jambolão (*Syzygium cumini*) cultivado em vários países com ação antiviral, anticarcinogênica e antibacteriana (OLIVEIRA, 2007). A carqueja (*Baccharis trimera*) na medicina popular é utilizada como diurética, tônica, antiinflamatória (DUARTE, 2006). O Capim limão (*Cymbopogon citratus*) conhecido nas regiões Sul e Sudeste do Brasil utilizado em práticas medicinais (VIDA, 2006).

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Avaliar a presença de *Staphylococcus* coagulase positiva metilina resistente em cães, amostras de leite de vacas com mastite, trabalhadores em saúde animal, alunos do curso de graduação da Faculdade de Medicina Veterinária – UFPel; RS e alternativas de controle com uso de plantas medicinais.

2.2 Objetivos específicos

- identificar a prevalência e relacionar a fatores de risco de *Staphylococcus* coagulase positiva metilina resistente em cães hígidos domiciliados e não domiciliados, bem como cães com otite e dermatite oriundos do Hospital Veterinário da Faculdade de Veterinária-UFPel (HCV) e de Clinicas particulares do Município de Pelotas, RS;
- avaliar a prevalência de *Staphylococcus* coagulase positiva metilina resistente na mucosa nasal de estudantes do curso de Medicina Veterinária-UFPel e trabalhadores em saúde animal;
- pesquisar a presença de *Staphylococcus* coagulase positiva metilina resistente em amostras de leite bovino fresco coletado de vacas com mastite;
- caracterizar gênero e espécie *Staphylococcus* coagulase positiva metilina resistente de acordo com as provas bioquímicas;
- testar a eficácia “*in vitro*” de extratos de plantas com indicativo etnográfico “antisséptico/desinfetante” frente a isolados de cães *Staphylococcus* coagulase positiva metilina resistentes.

3 ARTIGOS

- 3.1 Artigo 1 - **Prevalência de *Staphylococcus spp* coagulase positiva resistentes à meticilina em amostras de cães da Zona Urbana do Município de Pelotas, RS.**
- 3.2 Artigo 2 - ***Staphylococcus* coagulase positivo meticilina resistente em cães com otite/dermatite em Pelotas, RS.**
- 3.3 Artigo 3 - ***Staphylococcus* coagulase positivo meticilina resistente em leite de vacas com mastite.**
- 3.4 Artigo 4 - ***Staphylococcus* coagulase positivo meticilina resistente em trabalhadores na área da saúde animal e alunos da Graduação da Faculdade de Medicina Veterinária-UFPel, Pelotas, RS.**
- 3.5 Artigo 5 - **Avaliação da atividade anti-microbiana de extratos hidroalcoólicos de plantas bioativas sobre *Staphylococcus* coagulase positivo meticilina resistente.**

3.1 Artigo 1

Prevalência de *Staphylococcus spp* coagulase positiva resistentes à metilina em amostras de cães da Zona Urbana do Município de Pelotas, RS.

CHAFFE, A.B.P.; SCHUCH, L.F.D.; BOHM. B.C.; LEAL, L; LADEIRA S.R.; SCHRAMM R. C.

Artigo submetido à revista Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science

PREVALÊNCIA DE *STAPHYLOCOCCUS SPP* COAGULASE POSITIVA RESISTENTES À METICILINA EM AMOSTRAS DE CÃES DA ZONA URBANA DO MUNICÍPIO DE PELOTAS; RS.

Prevalence of coagulase positive staphylococci resistant to methicillin in dog samples of urban area of Pelotas; RS.

CHAFFE. A. B.P.¹; SCHUCH, L.F.D.²; BOHM. B. C.³; LEAL, L.³ LADEIRA S. R.⁴; SCHRAMM R. C.⁴.

¹ Bióloga – Secretaria Municipal da Saúde-Departamento de Vigilância em Saúde - Pós Graduada Faculdade de Veterinária – Universidade Federal de Pelotas; RS

³Graduada Faculdade de Medicina Veterinária-Universidade Federal de Pelotas; RS

² Prof. Dr. Doenças Infecciosas - Faculdade de Medicina Veterinária-Programa de Pós Graduação-Universidade Federal de Pelotas; RS

⁴Médica Veterinária – Laboratório Regional de Diagnósticos - LRD– Universidade Federal de Pelotas; RS

ABSTRACT

Rates of antibiotic resistance in companion animals rose over the years , as more patients are treated with broad-spectrum antibiotics without being sure of their real need , since tests for bacterial identification and antimicrobial susceptibility many often not performed (Guardabassi *et al* (2004), Guardabassi *et al* (2008) cited by ISHII *et al* , 2010). *Staphylococci* is a ubiquitous Gram positive bacteria in nature, often present on the skin and mucous membranes of animals. *Staphylococcus aureus* is highlighted by the following characteristics: they are Gram positive cocci, coagulase positive, β - hemolytic, maltose and mannitol positive and trainers of pigmented colonies (Quinn *et al.*, 1998). The aim of this work was to evaluate the sensitivity and prevalence of coagulase positive *Staphylococcus* isolated from anal and nasal mucosa of healthy dogs, non-domiciled and domiciled evaluating the possible risk factors. It was collected samples domiciled healthy dogs and dogs gathered on the streets to the module Kennel Municipal Center for Zoonosis Control of the City of Pelotas (MC - CCZ - PMP). Laboratory tests were performed at the Laboratory of Infectious Diseases, Faculty of Veterinary UFPel. All materials were sown on mannitol salt agar and incubated at 45 ° C for 24 to 48 hours as needed. After incubation, a colony

coconut gram positive and catalase positive been characterized using biochemical tests , such as coagulase MRVP (Voges - Proskauer) fermentation of maltose and trehalose (Schissler *et al* 2009) The sensitivity was evaluated by the oxacillin disk diffusion test (Quinn *et al.*, 1998). The results found in the nasal and anal samples (n =97) collected from healthy dogs not domiciled coming from the Municipal Kennel Pelotas; RS was observed that 78(80%) were identified as *staphylococci* which 43(44.3%) samples were characterized as coagulase positive *staphylococcus* and of these 10 (10.3%) samples as methicillin resistant coagulase. Of anal and nasal (n =95) conducted in 60 pet dogs (63.1%) samples collected were identified as *Staphylococcus spp* and of these 26(27.3%) samples were characterized as *Staphylococcus* coagulase positive where 5 (5.2%) samples were methicillin resistant *S.coagulase* no significant difference between the results obtained where $p>0.05$. In the study it can be observed that *Staphylococcus* species are common members of nasal microbiota and anal sados. *Staphylococcus* dogs isolated not domiciled dogs and pet dogs were resistant to methicillin.

INDEX TERMS: *Staphylococcus*, healthy skin, bacterial resistance.

1 Recebido em.....

2 Aceito para publicação em.....

Programa de Pós-graduação em Medicina Veterinária (PPGMV), Universidade Federal de Pelotas (UFPEL, RS, Brasil. ¹ Autor para correspondência: apizarro8@hotmail.com, Laboratório de Doenças Infecciosas –Faculdade de Veterinária –Campus Universitário-Capão do Leão, Pelotas; RS, Brasil.

RESUMO

As taxas de resistência aos antibióticos em animais de companhia se elevaram-se ao longo dos anos, pois cada vez mais os pacientes são tratados com antibióticos de amplo espectro sem a certeza da sua real necessidade, já que exames para a identificação bacteriana e a sua susceptibilidade antimicrobiana muitas vezes não são realizados. *Staphylococcus spp* é uma

bactéria Gram positiva ubíquo na natureza, frequentemente presente na pele e mucosas de animais. O objetivo do trabalho foi avaliar a prevalência de *Staphylococcus* coagulase positivos metilina resistentes na mucosa anal e nasal de cães hígidos não domiciliados e domiciliados avaliando os possíveis fatores de risco envolvidos. Foram coletadas amostras de cães hígidos domiciliados e cães recolhidos em via pública ao módulo do Canil Municipal do Centro de Controle de Zoonoses da Prefeitura Municipal de Pelotas (MC-CCZ-PMP). As provas laboratoriais foram executadas no Laboratório de Doenças Infecciosas da Faculdade de Veterinária da UFPel. Todos os materiais foram semeados em Agar manitol salgado e incubados à 37°C por 24 ou 48 horas conforme necessidade. Após a incubação, uma colônia foi classificada por suas características morfo-tintorais e bioquímicas. A sensibilidade à Oxacilina foi avaliada pela prova de difusão em disco (QUINN *et al.*, 1998). Foram encontradas 78 (80%) amostras identificadas como *Staphylococcus spp*, 43 (44,3%) amostras foram caracterizadas como *staphylococcus* coagulase positivas e 10 (10,3%) amostras como *staphylococcus* coagulase metilina resistentes em cães hígidos não domiciliados oriundos do Canil Municipal de Pelotas; RS. Das coletas (n=95) realizadas em cães domiciliados, 60(63,1%) amostras foram identificadas como *Staphylococcus spp*, 26 (27,3%) amostras foram caracterizadas como *Staphylococcus* coagulase positivas, 5 (5,2%) amostras foram *S.* coagulase metilina resistentes não havendo diferença significativa entre os resultados obtidos ($p>0,05$) entre os grupos. No estudo pode-se observar que espécies de *Staphylococcus* são membros comuns da microbiota nasal e anal de cães sadios. *Staphylococcus* isolados de cães não domiciliados e cães domiciliados apresentaram resistência à metilina.

TERMOS DE INDEXAÇÃO: *Staphylococcus spp*, coagulase positiva, doenças de cães, resistência bacteriana

1 INTRODUÇÃO

Todas as cepas de *staphylococcus spp* capazes de produzir coagulase foram colocadas, antes de 16 de Janeiro de 1985, em subespécies *S. aureus subsp aureus*. Desde esta data, os avanços taxonômicos permitiram identificar outras espécies ou subespécies que produziam ou podiam produzir coagulase, tais como: *S. aureus subsp aureus/anaerobius*; *S. delphini*; *S. hyicus*; *S. intermedius*; *S. lutrae* e *S. schleiferi subsp coagulans*. O *S. pseudintermedius* foi incluído nesta lista em 11 de julho de 2005. (SILVA, 2013)

S. pseudintermedius é um comensal da pele e mucosas e o mais importante patógeno isolado em amostras clínicas dos cães. Sendo considerado um patógeno comensal e oportunista nesta espécie (BANNOEHR; GUARDABASSI, 2012). A espécie constitui parte da microbiota cutânea e superfícies mucosas de cães hígidos. (SCOTT; MILLER; GRIFFIN, 2001; COX, 2006) De acordo com Saijonmaa-Koulumies e Lloyd (2002), a frequência de isolamento dessas bactérias é de 45% a 100% na pele e pelos de cães desprovidos de qualquer lesão cutânea. Os mesmos autores sugeriram que a microbiota estafilocócica residente dos cães parece ser adquirida da mãe no período neonatal, já nos primeiros sete dias de vida, contudo, mecanismos de defesa da pele (físicos, químicos e imunológicos) limitam a multiplicação dessas bactérias e impedem o surgimento de infecções cutâneas. (SCOTT; MILLER; GRIFFIN, 2001)

Staphylococcus coagulase positiva está primariamente associado com infecções da pele e ouvido, mas pode estar associado com todo tipo de infecção comunitária e hospitalar com difusão de amostras resistentes aos antimicrobianos que deram origem ao termo *S. pseudintermedius* resistente à Meticilina (SPRM) as quais tem complicado o tratamento consideravelmente (COUGHLAN, 2010).

É provável a transmissão de estafilococos resistentes a metilina entre os animais e o homem (SEGUIN *et al.* 1999; MANIAN 2003; VAN Duijkeren *et al.* 2004a; BAPTISTE *et al.* 2005; WEESE *et al.* 2006). Durante um congresso veterinário, nos EUA, foram isoladas cepas de MRSA do pessoal veterinário de diversos países (HANSEMAN *et al.* 2006).

A presença e potencial transmissão de cepas de *S. aureus* resistentes entre animais domésticos e o homem tem sido relacionados ao uso indiscriminado de antibióticos beta- lactâmicos por clínicos veterinários na terapêutica de animais de companhia sem realização prévia de um antibiograma, o que contribui para uma alteração proteica na PBP 2a (Penicillin binding protein), que possui resistência baixa à penicilinas. O mecanismo se deve à expressão do gene *mecA*, presente no Staphylococcal Cassete no cromossomo (SCCmec), levando ao perfil de resistência às penicilinas, cefalosporinas e carbapenens(FREITAS, 2013).

As taxas de resistência aos antibióticos em animais de companhia se elevaram ao longo dos anos, e esse aumento acompanhou a utilização mais frequente de antimicrobianos no tratamento de infecções nesses animais, pois cada vez mais os pacientes são tratados com antibióticos de amplo espectro sem a certeza da sua real necessidade, já que exames para a identificação bacteriana e a sua susceptibilidade antimicrobiana muitas vezes não são realizados. (GUARDABASSI *et. al.* 2004, GUARDABASSI *et. al.* 2008, ISHII, 2010) Métodos de triagem para *Staphylococcus* metilina resistente são utilizados baseados na sensibilidade do isolado a oxacilina, um análogo da metilina. O teste de difusão utilizando discos é mais rápido e econômico. (GRIFFETH *et al.*, 2008;SCHISSLER *et al.*, 2009)

Este estudo se justifica pela atualidade do problema de pesquisa e objetiva conhecer a situação epidemiológica de cães de *Staphylococcus* metilina resistentes coagulase positiva no Município de Pelotas, RS avaliando a sua importância em saúde animal.

2 MATERIAL E MÉTODOS

O modelo utilizado para este estudo foi transversal com amostragem intencional, obtidas de cães de vias públicas recolhidos ao módulo do Canil Municipal da Prefeitura Municipal de Pelotas com dois fins castração de fêmeas e risco de agressão a população, e de cães domiciliados da zona urbana de Pelotas, RS. Os cães

domiciliados foram obtidos por disponibilidade de proprietários e de cães levados a atendimento veterinário, sem lesões de pele ou mucosa.

A amostra foi calculada levando em consideração a população canina do Município de Pelotas, estimada em aproximadamente 70 mil cães, a partir da referência atualizada pela população humana (328.275 hab.) obtida pelo censo IBGE-2010, com prevalência do problema estimada em 10%, erro aceitável de 1% e intervalo de confiança de 99%. Este cálculo indicou que a amostra mínima a coletar deveria ser de 83 animais de cada grupo-rua e domiciliados (cálculo através do Programa Estatístico Epiinfo 6). Ao final, foram coletados 97 animais não domiciliados e 95 domiciliados. Dados demográficos e epidemiológicos foram recolhidos por meio de uma ficha incluindo origem, idade aproximada, raça, tipo de pelame, tamanho e nos domiciliados, proximidades com o homem, outras enfermidades, história de tratamento prévio, histórico de infecções em seres humanos compatível com *Staphylococcus*. Para prevalência e fatores de risco, comparações univariadas foram calculadas pelos Testes Frequência e Qui² pelo programa estatístico – Epi Info 6.

2.1 Procedimentos éticos

O Projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal da Universidade Federal de Pelotas, Faculdade de Veterinária sob o protocolo de nº 23110.000062/2013-01 e aprovado por este Comitê N°0312000000.

2.2 Procedimentos da coleta de dados

Os dados foram coletados com o preenchimento de fichas contendo dados epidemiológicos dos cães (anexo I e II) incluindo idade, porte, gênero e uso de medicação (antibiótico ou/e antiinflamatório) nos 15 dias anteriores à pesquisa.

2.3 Coleta de material

As amostras da região anal e nasal foram coletadas com suabes úmidos segundo descrito por (Coughlan *et al.*, 2010), sendo devidamente identificadas, acondicionadas e transportadas ao Laboratório de Doenças Infecciosas da Faculdade de Veterinária da UFPel.

A semeadura do material foi realizada no mesmo dia da coleta, em placas de petri contendo meio de cultura Ágar Manitol salgado seletivo (Mannitol Salt Agar Base - HMEDIA®) para *Staphylococcus spp.* previamente preparado e testado (BAPTISTE, 2005).

2.4 Isolamento e identificação de *Staphylococcus coagulase positivo* metilina resistente

Após a incubação, uma colônia de cada amostra indicando positividade na fermentação de manitol foi caracterizada e identificada pelos métodos bioquímicos segundo Quinn *et al.* (1994). Além disso, a resistência a metilina foi aferida para a todas as amostras isoladas através de antibiograma utilizando teste de difusão com discos de oxacilina à 1ug (Cefar, São Paulo, Brasil) conforme recomendado por Schissler *et al.*, 2009.

3 RESULTADOS

Os resultados serão expressos como animais positivos aqueles que os isolados forem *Staphylococcus coagulase positiva*. Nas amostras obtidas de cães hígidos não domiciliados oriundos do Canil Municipal de Pelotas, RS, em 78 (80%) amostras foram identificadas colônias compatíveis com *Staphylococcus spp*, onde 43 (44,3%) amostras foram caracterizadas como *Staphylococcus coagulase positiva* e, destas, 10 (10,3%) amostras foram metilina resistentes. Das coletas (n=95) realizadas em cães domiciliados, 60 (63,1%) amostras foram identificadas como *Staphylococcus spp* e

destas 26 (27,3%) amostras foram caracterizadas como *Staphylococcus coagulase* positivas onde 5 (5,2%) amostras foram *S.coagulase* metilina resistentes (Tabela 1).

Tabela 1 - Prevalência de *Staphylococcus spp.*, *Staphylococcus coagulase positiva* e *Staphylococcus metilina resistente* em amostras isoladas de cães hígidos não domiciliados e cães domiciliados do Município de Pelotas;RS (2010-2013).

	<i>Staphylococcus spp</i>	<i>S. coagulase positiva</i>	<i>S. coagulase positiva metilina resistente</i>	n
Cães ã domiciliados	78 (80%) A	43 (44,3%) A	10 (10,3%)A	97
Cães domiciliados	60 (63%) B	26 (27,3%) B	5 (5,3%) A	95
Total				192

Letras diferentes nas colunas indicam diferenças significativas ($p < 0,05$).

Nos cães oriundos do Canil Municipal ($n=97$) pode observar-se que houve um maior percentual de isolamento de amostras do gênero *Staphylococcus spp.* e maior percentual de amostras coagulase positivas isoladas em relação aos domiciliados ($p < 0,05$). Em relação ao fator resistência a metilina, o percentual de amostras isoladas dos cães do Canil (10,3%) é maior que as amostras isoladas dos cães domiciliados (5,35%), porém essa diferença não foi significativamente diferente.

Foram avaliadas durante as coletas amostras nasais em cães nas faixas de idade de 0 à 1, 1 à 6 e 7 à 10 anos, o porte dos cães como pequeno,médio e grande, sexo (machos e fêmeas) e o uso de medicação (anti-inflamatórios, antibióticos ou nenhuma) conforme a tabela 2.

Tabela 2- Prevalência *Staphylococcus spp.*, *Staphylococcus coagulase positiva* e *Staphylococcus* metilina resistente em amostras isoladas relacionadas à idade, sexo, porte e administração medicamentosa em cães hígidos domiciliados e não domiciliados do Município de Pelotas, RS (2010-2013).

Amostras isoladas de cães (%)				
n=192				
	<i>Staphylococcus spp.</i>	<i>S.coagulase positiva</i>	<i>S.coag. pos.metilina resistente</i>	n
Idade (0 à 1)	12 (63%)	5(26%)	2 (10%)	19
Idade (1 à 6)	76 (71%)	37 (34%)	10 (9,2%)	107
Idade (7 à 10)	49 (74%)	27 (40%)	3 (4,5%)	66
Porte pequeno	45(71%)	23 (53%)	5 (8,1%)	63
Porte médio	66(70%)	33(35%)	7 (7,5%)	93
Porte Grande	26(72%)	13(36%)	3(8,3%)	36
Machos	67 (70%)	35 (36%)	7 (7,4%)	95
Fêmeas	70(72%)	34(35%)	8 (8%)	97
Antiinflamatório	11(73%)	4(26%)	0(0%)	16
Antibiótico	58(65%)	27(30%)	8(9%)	89
Nenhum medicam	68(78%)	38(43%)	7(8%)	87

Não foram observadas diferenças significativas entre nenhuma das variáveis analisadas. A faixa etária mais velha apresentou menor percentual (4,55%) de isolamento de *Staphylococcus* coagulase positiva metilina resistente do que as

demais (0-1 ano – 10%, 1-5 anos – 9,2%), ainda que essa diferença não tenha sido significativamente resistente ($p>0,05$). Em relação ao porte e ao gênero, os percentuais observados de isolamento de SCPMR foram muito semelhantes. Animais submetidos a tratamento com antibióticos nos 15 dias anteriores a coleta não apresentaram diferença significativa em relação aqueles que não haviam recebido tratamento com antibiótico (9% e 8%, respectivamente).

As amostras isoladas *S. coagulase* positiva de cães domiciliados e não domiciliados foram caracterizadas bioquimicamente de acordo com Schissler *et al.*, 2009, conforme os resultados da tabela 3.

Tabela 3 - Espécies de *Staphylococcus* coagulase positiva isoladas de amostras de cães hígidos não domiciliados (n=97) oriundos do Canil Municipal de Pelotas; RS e de cães hígidos domiciliados (n=95), Pelotas; RS (2010-2013).

Espécie	Domiciliados n=95	Não domiciliados n=97
<i>S. pseudintermedius</i>	16 (61,5%)	0
<i>S. aureus sub. Aureus</i>	04 (15%)	11 (25%)
<i>S. aureus sub anaerobius</i>	05 (19,2%)	6 (13%)
<i>S. intermedius</i>	01 (3%)	3 (6%)

A caracterização dos isolados foi realizada de acordo com as provas bioquímicas SCHISSLER *et al.*, 2009 onde das 95 amostras isoladas de cães domiciliados 16/61,5% foram *pseudintermedius*, 4/15% *S. aureus sub. Aureus*, 5/19,2% *S. aureus sub anaerobius* e 1/3% *S.intermedius*. Em relação aos cães domiciliados não houve nenhuma amostra *Staphylococcus* coagulase positiva *S. pseudintermedius* isolada, 11/25% foram *S. aureus sub. Aureus*, 6/13% foram *S. aureus sub anaerobius* e 3/6% isolados de *S. intermedius*.

A frequência das diferentes espécies em relação às amostras de cães domiciliados e não domiciliados *S. coagulase* positiva demonstra um maior percentual em relação à presença de *Staphylococcus pseudointermedius*.

4 DISCUSSÃO

O *S.pseudointermedius* é um residente normal da pele canina saudável (ROSSER Jr, 2006), mas também é sabidamente o principal agente envolvido em infecções nesta espécie hospedeira (COX *et al* 2006). É considerado um patógeno comensal e oportunista na espécie canina (BANNOEHR, 2012). A espécie constitui parte da microbiota cutânea e superfícies mucosas de cães hígidos (SCOTT; MILLER; GRIFFIN, 2001; COX, 2006). De acordo com Saijonmaa-Koulumies e Lloyd (2002), a frequência de isolamento dessas bactérias é de 45% a 100% na pele e pelos de cães desprovidos de qualquer lesão cutânea. O predomínio deste patógeno sobre cepas de *S. aureus* provavelmente se deva ao caráter competitivo que existe naturalmente entre as bactérias.

As regiões anatômicas oral, nasal e anal parecem servir como reservatórios ocorrendo com grande frequência, parecendo assim ser uma bactéria nômade ou transitória. É relevante destacar a importância da via de transmissão e eliminação através da mucosa nasal, o que provavelmente favoreça a manutenção e resistência desses patógenos nas vias respiratórias além do microclima do focinho e alta competitividade com outros microrganismos nas fezes (SCHISLER *et. al.* 2009).

Comparando os resultados das amostras dos cães não domiciliados com os cães domiciliados, o percentual de isolamento de *Staphylococcus spp* coagulase positiva foi maior nos cães alojados no canil. Porém, ambos demonstraram a presença de bactérias resistentes sem diferença significativa na prevalência entre os grupos, embora em maior prevalência nos cães do canil. Esperava-se que os cães domiciliados tivessem maior pressão de seleção exercida pelo uso indiscriminado de antibióticos de mesmo grupo (penicilinas) ou o contato mais próximo com o ser humano.

Os abrigos são, de modo geral, um meio estressante para cães devido ao seu confinamento, isolamento social, novos ambientes, aglomeração, competição por

alimentos e má nutrição, tornando os animais que vivem nesses ambientes mais susceptíveis a diversas infecções (TUBER, 1999; HENNESSY, 2002; COPPOLA, 2006). Portanto, a relação entre cães de abrigo e o homem, sempre deverá ser objeto de preocupação e cuidados principalmente em ambientes de abrigo onde o contato estreito entre os animais e o homem pode possibilitar a contaminação horizontal.

Nos cães não domiciliados o fato talvez esteja relacionado à grande plasticidade das bactérias em diversos ambientes relacionados aos fatores ambientais e climáticos, associados ao comportamento gregário das matilhas. Em ambos os grupos de cães, pode haver relação ao possível contato com resíduos humanos, alimentos que podem conter tanto antibióticos quanto bactérias resistentes. Também, ressalta-se que as amostras de cães de rua são os recolhidos pelo CCZ e manipulados por veterinários, muitos tratados com antibiótico por serem recolhidos enfermos.

A frequência dessa transmissão ainda não é conhecida. Os cães são reservatórios dessas bactérias multidrogas resistentes e podem transmitir através de plasmídios os genes de resistência. É provável que o aumento da proximidade com esses animais facilite a transmissão, causando um grave problema de saúde pública (CRUZ, 2009). *Staphylococcus* metilina resistente (MRSA), se torna uma causa importante na comunidade hospitalar e infecções associadas em humanos, tornando-se cada vez mais reconhecido como um patógeno em animais de companhia (FREITAS, 2013).

A resistência à metilina, que é utilizada para avaliar a multirresistência aos betalactâmicos, foi pesquisada neste estudo pelo método de difusão em disco e detectada em 7,8% (15/192) do total das amostras resultado semelhante ao percentual encontrado no estudo de Jones *et al.* (2007), Nienhoff *et al.* (2011), Youn *et al.* (2011) e Proietti *et al.* (2012), nos quais a frequência de *Staphylococcus* resistentes à metilina (MRSP) variou de 7,4% a 41,4% das amostras avaliadas. Como o aumento da prevalência de MRSP em cães com pioderma superficial é um acontecimento relativamente recente (JONES *et al.* 2007, LOEFFLER *et al.* 2007, LUCIA *et al.* 2011), torna-se importante a avaliação local e periódica dos perfis de suscetibilidade.

Em um estudo realizado para investigar se a resistência aos antibióticos por cepas de *S. aureus* e *S. intermedius* variavam conforme algumas variantes como: local

de isolamento, sexo ou idade, demonstrou que as cepas de *S. intermedius* apresentaram maior frequência de resistência em cães adultos e machos em comparação com os jovens ou fêmeas (HOEKSTRA & PAULTON, 2002) o que não foi encontrado neste estudo.

5 CONCLUSÃO

Com base nos resultados do presente estudo, pode-se observar que espécies de *Staphylococcus* meticilina resistentes são membros comuns da microbiota normal de cães o que leva a necessidade de estudos mais detalhados sobre a transitoriedade desta bactéria no meio ambiente hospitalar e comunitário.

6 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

BAUER, A. W. Authentic susceptibility testing by a standardized single disk method American Journal Clinical Pathology, Philadelphia, v. 45, n. 4, p. 493-496, 1966.

BAPTISTE, K.E., Methicillin-resistant *staphylococci* in companion animals. Emerg Infect Dis 11, 1942-1944, (2005).

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

COUGHLAN, K.E., Olsen, K.E, Boxrud.D., BENDER, J.B, Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in resident animals of a long-term care facility. Zoonoses Public Health. 2010 May; 57(3):220-6.

CUNY,C., KUERMERTLE, J., STANEK, C., WILLEY, B., STROMMENGER, B. and WILTE, W. (2006). Emergence of MRSA infections in horses in a veterinary hospital: strain characterisation and comparison with MRSA from humans. Euro Surveill 11, 44-47.

CRUZ, A.R; PAES, AC, SIQUEIRA, AK. Perfil de sensibilidade de bactérias patogênicas isoladas de cães frente a antimicrobianos. Vet. e Zootec. 2012 dez.; 19(4): 601-610.

FREITAS, A. B.; *STAPHYLOCOCCUS AUREUS* RESISTENTES EM ANIMAIS DE COMPANHIA; Revista Eletrônica Novo Enfoque, ano 2013, v. 16, n. 16, p. 95 – 101, 2013.

GRIFFETH, G.C. Screening for skin carriage of methicillin-resistant coagulase-positive staphylococci and *Staphylococcus schleiferi* in dogs with healthy and inflamed skin. *Vet. Dermatol.*, v. 19, p. 142-149. 2008.

HANSELMAN, B.A.; KRUTH, S.A.; ROUSSEAU, J.; WEESE, J. S.; Coagulase positive *staphylococcal* colonization of humans and their household pets. *Canadian Veterinary Journal*, v. 50, p.954–958, 2009.

HOEKSTRA PAULTON, Em susceptibilidade antimicrobiana *in vitro* de estafilococos isolados de piodermite canina no Rio de Janeiro, Brasil -2002, *Braz J Microbiol* 2002 Jul-Set, 40 (3):. 490-494.

LOEFFLER, A., BOAG, A.K., SUNG, J., LINDSAY, J.A., GUARDABASSI, L., DALSGAARD, A., SMITH, H., STEVENS, K.B. (2005) Prevalence of Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* among staff and pets in a small animal referral hospital in the UK. *J. Antimicrob Chemother* 56, 692-697.

QUINN, P.J. *Clinical veterinary microbiology*. London: Mosby, 1994. 648p.
TUBER, D. S.; MILLER, D. D.; CARIS, K. A.; HALTER, R.; LINDEN, F.; HENNESSY, M. B. Dogs in animal shelters: problems, suggestions, and needed expertise. *Psychological Science*, Oxford, v. 10, n. 5, p. 379-386, 1999.

REMONATTO, G., CARDOSO, C.M., MARQUES, C.G., SILVA, A.E.B., GELATTI, L.C., LEITE C.F.M. MRSA: um patógeno emergente ; Irmandade Santa Casa de Misericórdia de Porto Alegre; 2007.

ROSSER JR., PETERSEN, A.D., WALKER, R.D., BOWMAN, M.M., SCHOTT, H.C., Antimicrobial Resistance in *Staphylococcus pseudintermedius* in the Norwegian Dog Population, *Microbial Drug Resistance*. March 2006, 15(1): 55-59. doi:10.1089/mdr.2009.0865.

SEGUIN, J.C., Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Outbreak in a Veterinary Teaching Hospital: Potential Human -to-Animal Transmission. *J Clin Microbiol* 37, 1459-1463, 1999.

SCOTT, D. W.; MILLER, H.W.; GRIFFIN, C. E. Muller & Kirk – Small animal dermatology. 6th. Philadelphia: Saunders, 2001. 1528 p.

SCHISLER, J.R.; Evaluation of clinical standards Institute interpretative criteria for methicillin-resistant *Staphylococcus pseudointermedius* isolated from dogs. *J. Vet. Diagn. Invest.*, v. 21, p. 684-688. 2009.

TALLY, F. P.; BARG, N. L. Estafilococos: abscessos e outras doenças. In: SCHAECHTER, M.; ENGLEBERG, C. N.; EISENSTEIN, B. I.; MEDOFF, G. *Microbiologia: mecanismos das doenças infecciosas*. 3. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2002. p. 120-127.

WEESE, J.S., DICK, H., WILLEY, B.M, McGeer, A., KREISWIRTH, B.N., INNIS, B. and LOW, D.E. (2006), Suspected transmission of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* between domestic pets and humans in veterinary clinics and in the household. Vet Microbiol 115, 148-155.

3.2 Artigo 2

STAPHYLOCOCCUS COAGULASE POSITIVA METICILINA RESISTENTE EM CÃES COM OTITE/DERMATITE EM PELOTAS; RS.

CHAFFE.A.B.P.; CONRAD .B. ;LESSA. L; SCHUCH. L.F.D.; LADEIRA.S.;SCHRAMM R.

Artigo submetido à revista Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science

STAPHYLOCOCCUS COAGULASE POSITIVA METICILINA RESISTENTE EM CÃES COM OTITE/DERMATITE EM PELOTAS; RS.

***(Methicillin resistant staphylococcus coagulase positive in dogs with otitis /
dermatitis in Pelotas; RS.)***

CHAFFE..A.B.P.¹; CONRAD .B. ²;LESSA. L.; SCHUCH.. L.F.D.³ ;LADEIRA. S ⁵; . SCHRAMM R. ⁵

¹ Bióloga – Secretaria Municipal da Saúde-Departamento de Vigilância em Saúde - Pós Graduada Faculdade de Veterinária –
Universidade Federal de Pelotas; RS

²Graduada Faculdade de Medicina Veterinária-Universidade Federal de Pelotas; RS

³ Prof. Dr. Doenças Infecciosas - Faculdade de Medicina Veterinária-Programa de Pós Graduação-Universidade Federal de Pelotas;
RS

⁵ Médica Veterinária— Laboratório Regional de Diagnósticos – Universidade Federal de Pelotas; RS

ABSTRACT

Samples from 62 dogs with 24 coming from private clinics and 38 dogs UFPEL-care Veterinary Hospital were obtained. All dogs were diagnosed with dermatitis and otitis externa. Animals with pain, pruritus, erythema, scaling, pustules and lesions in the skin paste were diagnosed with pyoderma and those with pain, pruritus, erythema, desquamation, and auricular otitis externa. The collection of clinical specimens was performed by veterinary surgeons who performed the diagnoses of animals. In isolates from dogs with dermatitis (n = 9) revealed that 55% of the samples were *Staphylococcus spp*, 33% *S. coagulase* positive and no strain was resistant to methicillin. In isolates from dogs with otitis (n = 53) 77% were *Staphylococcus spp*, coagulase-positive *S.* 41% and 17% were resistant to methicillin. In the range of 1 to 6 years of 33 samples 72% were *Staphylococcus spp*, 45% were *S. coagulase* positive and 18% showed resistance to methicillin. Regarding medium dogs 27 samples 66% were *Staphylococcus spp*, coagulase-

positive *S. coagulans*. 33% and 7% were resistant to methicillin voted in larger samples collected. Dogs with short hair were the majority, with 38 samples collected where 76% of these were *Staphylococcus spp*, 44% were *S. coagulans* positive and 15% were resistant to methicillin. Females were most collections in which 42 samples of females 69% were *Staphylococcus spp*, 35% were *S. coagulans* positive and 19% seem quite resistant to methicillin. The species found in the highest percentage were *S.intermedius* and *S.pseudointermedius*. Where 44% of dogs with otitis *S.pseudo intermedius* and 33% were *S.intermedius*. Regarding the use of medication most dogs made use of anti-inflammatory Where totaling 36 samples, 75% were *Staphylococcus spp*, *S. coagulans* positive and 11% were resistant to methicillin. There was no significant difference ($p > 0.05$) between isolated *Staphylococcus spp*, *S. coagulans*-positive and *S. coagulans*-positive *S. resistentes* methicillin in relation to the age, size, coat, sex, medication use variables. The susceptibility of the isolates in dogs with otitis front of resistance to oxacillin demonstrates concern about the overuse of antimicrobial and justifies periodic bacteriological analyzes in order to minimize bacterial resistance, possible therapeutic failures and also motivates the prudent antimicrobial treatment.

INDEX TERMS: *Staphylococcus spp*, ear infections, dermatitis, bacterial resistência.

1 Recebido em.....

2 Aceito para publicação em.....

Programa de Pós-graduação em Medicina Veterinária (PPGMV), Universidade Federal de Pelotas (UFPEL, RS, Brasil. ¹ Autor para correspondência: apizarro8@hotmail.com, Laboratório de Doenças Infecciosas –Faculdade de Veterinária –Campus Universitário-Capão do Leão, Pelotas; RS, Brasil.

RESUMO

Foram obtidas amostras de 62 cães sendo 24 oriundos de clínicas particulares e 38 cães de atendimentos do Hospital Veterinário - UFPEL. Todos os cães apresentavam diagnóstico de dermatite e otite externa. Os animais com dor, prurido, eritema, descamação, pústulas e lesões em colar na pele foram diagnosticados com piodermite e aqueles com dor, prurido, eritema,

descamação e secreção auricular com otite externa. A coleta dos espécimes clínicos foi realizada pelos médicos veterinários que realizaram os diagnósticos dos animais. Nas amostras isoladas de cães com dermatite (n=9) observou-se que 55% das amostras eram de *Staphylococcus spp*, 33% *S. coagulase* positiva e nenhuma amostra apresentou resistência à metilina. Nas amostras isoladas de cães com otite (n=53) 77% foram *Staphylococcus spp*, 41% *S. coagulase* positiva e 17% apresentaram resistência a metilina. Na faixa de 1 à 6 anos de 33 amostras 72% foram *Staphylococcus spp*, 45% foram *S. coagulase* positiva e 18 % apresentaram resistência á metilina. Em relação aos cães de porte médio de 27 amostras 66% foram *Staphylococcus spp*, 33% *S. coagulase* positiva e 7% foram resistentes á metilina considerados em maior amostragem coletada. Os cães de pelagem curta foram a maioria, sendo 38 amostras coletadas onde 76% destas foram *Staphylococcus spp*, 44% foram *S. coagulase* positiva e 15% resistentes à metilina. As fêmeas foram a maioria das coletas onde em 42 amostras de fêmeas 69% foram *Staphylococcus spp*, 35% foram *S. coagulase* positiva e 19% resistentes á metilina. Em relação ao uso de medicação a maioria dos cães fazia uso de anti-inflamatório onde no total de 36 amostras, 75% foram *Staphylococcus spp*, 44% *S. coagulase* positiva e 11% eram resistentes á metilina. As espécies encontradas em maior percentual foram o *S. pseudintermedius* e *S. intermedius*. Onde 44% de cães com otite foram *S.pseudintermedius* e 33% *S. intermedius*. Não houve diferença significativa ($p>0,05$) entre os isolados *Staphylococcus spp*, *S. coagulase* positiva e *S. coagulase* positiva resistentes à metilina em relação às variáveis idade, porte, pelagem, sexo, uso de medicação. A suscetibilidade dos isolados em cães com otite frente à resistência a metilina demonstra a preocupação em relação ao uso abusivo de antimicrobianos e justifica as análises bacteriológicas periódicas a fim de minimizar a resistência bacteriana, possíveis falhas terapêuticas e também motiva a antimicrobianoterapia prudente.

TERMOS DE INDEXAÇÃO: *Staphylococcus spp*, otite, dermatite, resistencia bacteriana

1 INTRODUÇÃO

Membros do gênero *Staphylococcus sp.* são amplamente disseminados e podem ser considerados epidemiologicamente ubíquos. Várias espécies de *Staphylococcus* fazem parte da microbiota da pele e mucosas (cavidade oral, das vias aéreas superiores, genitourinária e intestinal) de humanos e animais. Entretanto podem causar uma variedade de infecções oportunistas (LILENBAUM *et al.*; 2000; RICH; ROBERTS, 2004; SASAKI, *et al.*; 2007; HALNSELMAN *et al.* 2009; MOODDLEY *et al.* 2009).

Desde a introdução de antimicrobianos na prática da medicina moderna os *Staphylococcus* evoluíram em resposta a esta pressão. O uso indiscriminado de antimicrobianos, frequentemente determinado por clínico de pequenos animais sem a prévia realização de cultura bacteriana ou testes de suscetibilidade aos antimicrobianos (TSA), também tem contribuído para o aparecimento de cepas multiresistentes. Nas últimas décadas houve um aumento significativo da presença de *Staphylococcus* metilina resistente (MRSA) em animais domésticos. Apesar de alguns autores considerarem o potencial zooantropozoonótico da infecção muito limitado, houve constatação nos Estados Unidos do aumento da presença de cepas resistentes à metilina entre os anos de 2001 e 2005 em animais de companhia.

Atualmente, sabe-se que o principal agente etiológico envolvido no pioderma canino é o *S. pseudintermedius*, descrito por Devriese *et al.* em 2005. Até então, tal patógeno era referido como *S. intermedius* (DeBOER, 1990; MASON, 1991; HILL; MORIELLO, 1994; PELLERIN *et al.*, 1998), relatado pela primeira vez em 1976 por Hájek. Antes disso, esse *Staphylococcus* foi erroneamente identificado como *S. aureus*, o qual era apontado como principal causador de lesões cutâneas em cães, fato contestado por Ihrke (2005), que afirmou ser raro o isolamento de *S. aureus* a partir de piodermas nessa espécie. Cada vez mais, estudos demonstram que estas espécies devem também receber atenção (MORRIS *et al.*, 2006; SOARES, *et al.*; 2008).

Mesmo aquelas espécies isoladas de animais sadios são potencialmente patogênicas (COX, 2006). Segundo estatísticas da ANVISA, infecções por MRSA em humanos têm uma mortalidade 2,5 vezes maior que as infecções por *S.aureus* sensíveis à meticilina. Gêneros de *staphylococcus* coagulase positivos de animais apresentam considerável capacidade de transferir determinantes de resistência para cepas humanas e, por isso, as infecções por *S. aureus* multirresistentes em animais de companhia devem ser interpretadas como um problema de saúde pública (FREITAS *et al*,2013).

A otite externa é uma doença muito comum, sendo estimado que 5 à 20% dos cães sejam acometidos por esta enfermidade em algum momento de sua vida(ROUGIER, 2005). Os microrganismos mais comuns na etiologia da otite bacteriana incluem membros do gênero *Staphylococcus* principalmente o *Staphylococcus pseudintermedius*, e bastonetes gram negativos como *Pseudomonas aeruginosa*, *Proteus mirabilis*, *Klebsiella pneumoniae*, *Escherichia colli* (SCOTT *et al.*,2001). As otites caninas constituem um dos principais motivos de consultas a médicos veterinários. Além de ser uma afecção bastante comum nesta espécie, ela produz efeitos de grande desconforto tanto para o paciente quanto para o proprietário, tais como vocalização, nervosismo, agitação, dor, prurido, secreção e odor. Tal situação impele o proprietário à busca de uma cura rápida para seu animal de estimação (TULESKI, 2007).

O objetivo do presente trabalho foi isolar *Staphylococcus* de cães com otite ou dermatite e identificar a presença de cepas coagulase positiva, meticilina-resistentes.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Animais

As amostras de *Staphylococcus* foram coletadas de 62 cães sendo 24 oriundos de clínicas particulares e 38 cães de atendimentos do Hospital Veterinário (HCV) – UFPel onde foram coletados os dados epidemiológicos de cada animal

através de uma ficha (anexo III). Todos os cães apresentavam diagnóstico de dermatite ou otite externa. Os animais com dor, prurido, eritema, descamação, pústulas e lesões em colar na pele foram diagnosticados com piодermite e aqueles com dor, prurido, eritema, descamação e secreção auricular com otite externa. Os diagnósticos clínicos destas enfermidades foram realizados pelos médicos veterinários das clínicas que atenderam os animais. As análises de prevalência e fatores de risco foram realizados através do EPI INFO, 6.0.

2.2. Amostras bacterianas

Coletas dos espécimes clínicos

As amostras dos animais com diagnóstico clínico de piодermite foram obtidas do material presente sob as crostas com auxílio de suabes estéreis. No caso de animais com otite externa, o espécime clínico (secreção auricular) foi coletado com o auxílio de suabe estéril após anti-sepsia no entorno do local da coleta com álcool 70%. A coleta dos espécimes clínicos foi realizada pelos médicos veterinários que realizaram os diagnósticos dos animais. As amostras foram enviadas para o laboratório de Doenças Infeciosas da Faculdade de Veterinária na rotina dos diagnósticos sendo registradas em fichas contendo os dados epidemiológicos de cada animal.

2.3 Isolamento e identificação de amostras bacterianas

Os espécimes clínicos foram semeados em meio àgar manitol salgado (Mannitol Salt Agar Base - HMEDIA®) e incubados à 37°C por 48 h. A identificação bacteriana foi realizada com base nas características coloniais, morfo tintoriais (coloração de Gram) e bioquímicas, tais como: produção da catalase, produção de coagulase livre, produção de acetoina (Teste de Voges-Proskauer), fermentação de maltose e D-manitol (MAC FADDIN, 1997; BANNERMAN, 2003).

2.4 Determinação de resistência aos agentes antimicrobianos pelo método de difusão em disco

Todas as amostras bacterianas de *Staphylococcus spp* foram analisadas quanto à resistência aos agentes antimicrobianos pelo método de difusão de disco seguindo o padrão estabelecido pelo CLSI (2011) em Ágar Müller-Hinton (MicroMED®) onde as colônias foram semeadas em placas contendo o meio e discos de antimicrobiano (oxacilina 1µg) onde foram depositados com o auxílio de uma pinça. As placas foram incubadas a 35°C por 24 horas em aerobiose. Após o período de incubação, foi feita a leitura através dos diâmetros dos halos de inibição de crescimento onde foram medidos para interpretação dos resultados. As amostras consideradas resistentes eram as que possuíam um halo menor ou igual a 14 mm.

3 RESULTADOS

Tabela 1 - Prevalência de *Staphylococcus spp.*, *S. coagulase positiva* e *S. metilicina resistente* de amostras isoladas de cães com dermatite ou otite externa de Clínicas particulares e atendimentos de rotina do Hospital Veterinário da Faculdade de Veterinária (HCV) -UFPeI, Pelotas., RS.

	Amostras de cães isoladas (%)			n
	<i>Staphylococcus spp</i>	<i>S. coagulase positiva</i>	<i>S. coag.positiva metilicina resistente</i>	
Cães dermatite	5(55%)	3(33%)	0	9
Cães Otite	41(77%)	22(41%)	9(17%)	53

Nas amostras isoladas de cães com dermatite (n=9) observou-se que 55% (n=5) das amostras eram de *Staphylococcus spp*, 33% (n=3), *S. coagulase positiva* e

nenhuma amostra apresentou resistência à metilina. Nas amostras isoladas de cães com otite (n=53), 41% (n=22) eram *Staphylococcus spp*, 41% (n=22) eram *Staphylococcus coagulase positiva* e 17% (n=9) apresentaram resistência à metilina.

Tabela 2- Prevalência de amostras *Staphylococcus spp*, *S. coagulase positiva* e *S. metilina resistente* isoladas de cães com Otite e dermatite em clínicas e Hospital Veterinário-HCV-UFPel por idade, porte, pelagem, sexo e uso de medicação (2011-2013).

Amostras isoladas de cães com Otite e Dermatite (%)				
	<i>Staphylococcus spp.</i>	<i>S.coagulase positiva</i>	<i>S.coag. pos.metilina resistente</i>	n
Idade (0 à 1)	5 (62)	2 (25)	0 (00)	8
Idade (1 à 6)	24 (72)	15 (45)	6 (18)	33
Idade (7 à 10)	17(80)	8 (38)	3 (14)	21
Porte pequeno	17 (85)	10 (50)	2 (10)	20
Porte médio	18 (66)	9 (33)	2 (7)	27
Porte Grande	11 (73)	6 (40)	5 (33)	15
Pelagem curta	29 (76)	17 (44)	6 (15)	38
Pelagem média	14 (77)	6 (33)	3 (16)	18
Pelagem longa	3 (50)	2 (33)	0 (0)	6
Machos	17 (85)	10 (50)	1 (5)	20
Fêmeas	29(69)	15 (35)	8 (19)	42
Antiinflamatório	27(75)	16 (44)	4(11)	36
Antibiótico	14(77)	6 (33)	4 (22)	18
Nenhum medicamento	5(62)	3(38)	1(12)	8

Não houve diferença significativa entre as variáveis estudadas ($p>0,05$).

Na tabela 2 demonstra-se a prevalência de *Staphylococcus spp*, *Staphylococcus* coagulase positiva e SMRA isolados distribuídos nas diferentes características dos animais. Em nenhum deles encontrou-se evidências estatísticas de constituírem-se em fatores de risco. Fêmeas com otite foram mais prevalentes do que machos (19% versus 5%), assim como animais de grande porte (33%) em relação a animais de médio (7%) e pequeno porte (10%). *S. pseudintermedius* foi a espécie mais prevalente entre os coagulase positiva (11 isolamentos) assim como a que apresentou maior número de amostras resistentes a meticilina (4 isolados).

Tabela 3. Percentual de amostras *S. coagulase* positiva por espécies isoladas de cães com otite e dermatite em Clínicas e Hospital Veterinário HCV – UFPEL.

Espécie	Percentuais de amostras isoladas <i>Staphylococcus</i> coagulase positiva (n=62)	
	Totais / %	MRSA / %
<i>S. pseudintermedius</i>	11 (17)	4 (6,4)
<i>S.aureus sub. Aureus</i>	2 (3)	2 (3,2)
<i>S. intermedius</i>	4 (6,4)	3 (4,8)
<i>S. sheleiferi sub coagulase</i>	1 (1,6)	0

Não houve isolados de amostras *S. coagulase* meticilina resistentes (MRSA) em cães com dermatite oriundos de atendimentos em Clinicas particulares e Hospital Veterinário (HCV)-UFPel.

4 DISCUSSÃO

No presente estudo em amostras coletadas de cães com otite e dermatite observou-se maior freqüência de *Staphylococcus spp* em cães com otite em relação ao

total de amostras coletadas (n=62). O *Staphylococcus pseudintermedius* foi o patógeno isolado em maior frequência, presente em 17% das amostras coletadas otite/dermatite.

A resistência à metilina, que é utilizada para avaliar a multirresistência aos beta-lactâmicos, foi pesquisada neste estudo pelo método de disco-difusão e detectada em 6,4% (4/62) dos isolados de *S. pseudintermedius* metilina resistentes (MRSP), resultado inferior aos de Jones *et al* (2007), Nienhoff *et al* (2011), Youn *et al* (2011) e Proietti *et al* (2012), nos quais a frequência de *S. pseudintermedius* resistentes à metilina (MRSP) variou de 7,4% a 41,4% das amostras avaliadas. Como o aumento da prevalência de MRSP em cães que é um acontecimento relativamente recente (Jones *et al.* 2007, Loeffler *et al.* 2007, Lucia *et al.* 2011), torna-se importante a avaliação local e periódica dos perfis de suscetibilidade.

A RM (Metilina resistente) se detecta com frequência crescente em medicina veterinária e terá um impacto substancial sobre a forma de tratamento das doenças cutâneas causadas por espécies estafilocócicas no futuro. Descreveu-se RM em *Staphylococcus aureus* metilina resistente (adquirido em hospital ou em comunidades HA-MRSA/hospitais & CA-MRSA/comunidades), *Staphylococcus pseudintermedius* metilina resistente (MRSP), e *Staphylococcus schleiferi* metilina resistente (MRSS). No nosso estudo, também foram encontradas amostras resistentes nas espécies *S. pseudintermedius*, *S. aureus* e *S.intermedius*.

5 CONCLUSÃO

Pode-se concluir que os isolados de *Staphylococcus spp* em cães com otite apresentaram elevado percentual em relação aos isolados de cães com dermatite.

A suscetibilidade dos isolados de cães com otite relacionados a resistência à metilina apresentaram um maior percentual em comparação aos isolados de cães com dermatite.

A identificação de *Staphylococcus* metilina resistente na população canina estudada justifica análises bacteriológicas de cães com dermatite e otite externa, a fim de minimizar resistência bacteriana, possíveis falhas terapêuticas e também motiva a antimicrobianaoterapia prudente.

6 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

DEBOER, D. J. Canine atopic dermatitis: new targets, new therapies. Madison: American Society for Nutritional Sciences, 2004.

FREITAS, A. B.; *Staphylococcus aureus* resistentes em animais de companhia; Revista Eletrônica Novo Enfoque, ano 2013, v. 16, n. 16, p. 95 – 101,2013.

GORMAN, N. T. Imunologia. In: ETTINGER, S.J.; FELDMAN, E. C. Tratado de medicina interna veterinária. 4.ed. São Paulo: Manole, 1997. v. 2, p. 2735-2765.

HANSELMAN,B.A.; KRUTH,S.; WEESE,J.S. Methicillin Resistent of Staphylococcal colonization in dogs entering a veterinary teaching hospital .Veterinary Microbiology. 126,277-81.2008.

LILEBAUN,W;VERAS,M;BLUM,E.;SOUZA.G.N.Antimicrobial susceptibility of staphylococci isolated from otitis externa in dogs. Letters in Applied Microbiology 31, 42-45.2000.

MANIAN, F.A. (2003) Asymptomatic nasal carriage of mupirocin-resistant, Methicillin - resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) in a pet dog associated with MRSA infection in household contacts. Clin Infect Dis 36, E26-E28.

MARSELLA, R.; OLIVRY, T. The ACVD task force on canine atopic dermatitis (VII): mediators of cutaneous infammation. Veterinary Immunology and Immunopathology, Amsterdam, v. 81, n. 3-4, p. 205-213, 2001a.

MOODLEY,A.;STEGGER,M.;ZAKOUR,N.L.B.;ITZGERALD,J.R.;GUARDABASSI,L.. Taden repeat sequence analysis os staphylococcal protein A (spa) gene in methicilin resistant *Staphylococcus pseudointermedius*. Veterinary Microbiology 135,320-326. 2009.

MORRIS, D.O.; ROOK, K.A.;SHOFER,F.S.;RANKIN, S.C.; Screening of *Staphylococcus intermedius* and *Staphylococcus schleiferi* isolates obtained from small companion animals for antimicrobial resistance: a retrospective review of 749 isolates (2003-4).Veerinary Dermatology 17(5),332-7,2006.

OLIVRY, T.; DEBOER, D. J.; GRIFFIN, C. E.; HALLIWELL, R. E. W.; HILL, P. B.; HILLIER, A.; MARSELLA, R.; SOUSAG, C. A. The ACVD task force on canine atopic dermatitis: forewords and lexicon. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, Amsterdam, v. 81, n. 3-4, p. 143-146, 2001.

PRESCOTT, J.F.; HANNA, W.J.B.; SMITH, R.R.; DROST, K. Antimicrobial drug use and resistance in dogs. *Canadian Veterinary Journal* 43, 107-116. 2002.

RICH, M.; ROBERTS, L.; Methicillin-resistant staphylococcus aureus isolates from companion animals. *Veterinary Record* 154, 130-2004.

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

SASAKI, T.; KIKUCHI, K.; TANAKA, Y.; Reclassification of phenotypically identified *Staphylococcus intermedius* strains. *Journal of Clinical Microbiology* 45(9), 2770-2778. 2007.

SOARES, L.C.; PEREIRA, I.A.; COELHO, S.M.O.; CUNHA, C.M.M.; OLIVEIRA, D.F.B.; MIRANDA, A.N.; SOUZA, M.M.F. Caracterização fenotípica da resistência a anti microbianos e detecção do gene *mecA* em *Staphylococcus spp.* coagulase negativos isolados de amostras animais e humanas. *Ciência Rural* 38(5). 2008.

SCOTT, D.W.; MILLER, H.W.; GRIFFIN, C.E. Muller & Kirk – Small animal dermatology. 6th. Philadelphia: Saunders, 2001. 1528 p.; 2011.

SOUZA, T.M.; FIGHERA, R.A.; SCMIDT, C.; RÉQUIA, A.H.; BRUM, J.S.; MARTINS, T. M., Prevalência das dermatopatias não-tumorais em cães do município de Santa Maria, Rio Grande do Sul (2005-2008). *Pesquisa Veterinária Brasileira*, v. 29, n. 2, p. 157-162, 2009.

3.3 Artigo 3

COMUNICAÇÃO CURTA

***Staphylococcus* coagulase positivo metilina resistente em leite de vacas com mastite.**

SHORT COMMUNICATION

Methicillin resistant *Staphylococcus* coagulase positive in milk from cows with mastitis.

A.B.P. CHAFFE; B. CONRAD; L. LESSA; L.F.D.SCHUCH ; S.LADEIRA; R. SCHRAMM

Artigo submetido à Revista Ars Veterinária- Jaboticabal-SP

COMUNICAÇÃO CURTA

***Staphylococcus* coagulase positivo meticilina resistente em leite de vacas com mastite.**

SHORT COMMUNICATION

Methicillin resistant *Staphylococcus* coagulase positive in milk from cows with mastitis.

A.B.P. CHAFFE¹; B. CONRAD²; L. LESSA; L.F.SCHUCH³ ; S.LADEIRA⁵; R. SCHRAMM⁵

¹ Bióloga – Secretaria Municipal da Saúde-Departamento de Vigilância em Saúde - Pós Graduada Faculdade de Veterinária – Universidade Federal de Pelotas; RS

²Graduada Faculdade de Medicina Veterinária-Universidade Federal de Pelotas; RS

³ Prof. Dr. Doenças Infecciosas - Faculdade de Medicina Veterinária-Programa de Pós Graduação-Universidade Federal de Pelotas; RS

⁵ Médica Veterinária— Laboratório Regional de Diagnósticos – Universidade Federal de Pelotas; RS

RESUMO

Entre as doenças que afetam o rebanho leiteiro a mastite ocupa um lugar de destaque, reduzindo a produção, alterando a qualidade do leite e apresentando riscos para a saúde pública. O uso indiscriminado de antibióticos no tratamento da mastite pode levar a problemas como a resistência de microrganismos e a presença de resíduos no leite que pode afetar os consumidores e gerar problemas econômicos no setor de laticínios. Os objetivos do estudo foram avaliar a presença de *Staphylococcus* coagulase positiva resistente à meticilina (MRSA) em amostras de leite bovino fresco, coletado de vacas com mastite e estimar a prevalência de MRSA. Em 497 vacas em lactação com mastite subclínica foi avaliada a presença de MRSA através de diagnóstico laboratorial de rotina intencional de doenças infecciosas. As amostras foram caracterizadas por métodos bioquímicos tradicionais, VP (Voges - Proskauer), catalase, coagulase, fermentação de trealose e maltose. Das amostras coletadas (n = 497) 52,3% foram caracterizados como *Staphylococcus spp*, 32,8% eram *S. coagulase* positiva e 9,7% eram resistentes à meticilina. A resistência à meticilina observada nesta pesquisa, destaca a importância da avaliação do perfil microbiológico e do perfil de sensibilidade aos antibióticos em todas as cepas isoladas, antes do tratamento do animal, visando o uso criterioso desses medicamentos no tratamento de animais com mastite.

Palavras-chave: . Antibiótico, gado, resistência a meticilina (MRSA).

SUMMARY

Among the diseases affecting dairy herd mastitis occupies a prominent place, reducing output by changing the quality of milk and posing risks to public health. The indiscriminate use of antibiotics in the treatment of mastitis can lead to problems such as resistance of microorganisms and residues in milk that may affect consumers and generating economic problems in the dairy sector. The study objectives were to evaluate the presence of coagulase positive methicillin-resistant (MRSA) in samples of fresh bovine milk collected from cows with mastitis and to estimate the prevalence of MRSA. In 497 dairy cows with subclinical mastitis has been assessed by the presence of MRSA in routine laboratory diagnosis of infectious diseases intentional. The samples were characterized by traditional biochemical methods, VP (Voges - Proskauer), catalase, coagulase, fermentation of trehalose and maltose. Of the collected samples (n=497) 52.3% were characterized as *Staphylococcus spp*, 32.8% were *S. coagulase* positive and 9.7% were resistant to methicillin. The methicillin resistance observed in this study high lights the importance assessing the microbiological profile and antibiotic susceptibility profile assessing the microbiological profile and antibiotic susceptibility profile for all strains isolated before treatment of the animal, targeting the judicious use of these drugs in treating animals with mastitis.

Keywords: Antibiotic, cattle, methicillin resistance (MRSA).

1 Departamento científico – Doenças Infecciosas.

* Endereço para correspondência: Faculdade de Veterinária – Campus Universitário, Prédio 1. CEP 96010-900 Universidade Federal de Pelotas - e-mail: apizarro8@hotmail.com
2 Faculdade de Veterinária /Universidade Federal de Pelotas –UFPEL)

Introdução

O leite é considerado um dos alimentos mais completos da natureza por seu notável valor nutricional; com uma composição rica em proteínas, vitaminas, gordura, carboidratos, sais minerais e água, que são essenciais aos seres humanos (KHAN, 2006). Em 2010, o Brasil foi classificado como o quarto maior produtor de leite do mundo, com 30.715.500 toneladas de leite produzidos (FAO, 2012b). A produção de leite está aumentando progressivamente e com isso vem surgindo uma maior preocupação por parte dos consumidores, com a segurança de alimentos, o que amplia cada vez mais as exigências de produtos com qualidade. Alguns fatores como a alimentação, manejo e a saúde dos animais podem afetar a qualidade do leite (MARTINS, 2010).

A mastite é a doença mais prevalente nos rebanhos leiteiros, e resulta em perdas financeiras significantes associadas à redução da produção, despesas com suporte veterinário, gastos com tratamentos intra-mamários e descarte do leite. Em vacas com mastite a qualidade do leite está comprometida com as alterações na composição físico-química e organoléptica, as elevadas contagens de células somáticas e contagens bacterianas e com a presença de resíduos de antimicrobianos (KHAN; KHAN, 2006).

Martins *et al.* (2010) observaram que *S. aureus* foi um dos patógenos, mais isolados tanto em mastites clínicas, como em mastites subclínicas. Esses microrganismos podem causar mastite clínica com sinais locais ou sistêmicos que variam de moderados a sérios, como a gangrena dos quartos mamários. Estes podem estar relacionados também com mastites subclínicas que normalmente tornam-se mastites crônicas (JAIN, 1979; TAPONEN; PYÖRÄLÄ, 2008). As infecções intramamárias causadas por *S. aureus* apresentam implicações importantes na saúde pública, tendo em vista que suas toxinas podem ser excretadas no leite e permanecerem estáveis nos produtos oferecidos ao consumidor (FAGUNDES; OLIVEIRA, 2004).

O trabalho teve o objetivo de detectar a ocorrência de *S. aureus* meticilina resistente em amostras de leite oriundos de vacas com mastite, foi realizada uma amostragem intencional totalizando 497 amostras de leite enviadas a rotina de diagnóstico de mastite do Laboratório de Doenças Infecciosas da Faculdade de Veterinária-UFPel; RS. Dados como origem, tipo de criação, histórico de tratamento foram coletados e registrados (Anexo IV). Os diagnósticos da mastite clínica e subclínica foram realizados pelo teste da caneca telada e pelo California Mastitis Test (CMT), respectivamente. As amostras de leite de cada quarto mamário positivo, foram coletadas em frascos estéreis, com os devidos cuidados de higiene e antisepsia. As amostras foram acondicionadas em caixa isotérmica, transportadas sob refrigeração de aproximadamente 4°C, e encaminhadas ao Laboratório Doenças Infecciosas, onde foram semeadas em meio ágar manitol salgado (Mannitol Salt Agar Base - HMEDIA®) e incubadas a 37°C por 48 h.

A identificação bacteriana foi realizada com base nas características coloniais, morfotintoriais (coloração de Gram) e bioquímicas, tais como: produção da catalase, produção de coagulase livre, produção de acetoina VP (Teste de Voges-Proskauer), fermentação de maltose e D-manitol (MAC Faddin, 1997; Bannerman, 2003). Todas as amostras bacterianas caracterizadas como *Staphylococcus* coagulase positiva foram analisadas quanto à resistência à meticilina pelo método de difusão de disco. As colônias foram semeadas seguindo o padrão estabelecido pelo

CLSI (2011) em placas contendo o meio àgar Müller Hinton Agar (Micro MED®) e discos de antimicrobiano (oxacilina 1µg) onde foram depositados com o auxílio de uma pinça. As placas foram incubadas a 35°C por 24 horas em aerobiose. Após o período de incubação, foi feita a leitura através dos diâmetros dos halos de inibição de crescimento onde foram medidos para interpretação dos resultados. As amostras consideradas resistentes eram as que possuíam um halo menor que 14 mm e sem a presença de halo. As avaliações foram registradas e avaliadas conforme tabela 1.

Tabela 1- Porcentagem de amostras *Staphylococcus spp*, *Staphylococcus coagulase positivo* e *S. coagulase positiva* metilicina resistente em leite de vacas com mastite (n=497) (2011-2013).

<i>Staphylococcus spp</i> (n=260)	<i>S. coagulase positiva</i> (n=163)	<i>S.coagulase (MRSA)</i> (n=48)	n
52,3%	32,8%	9,7%	
Total			497

Das 497 amostras de vacas com mastite 52,3% (260/497) foram caracterizadas como *Staphylococcus spp*, 32,8% (163/497) *S. coagulase positiva* e 9,7% (48/497) *S. coagulase positiva* resistentes á metilicina.

Os antibióticos beta-lactâmicos estão entre os mais usados internacionalmente em medicina humana e veterinária (BRÍÑAS *et al.*, 2002). A resistência a esses antibióticos pode ser uma consequência do uso indiscriminado desses medicamentos, que são frequentemente utilizados no tratamento de mastites (COELHO *et al.*, 2009).

A infecção do homem pelo consumo de produtos como o leite contaminado com linhagens “MRSA” de origem animal é possível e, uma vez ocorrida à transferência interespecie, estes microrganismos podem tornar-se disseminados no meio animal (SANTOS *et al.*, 2005).

Conclusão

Os resultados encontrados na presente pesquisa evidenciaram a presença de *Staphylococcus* meticilina resistente em amostras de leite de vacas com mastite. O isolamento de *Staphylococcus* coagulase positiva resistentes à meticilina pode se tornar um problema à saúde pública.

A resistência à meticilina observada nesta pesquisa destaca a importância da avaliação do perfil microbiológico e do perfil de sensibilidade aos antibióticos em todas as cepas isoladas, antes do tratamento do animal, visando o uso criterioso desses medicamentos no tratamento de animais com mastite.

Revisão Bibliográfica

BRIÑAS, L.; ZARAZAGA, M.; SAÉNZ, Y.; RUIZ-LARREA, F.; TORRES, C. β -lactamases in Ampicillin-resistant *Escherichia coli* isolates from foods, humans and healthy animals. *Antimicrobial Agents Chemotherapy*, Washington, v.46, n.10, p.3156-3163, 2002.

COELHO, S.M.O.; REINOSO, E.; PEREIRA, I.A.; SOARES, L.C.; DEMO, M.; BOGNI, C.; SOUZA, M.M.S. Virulence factors and antimicrobial resistance of *Staphylococcus aureus* isolated from bovine mastitis in Rio de Janeiro. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, v. 29, n. 5, p. 369-374, 2009.

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

OLIVEIRA, G. F.; FURTADO, N. A. J. C.; FILHO, A. A. S.; MARTINS, C. H. G.; BASTOS, J. K.; CUNHA, W. R.; SILVA, M. L. A. 2007. Antimicrobial activity of *Syzygium cumini* (*Myrtaceae*) leaves extract. *Brazilian Journal of Microbiology*, São Paulo, v. 38, p. 381-384, 2004.

JAIN, N.C. Common Mammary Pathogens and Factors in Infection and Mastitis. *Journal of Dairy Science*. v.62, n.1, p.128-134, 1979.

KHAN, M. Z.; KHAN, A. Basic facts of mastitis in dairy animals: a review. *Pakistan Veterinary Journal*. v.26, n.4, p.204-208, 2006.

MAC FADDIN, J. F. *Biochemical tests for identification of medical bacteria*. Baltimore: Williams & Wilkins, 1976. 312 p.

PYÖRÄLÄ, S.; TAPONEN, S. Coagulase-negative *staphylococci* – emerging mastitis pathogens. *Veterinary Microbiology*, v.134, p.1-26, 2008.

MARTINS,R.P., SILVA,J.A.G; NAKAZATO,L.,DUTRA,V., Prevalência e etiologia infecciosa da mastite bovina na microregião de CUIABÁ,MT. Departamento de Ciências Básicas e Produção Animal, UFMT. E-mail: martinsrp1@gmail.com, Departamento de Clínica Médica Veterinária, UFMT (2010).

SANTOS F.G. B, OLIVEIRA W .L .M, GARINO JR. F, COSTA E.O, LEAL BALBINO T.C. Investigação dos mecanismos de resistência à oxacilina em *Staphylococcus aureus* isolados de casos de mastite bovina. *Revista Napgama* 2005, 8 (2):14-17

3.4 Artigo 4

***Staphylococcus* coagulase positivo meticilina resistente em trabalhadores na
àrea da saúde animal e alunos da Graduação da Faculdade de Medicina
Veterinária-UFPeI, Pelotas, RS.**

Chaffe, A. B.; Conrad.B. ; Lessa. L.; Schuch, L. F.D.; Ladeira. S.; Schiram,R.

Artigo submetido à Revista Brasileira de Farmácia-RBF

***Staphylococcus* coagulase positivo meticilina resistente em trabalhadores na área da saúde animal e alunos da Graduação da Faculdade de Medicina Veterinária-UFPeL, Pelotas; RS.**

Chaffè, A. B¹.; Conrad.B². ; Lessa. L².; Schuch, L. F.D.³; Ladeira. S⁴.; Schiram,R⁴.

¹ Bióloga – Secretaria Municipal da Saúde-Departamento de Vigilância em Saúde - Pós Graduada Faculdade de Veterinária – Universidade Federal de Pelotas; RS

²Graduada Faculdade de Medicina Veterinária-Universidade Federal de Pelotas; RS

³ Prof. Dr. Doenças Infecciosas - Faculdade de Medicina Veterinária - Programa de Pós Graduação-Universidade Federal de Pelotas; RS

⁴ Médica Veterinária – Laboratório Regional de Diagnósticos – LRD, Pelotas; RS

De acordo com normas para publicação em: Revista Brasileira de Farmácia – RBF

Brazilian Journal of Pharmacy (BJP)

1 Recebido em.....

2 Aceito para publicação em.....

RESUMO

A detecção e controle de portadores de *Staphylococcus spp* assumem significativa importância quando se trata de profissionais da área da saúde, devido a esta bactéria ser um importante patógeno, pois pode provocar infecções hospitalares. São microrganismos ubíquos, encontrados na microbiota da pele e mucosas dos seres humanos, sendo sem dúvida os patógenos humanos mais importantes que com frequência colonizam a parte externa das narinas e são encontrados em cerca de 30% dos indivíduos normais, também podem ser encontrados transitoriamente na pele e na orofaringe. Assim teve-se como objetivo avaliar a colonização de *Staphylococcus spp* na cavidade nasal de alunos da graduação da Faculdade de Medicina Veterinária e trabalhadores da área da saúde animal, bem como o analisar o

perfil de resistência desse microrganismo frente a meticilina. Para tal pesquisa foram coletadas, com auxílio de swabs, amostras de secreção nasal de 50 trabalhadores e 83 alunos da graduação da Faculdade de Veterinária. As amostras nasais coletadas foram levadas para o laboratório de Doenças Infecciosas da Faculdade de Veterinária – UFPEL e semeadas em placas de petri contendo Agar manitol incubadas por 24h a 37°C. Posteriormente foi realizada a identificação de colônias típicas e realização de testes bioquímicos de coloração de Gram, catalase, coagulase, VP (Teste de Voges-Proskauer), fermentação de maltose e D-manitol. As cepas identificadas como sendo de *Staphylococcus* coagulase positiva foram submetidas à realização de antibiograma realizado pelo método de difusão em disco de oxacilina (1µg) seguindo as normas padronizadas pelo National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS), onde identificou-se que alunos acima do 7º semestre (n=35) em relação ao total de amostras positivas para *Staphylococcus spp* (n=25) representaram 20% de *S. coagulase* positiva e 11,4% de *S. coagulase* positiva meticilina resistente. Nos trabalhadores da área da saúde animal foi avaliado também o uso de antimicrobiano (n=5) onde 20% dos isolados foram resistentes a meticilina, uso de proteção (n=30) como luvas/tapapós/botas sendo 10% dos isolados resistentes à meticilina, contato com cães (intensidade do contato diário) (n=40) em que 10% foi resistente a meticilina. Em relação ao sexo o maior percentual de amostras resistentes à meticilina foi do sexo feminino representando 71% do total de amostras coletadas. Os resultados confirmaram a ocorrência de *Staphylococcus* coagulase positiva resistentes à meticilina, classificando tais portadores como veiculadores desse microrganismo, podendo acarretar em impacto na saúde do profissional, de pacientes e da comunidade onde reside.

Palavras chave: Infecção hospitalar; Profissionais da saúde; *Staphylococcus* resistente à meticilina.

ABSTRACT

The detection and management of patients with *Staphylococcus spp* assume significant importance when it comes to health professionals due to this bacterium is an important pathogen, which may cause nosocomial infections. Are ubiquitous microorganisms found in the microflora of the skin and mucous membranes of humans and certainly the most important human pathogens which colonize frequently the outside of the nose and are found in about 30% of normal individuals can also be found in transiently skin and oropharynx. The research aimed to evaluate the colonization of *Staphylococcus spp* in the nasal cavity of graduate students and workers in the field of animal health as well as to analyze the profile of this microorganism resistance against antibacterial. For this research were collected with the aid of swabs, nasal secretion samples from 50 workers and 83 graduate students of the Faculty of Veterinary Science. The material was sown on petri dishes containing mannitol agar and incubated for 24 h at 37 ° C. They were taken to the laboratory for Infectious Diseases, Faculty of Veterinary - UFPEL, which were grown and inoculated with subsequent identification of typical colonies and that biochemical Gram stain, catalase and coagulase. VP (Voges - Proskauer test), fermentation of maltose and D - manitol. As strains identified as *Staphylococcus* coagulase positive were also used for susceptibility testing performed by the diffusion method oxacillin (1mg) disc by following the norms established by the National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS), where it was identified that students above the 7th semester (n=35) in relation to total samples positive for *Staphylococcus spp* (n=25) accounted for 20% of *S. coagulase* positive and 11.4% of *S. coagulase* positive methicillin resistant. Workers in the area of animal health it was also reported the use of antimicrobials (n = 5) where 20% of the isolates were resistant to methicillin, using protection (n=30) such as gloves / tapapós / boots with 10% of isolates resistant to methicillin, contact with dogs (intensity daily contact) (n=40) of which 10% were resistant to methicillin. Regarding gender the highest percentage of methicillin resistant strains were female representing 71% of total samples collected. The results confirmed the occurrence of coagulase positive *Staphylococcus* resistant to methicillin, classifying such patients as carriers of this microorganism, and can result in impact on health professional, patients and the community where he resides.

Keywords : Hospital infection; Health professionals; Aureus resistant to methicillin.

1 Departamento científico – Doenças Infecciosas.

* Endereço para correspondência: Faculdade de Veterinária – Campus Universitário, Prédio 1. CEP 96010-900 Universidade Federal de Pelotas - e-mail: apizarro8@hotmail.com 2 Faculdade de Veterinária /Universidade Federal de Pelotas –UFPEL)

1 INTRODUÇÃO

O gênero *Staphylococcus* é responsável por um grande número de infecções bacterianas no homem, sendo dividido em dois grandes grupos com base na produção da enzima coagulase. O primeiro grupo, conhecido como *Staphylococcus* coagulase positiva é representado, principalmente, pelo *Staphylococcus aureus*. O segundo grupo, chamado *Staphylococcus* coagulase negativa (SCN) é compreendido por várias espécies, dentre elas: *S. epidermidis*, *S. haemolyticus*, *S. saprophyticus*, *S. lugdunensis*, *S. cohnii*, *S. schleiferi*, *S. simulans*, *S. hominis*, *S. warneri*, *S. capitis*, *S. caprae* e *S. xylosus* (TRABULSI *et al.*, 2002; MARTINS, CUNHA, 2007; PEREIRA, 2009). *S.aureus* são cocos Gram positivos com presença ubíqua entre os seres humanos e fazem parte da microbiota normal da pele e mucosa de grande parte dos mamíferos (VAN BELKUM *et al.*, 2009; SANTOS, 2009), e são considerados como a espécie mais importante do gênero *Staphylococcus*.

Além de importantes patógenos humanos, podem também, ser encontrados em diversos processos infecciosos de forma persistente ou transitória sem causar qualquer sintoma (RATTI; SOUSA, 2009). Desde que consigam ultrapassar a barreira natural, podem infectar síndromes clínicas. Estas infecções basicamente ocorrem através de dois mecanismos que irão originar processos piogênicos e/ou doenças mediadas por toxinas (TRABULSI *et al.*, 2002; SANTOS, 2009).

S.aureus são encontrados em várias partes do corpo, podendo colonizar fossas nasais, mãos, pele, orofaringe, trato digestivo e trato geniturinário. Entretanto, as fossas nasais e as mãos são consideradas como os principais reservatórios desta bactéria causando grande preocupação pode ocorrer por contato direto, de pessoa para pessoa, ou pode ser infecção cruzada por meio do contato indireto (via aérea), estando essa transferência na dependência da presença de uma fonte constituída por doentes e/ou portadores sadios (OLIVEIRA *et al.*, 2010), também chamados de portadores assintomáticos os quais constituem nos principais agentes transmissores de *S.aureus* na nasofaringe. Em relação à colonização nasal por *S.aureus*, 20% dos indivíduos são portadores persistentes, aproximadamente 60% podem ser portadores intermitentes e 20% quase nunca são colonizados (SANTOS, 2009).

A colonização nasal de *Staphylococcus* é considerada como a principal responsável pela colonização da superfície cutânea, tornando-se motivo de preocupação ao se analisar a prevalência desses micro-organismos na população e entre trabalhadores ligados à área da saúde (SANTOS, 2009). As infecções podem ser causadas por micro-organismos do próprio indivíduo (infecções endógenas) ou por amostras adquiridas de outras pessoas doentes e/ou portadores sadios (infecções exógenas) (RATTI, SOUSA, 2009). Estas infecções ocorrem quando há uma desigualdade entre as defesas do hospedeiro e o potencial de virulência dos micro-organismos, ou seja, quando estes micro-organismos tornam-se capazes de sobrepujar as defesas mecânicas, humorais e/ou celulares do organismo, invadindo, colonizando e estabelecendo a afecção do hospedeiro (CHASTRE; Fagon, 2002; KUSAHARA *et al.*, 2007; VAN BELKUM *et al.*, 2009). Estima-se que cerca de 11% à 43% dos pacientes colonizados adquirem infecção (LOWY, 1998 apud GELATTI *et al.*, 2009^a). Já a transmissão de pessoa para pessoa pode ocorrer por contato direto, sendo muito comum no ambiente hospitalar, onde os trabalhadores da área de saúde podem contaminar suas mãos ao prestar assistência a pacientes portadores persistentes ou manusear objetos colonizados e subseqüentemente transmitir o organismo para outros pacientes. (CAVALCANTI *et al.*, 2006).

Os estafilococos também são conhecidos pela elevada capacidade de desenvolver resistência a vários antimicrobianos, principalmente no ambiente hospitalar, onde esses medicamentos são amplamente utilizados. O desenvolvimento da resistência nas cepas de *S.aureus* foi rápido, visto que a resistência a penicilina foi detectada logo no ano seguinte a introdução deste antibiótico no mercado (SAKOULAS; MOELLERING, 2008). Em relação à meticilina, uma penicilina semi-sintética introduzida no mercado na década de 60, para o tratamento das cepas resistentes à penicilina, observou-se o mesmo comportamento. Atualmente, o uso da meticilina foi substituído pelo seu análogo, a metilmetirilina, que possui o mesmo mecanismo de ação (SOUZA, 2009), porém persistiu-se o modo de referir-se ao micro-organismo.

Considerando a relevância do gênero *Staphylococcus spp* em infecções hospitalares, clínicas e na comunidade em geral este estudo teve como objetivo determinar a prevalência e o perfil de resistência desta bactéria em profissionais da área da saúde animal.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Amostras Bacterianas

As amostras nasais dos alunos da graduação da Faculdade de Veterinária (n=83) e trabalhadores da área da saúde (n=60) foram coletadas com suabes úmidos segundo descrito por (COUGHLAN *et al.*, 2010). As amostras foram transportadas ao Laboratório de Doenças Infecciosas, sendo a semeadura do material realizada no mesmo dia da coleta.

Este trabalho possui um desenho transversal com duas fontes de amostragem. Uma das fontes foram os estudantes de veterinária, em clusters, determinados pelo tempo que os estudantes ingressaram no curso, sendo de 1-3 semestres, 4-6 semestres e 7-9 semestres. A escolha da amostra foi feita por disposição a participação dentro dos grupos. Foi realizada a coleta (amostras nasais) de 60 trabalhadores em saúde animal (veterinários, funcionários e auxiliares) que se dispuseram a participar do projeto.

Dados epidemiológicos e demográficos foram coletados pela aplicação de um questionário. Os dados foram analisados através do pacote estatístico epi info 6. Todas as pessoas amostradas assinaram um termo de participação livre e esclarecido.

2.2 Isolamento e identificação de amostras bacterianas

As amostras nasais coletadas foram semeadas em meio Ágar manitol salgado (Mannitol Salt Agar Base - HMEDIA®) e incubados a 37°C por 48 h. A identificação bacteriana foi realizada com base nas características coloniais, morfotintoriais (coloração de Gram) e bioquímicas, tais como: produção da catalase, produção de coagulase livre, produção de acetoína (Teste de Voges-Proskauer), fermentação de maltode e D-manitol (MAC FADDIN, 2003; BANNERMAN, 2003).

2.3 Determinação de resistência aos agentes antimicrobianos

Todas as amostras bacterianas de *Staphylococcus* coagulase positiva foram analisadas quanto à susceptibilidade á meticilina seguindo o padrão estabelecido pelo CLSI (2011), utilizando o método de difusão de disco. As amostras foram semeadas em placas contendo o

meio àgar Müller Hinton (MicroMED®) e discos de antimicrobiano (oxacilina 1µg) onde foram depositados com o auxílio de uma pinça. As placas foram incubadas a 35°C por 24 horas em aerobiose.

Após o período de incubação, foi feita a leitura através dos diâmetros dos halos de inibição de crescimento onde foram medidos para interpretação dos resultados. As amostras consideradas resistentes eram as que possuíam um halo menor ou igual à 14 mm.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Na realização deste estudo, um dos objetivos foi identificar a prevalência de *S. coagulase* positiva resistente na cavidade nasal de alunos e profissionais de saúde animal considerando que possuem um maior contato com animais e conseqüentemente os que apresentam maior probabilidade de disseminação desse microrganismo patogênico. Conforme as caracterizações realizadas nas amostras nasais, podemos observar na tabela 1 a distribuição da freqüência de *Staphylococcus spp*, *S. coagulase* positiva e *S. coagulase* positiva resistentes a metilina (MRSA).

Tabela 1 - Percentual da distribuição da freqüência em Cluster 1 (1-3 semestres), Cluster 2 (4-6 semestres) e Cluster 3 (mais de 7 semestres) para *Staphylococcus spp*, *S. coagulase* positivas e *S. coagulase* resistentes a metilina em alunos da Faculdade de Veterinária-UFPel;RS.

	<i>Staphylococcus spp</i> (%)	<i>S. coagulase</i> positiva(%)	<i>S. coagulase</i> resistentes a oxacilina (MRSA)(%)	n
Cluster 1	16/88,9%	1/5,6%	1/5,6%	18
Cluster 2	25/83,3%	1/3,3%	0/0%	30
Cluster 3	25/71,4%	1/20%	4/11,4%	35
Total	66	9	5	83

A maior representatividade de amostras *S. coagulase* positiva e *S.coagulase* positiva metilina resistente ocorreu em alunos apartir do 7º semestre em relação ao total de amostras positivas para *Staphylococcus spp* (n=66) representando 20% de *S. coagulase* positiva e 11,4% de *S. coagulase* positiva metilina resistentes.

Das 66 amostras caracterizadas como *Staphylococcus spp* do total de alunos (n=83) observou-se que dos 14 alunos que fizeram uso de antimicrobiano 14% (n=2) foram *S. coagulase* positiva metilina resistente. Os alunos que expressaram não ter tido nenhum contato com cães, cães doentes, sadios e cães de clínicas não apresentaram nenhuma amostra *S.coagulase* positiva resistente à metilina.

Dentre as 60 amostras nasais de trabalhadores colhidas a frequência e percentual de positividade para *Staphylococcus spp* foi de 78,3% (n=47) para *S. coagulase* positiva foi de 31,7% (n=19) e *S. coagulase* positiva resistentes a metilina foi de 6,7% (n=4) conforme observa-se na tabela 2.

Tabela 2 - Percentual de amostras *Staphylococcus spp*, *S. coagulase* positiva e *S. coagulase* positiva resistentes à metilina em trabalhadores da área da saúde animal em Clínicas Veterinárias e Hospital Veterinário da Faculdade de Veterinária-UFPel (HCV) no Município de Pelotas; RS (2012-2013).

	Clinicas /HCV (%)	N
<i>Staphylococcus spp</i>	78,3	47
<i>S. coagulase</i> positiva	31,7	19
<i>S.coagulase</i> resistente à metilina (MRSA)	6,7	4
Total		60

Nos 60 trabalhadores da área da saúde animal foi também avaliado o percentual do uso de antimicrobiano, proteção, tipo de proteção, a intensidade do contato com cães, profissão e o sexo conforme a descrição na tabela 3.

Tabela 3- Percentual de amostras *Staphylococcus spp*, *S. coagulase positiva* e *S. coagulase positiva* resistentes à metilina em trabalhadores da área da saúde animal de acordo com o sexo, profissão, uso de antimicrobiano, proteção, tipo de proteção, a intensidade do contato com cães em Clínicas Veterinárias e Hospital Veterinário da Faculdade de Veterinária-UFPel (HCV) no Município de Pelotas; RS (2013).

Amostras isoladas de trabalhadores/saúde animal (%)				
	<i>Staphylococcus</i>	<i>S. coagulase positiva</i>	<i>S. coag. metilina resistente</i>	n
Sexo masculino	14(82)	4(23)	0(0)	17
Sexo feminino	33(76)	15(34)	4(9)	43
Profissão				
Tratador	13(86)	5(33)	1(6)	15
Estagiário	7(87)	5(62)	0(0)	8
Veterinário	20(71)	5(18)	2(7)	28
Biólogo	1(33)	0(0)	0(0)	3
Servente	5(100)	3(60)	1(20)	5
Antimicrobiano	5(100)	3(60)	1(20)	5
Intensidade/contato				
Nenhum	2(66)	1(33)	0(0)	3
Diário	34(85)	13(32)	4(10)	40
1-3 vezes/semana	10(71)	5(35)	0(0)	14
Menos/semanal	1(33)	0(0)	0(0)	3
Proteção				
Com proteção	24(80)	11(36)	3(10)	30
Sem proteção	14(9)	6(40)	1(6)	15
Às vezes	5(71)	1(14)	0(0)	7
Obrigatória	3(50)	1(16)	0(0)	6
Proteção				
Tapapó/luvas/máscara	5(71)	2(28)	2(28)	7
Luvas de contenção	6(8)	1(16)	1(14)	7
Luvas e botas	2(10)	1(50)	1(50)	2
Luvas látex	21(7)	10(34)	0(0)	29

O maior número de amostras coletadas foram do sexo feminino (n=43) representando um percentual de 76% do total de amostras onde 34% (n=15) foram coagulase positiva e 9% (4) foram amostras resistentes à meticilina em comparação ao sexo masculino (n=17) onde 23% (n=4) foram coagulase positiva e nenhuma apresentou resistência à oxacilina. Somente 5 trabalhadores faziam uso de antimicrobiano onde 60% (n=3) foram *S. coagulase* positiva e 20% (n=1) foi resistente à meticilina. Entre as coletas realizadas o maior número de acordo com as profissões foram os médicos Veterinários (n=28) com um percentual de 18% (n=5) de isolados *S. coagulase* positiva e 7% (n=2) de *S. coagulase* resistentes a meticilina. Os tratadores (n=15) apresentaram 33% (n=5) de *S. coagulase* positiva e 6% (n=1) *S. coagulase* positiva resistente à meticilina. Os serventes (n=5) apresentaram um percentual de 60% (n=3) de *S. coagulase* positiva e 20% (n=1) de *S. coagulase* positiva resistentes à meticilina.

A intensidade do contato diário entre todos os participantes (n=40) demonstrou um resultado de 10% (n=4) de *S. coagulase* positiva resistente à meticilina em relação às demais que não evidenciaram nenhuma resistência.

A maioria dos trabalhadores (n=60) onde 50% faziam uso de proteção, 29 deles usavam luvas de látex representando 48% das amostras coletadas. Foi observado que em 36% (n=11) dos participantes que faziam uso de proteção as amostras foram *S. coagulase* positiva e destas 10% (n=3) foram *S. Coagulase* positiva resistentes à meticilina e aqueles que não fizeram uso de proteção 40% (n=6) foram *S. coagulase* positiva, 6% (n=1) foi resistente à meticilina. Daqueles participantes que usavam proteção às vezes e com obrigatoriedade as amostras coletadas não apresentaram resistência à meticilina.

Uma hipótese para esse fato é que, quando os trabalhadores têm ciência da condição de portador de seus pacientes, isso os leva a tomarem mais cuidado ao manuseá-los, ou seja, a percepção de risco de contaminação leva o trabalhador a se proteger.

Quanto ao perfil de resistência à meticilina observa-se que os trabalhadores, em que a profissão está relacionada com um contato freqüente e diário com animais sadios ou em tratamento possuem uma exposição maior a estes microorganismos resistentes o que torna viável a transitoriedade a nível comunitário. A descolonização de mucosas e pele deve ser considerada,

essa medida visa limitar a disseminação desse agente nos serviços de saúde, e, assim, reduzir o grande impacto clínico produzido por ele nas infecções hospitalares e comunitárias.

Compartilho com Cruz (2008) a necessidade do trabalhador e profissional conhecer sua situação de portador como um direito do trabalhador, para que reflita e reveja suas práticas frente ao risco ocupacional, bem como tenha a possibilidade de realizar sua descolonização.

Acredita-se que a percepção desses profissionais acerca do risco de colonização por microrganismos é de suma importância para compreenderem a necessidade de adotarem atitudes seguras no trabalho, visando à qualidade de vida no trabalho.

A resistência à meticilina (65,0%) está entre os dados de estudos britânicos que encontraram 74,0% de resistência, norte-americanos com percentual de 55,0%, no entanto o perfil de resistência obtido se mostrou abaixo do relatado por PENNA *et al* (2001), sugerindo que a avaliação do resistograma e monitoramento de bactérias resistentes apresente variações conforme a região estudada.

É importante que o uso racional e controlado de antimicrobiano, aliado a monitorização rotineira da susceptibilidade aos *Staphylococcus spp* isolados de pacientes ou profissionais da saúde, seja estratégias adotadas pelas instituições. Esta orientação também se faz necessária para proteção ocupacional do trabalhador e evitar a disseminação e conseqüentemente para prevenir um problema mundial de saúde pública.

Trabalhadores da área da saúde são como reservatórios persistentes de MRSA nas instituições e os cuidados com a saúde são raros, todavia importantes. Somado a isto devemos nos preocupar com a importância do uso dos materiais de proteção (jalécos, luvas, botas, etc...) e lembrar também que a correta desinfecção do ambiente tem papel importante na cadeia de transmissão do agente.

Portanto somente ações sistematizadas e controladas poderão suportar o desafio da disseminação das bactérias multidrogas resistentes.

5 CONCLUSÃO

De acordo com os resultados observados constatou-se na presente pesquisa a frequência de 20% *S. coagulase* positiva resistente à meticilina em alunos e de 6,7% em profissionais da saúde. A partir do conhecimento da condição de portador desses microorganismos, é fundamental que os profissionais da saúde estejam atentos aos problemas de infecções nosocomiais, devido impacto sócio-econômico e humano que as infecções causam frequentemente, aumentando a taxa de mortalidade e gastos hospitalares.

6 REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA

CAVALCANTI, Silvana Maria de Moraes et al . Estudo comparativo da prevalência de *Staphylococcus aureus* importado para as unidades de terapia intensiva de hospital universitário, Pernambuco, Brasil. Rev. bras. epidemiol., São Paulo, v. 9, n. 4, Dec. 2006 .

CHASTRE, J.; Fagon, J. Ventilator-associated pneumonia.(2002). Am J Crit Care Med. 165 (7):867-903.

COUGHLAN, R.; *Staphylococcus aureus* na boca e no nariz de indivíduos sãos. Verificação de identidade entre as cepas isolada; Rev. Saúde Pública vol.16 n.2 São Paulo Apr. 2010, *Print version* ISSN 0034-8910.

CRUZ, E.D., *Staphylococcus aureus* e *Staphylococcus* resistentes à Meticilina em trabalhadores de um hospital universitário, colonização e crenças a saúde.Universidade de São Paulo, Riberão Preto, 2008.

GELATTI, Luciane Cristina et al . Sepsis por *Staphylococcus aureus* resistente à meticilina adquirida na comunidade no sul do Brasil. Rev. Soc. Bras. Med. Trop., Uberaba, v. 42, n. 4, Aug. 2009

GELATTI, Luciane Cristina et al . *Staphylococcus aureus* resistentes à meticilina: disseminação emergente na comunidade. An. Bras. Dermatol., Rio de Janeiro, v. 84, n. 5, Oct. 2009.

MAC FADDIN, J., .Pruebas Bioquímicas Para La Identificación De Bacterias De Importancia Clínica. Jean F.,2003.

MARTINS, A.Cunha, M.L.R.S. (2007). Methicillin resistance in *Staphylococcus aureus* and coagulase-negative *Staphylococci*: epidemiological e molecular aspects. Microbiol Immunol, 51(9): 787-95.

OLIVEIRA, G. C.; Vieira, J. D. G.; Sadoyama, G. (2010). Prevalência e perfil de suscetibilidade aos antimicrobianos de isolados de *Staphylococcus aureus* News Lab, 100: 118-130.

PENNA, B. *et al.* Prevalência clínica de *Staphylococcus sp* de origem canina e sua resistência in vitro aos antimicrobianos. Clínica Veterinária, n. 90, p. 82-88, 2011.

PEREIRA, E. P. L.; CUNHA, M. L. R. S. (2009). Avaliação da colonização nasal por *Staphylococcus spp* resistente a oxacilina em alunos de enfermagem. J Bras Pat Med., 45(5):361-369.

RATTI, R. P.; SOUSA, C. P. (2009). *Staphylococcus aureus* metilicina resistente (MRSA) e infecções nosocomiais. Rev Ciênc Farm Básica Apl., 20(2):9-16.

ROSSI, D, Devienne KF, Raddi MSG. Influência de fluidos biológicos nasobrevivência de *Staphylococcus aureus* sobre diferentes superfícies secas. Rev. Ciênc. Farm. Básica Apl. 2008; 29 (2):211-4.

SAKOULAS, G.; MOELLERING, Jr. R.C. (2008). Increasing antibiotic resistance among Methicillin-Resistance *Staphylococcus aureus* strain. Clin Infect Dis., 46: S360-367.

SANTOS, H.B. (2009). Colonização por *Staphylococcus aureus* metilicina-resistente (MRSA) e seus fatores associados, em pacientes clínicos admitidos no hospital de clínicas de Porto Alegre. 159p. (Tese de Doutorado). Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Faculdade de Medicina. Programa de Pós-Graduação em Epidemiologia. Porto Alegre, RS – Brasil.

TRABULSI, L.R.; ALTERTHUM, F.; GOMPERTZ, O.K.; CANDEIAS, J.A. (2002). Microbiologia. 3 ed. São Paulo: Atheneu.

TRABULSI E ALTERTRUM, *Staphylococcus aureus* e a atividade *in vitro* da clorexidina, Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada, Journal of Basic and Applied Pharmaceutical Sciences Rev Ciênc Farm Básica Apl., 2002;34(3):411-4 ISSN 1808-45.

KUSAHARA, D.M.; PETERLINI, M.A.S.; PEDREIRA, M.L.G. Colonização orofaríngea de crianças à admissão em uma unidade de cuidados intensivos. Acta Paul Enferm. 20 (4): 421-427, 2007.

VAN B.A.; VERKAIK, N. J.; VOGEL, C.P.; BOELEN, H.A.; VERVEER, J.; NOUWEN, J.L.; VERBRUGH, H.A.; WERTHEIM, H.F.L. (2009). Reclassification of *Staphylococcus aureus* Nasal Carriage Types - The Journal of Infectious Diseases, 199:1820–1826.

3.5 Artigo 5

**Avaliação da atividade de extratos hidroalcóolicos de plantas bioativas sobre
*Staphylococcus coagulase positivo metilicina resistente.***

Anna Beatriz PIZARRO CHAFFE, Fernanda VOIGT MOTA, Luiz Filipe DAMÉ SCHUCH,
Bianca CONRAD BOHM0, Lisiane FERREIRA LESSA, Katiúscia BARBOSA BILHALVA.

Artigo submetido à Revista Cubana de Plantas Mediciniais

ARTIGO ORIGINAL

Artículo Original | Original Article

**Avaliação da atividade de extratos hidroalcoólicos de plantas bioativas sobre
Staphylococcus coagulase positivo meticilina resistente.**

Evaluation of the actividad bioactive extracts plant them hidroalcoholics methicillin resistant
Staphylococcus coagulase positive

**Anna Beatriz PIZARRO CHAFFE¹, Fernanda VOIGT MOTA², Luiz Filipe DAMÉ SCHUCH²,
Bianca CONRAD BOHM², Lisiane FERREIRA LESSA², Katiúscia BARBOSA BILHALVA³.**

¹*Secretaria Municipal da Saúde/Departamento de Vigilância em Saúde-Pelotas, Rua Lobo da Costa n°1764, Centro-RS, CEP 96010-150, Brasil.*

²*Laboratório de Doenças Infecciosas, Faculdade de Veterinária, Universidade Federal de Pelotas-UFPel, Campus Universitário s/n, Capão do Leão, RS. Brasil CEP 96010-900.*

³*Universidade Federal do Rio Grande do Sul-UFRGS-Porto Alegre-RS, Brasil*

¹*Doutoranda em Ciências Veterinárias - Universidade Federal de Pelotas -UFPel-*

apizarro8@hotmail.com

²*Professor Doutor em Ciências Veterinárias-Universidade Federal de Pelotas-UFPel-*
bitoxu@iq.com.br

²*Mestranda em Ciências Veterinárias – Programa de Pós-Graduação em Veterinária -
Universidade Federal de Pelotas - UFPel*

nandavoight@yahoo.com.br

³ *Doutoranda Ciências Veterinárias - Universidade Federal do Rio Grande do Sul-UFRGS*
kbilhalva@ibest.com.br

²*Graduandas em Medicina Veterinária – Faculdade de Veterinária - Universidade Federal de Pelotas – UFPel*
biankabohm@hotmail.com; lisiane hh@hotmail.com

Abstract

The use of natural, effective and low risk in livestock products has achieved great importance in recent years. The study of these agents is important in the health field as they seek world less toxic and more effective substances against bacterial resistance and able to fight new pathogens. This research aims to test the effectiveness of "in vitro"

of hydroalcoholic extracts *Baccharis trimera* (gorse), *Tagetes minuta* (Chinchilho), *Cymbopogon citratus* (Lemongrass), *Syzygium cumini* (Black Plum), *Schinus terebinthifolius Raddi* (Aroeira) with ethnographic indicative "antiseptic/disinfectant" against samples of methicillin resistant *Staphylococcus coagulase* positive isolates from dogs. The results demonstrate the antimicrobial activity of the extracts evaluated using the technique of broth dilution in microplate determination of Minimum Inhibitory Concentration (MIC) ranging from 1 to 63.28% compared to isolates of methicillin-resistant *S.coagulase* (SMRA). Extract hydroalcoholic leaf of *Schinus terebinthifolius Raddi* (Aroeira) obtained significant antimicrobial activity in vitro against isolates where the MIC ranged from 3.95% to 31% presenting as an effective therapeutic alternative for infections by *Staphylococcus spp* being low cost and low the population.

Keywords: antibacterial activity, medicinal plants, *Spaphylococcus* Methicillin Resistant.

Resumo

A utilização de produtos naturais, eficazes e de baixo risco na produção animal tem obtido elevada importância nos últimos anos. O estudo desses agentes é importante no campo da saúde visto que buscam mundialmente substâncias menos tóxicas e mais eficazes contra a resistência bacteriana e capazes de combater novos patógenos. Esta pesquisa busca testar a eficácia "in vitro" de extratos hidroalcoólicos de *Baccharis trimera* (carqueja), *Tagetes minuta* (Chinchilho), *Cymbopogon citratus* (Capim-limão), *Syzygium cumini* (Jambolão), *Schinus terebinthifolius Raddi* (Aroeira) com indicativo etnográfico "antisséptico/ desinfetante" frente a amostras de *Staphylococcus coagulase* positivo metilina resistente isolados de cães. Os resultados demonstram a atividade antimicrobiana dos extratos avaliados através da técnica de diluição em caldo em microplaca com determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) variando de 1 à 63,28% frente aos isolados de *S.coagulase* metilina resistente (SMRA). O extrato hidroalcoólico da folha de *Schinus terebinthifolius raddi* (Aroeira) obteve significativa atividade antimicrobiana in vitro sobre os isolados onde a CIM variou de 3,95% à 31% apresentando-se como uma eficaz alternativa terapêutica para infecções por *Staphylococcus spp* sendo de baixo custo e acessível a população.

Palavras chave: atividade antibacteriana, plantas medicinais, *Spaphylococcus* Metilina Resistente.

Introdução

Desde o princípio das civilizações, as plantas medicinais têm sido utilizadas, mas o interesse por fitoterápicos aumentou significativamente a partir da década de 90, e atualmente encontra-se em expansão em todo mundo, constituindo em um mercado promissor (SOLDATELLI *et al.*, 2010). A utilização de medicamentos a base de plantas medicinais tem apresentado elevado uso na Medicina Veterinária com as mais diversas finalidades, criando uma demanda constante de estudos. A aceleração da resistência dos microrganismos aos antibióticos está atingindo índices jamais vistos, causando ameaças à saúde dos seres vivos. As bactérias podem adquirir resistência aos antibióticos por meio de mutação de seu genoma ou incorporando genes provenientes de outros micro-organismos por diferentes sistemas de transferência genética (BRASIL *et al.*, 2009). Atualmente, têm sido realizados vários estudos buscando novos fármacos com ação antibiótica, fungicida, anti-inflamatória, anti-hipertensiva e anticancerígena, sendo muito destes fármacos encontradas em plantas (SNYDER *et al.*, 2004). Extratos e óleos essenciais de plantas mostraram-se eficientes no controle do crescimento de uma ampla variedade de microrganismos (DUARTE, 2006).

Dentre inúmeras espécies de plantas com propriedades medicinais, especialmente atividade antimicrobiana, a literatura cita *Schinus terebinthifolius* – popularmente conhecida como aroeira, Chinchilho *Tagetes minuta* L. (BRANCO *et al.*, 2006; MEDEIROS *et al.*, 2007; AGRA *et al.*, 2007), jambolão (*Syzygium cumini* (L.) Skeels) (PIOCORRÊA, 1984; PEPATO *et al.*, 2001, LORENZI & MATOS, 2002; MAZZANTI *et al.*, 2003), carqueja (*Baccharis trimera* (Less.) Baker) e capim-limão (*Cymbopogon citratus*) (DC) Stapf.

O estudo dessas plantas é importante no campo da saúde visto que se busca mundialmente substâncias menos tóxicas e mais eficazes contra a resistência bacteriana e capazes de combater novos patógenos (BARBOSA-FILHO *et al.*, 2007; OSTROSKY *et al.*, 2008). Com uma estrutura química que difere daquela dos antibióticos derivados de microrganismos, os antibióticos vegetais podem regular o metabolismo intermediário de patógenos, ativando ou bloqueando reações e síntese enzimática ou mesmo alterando a estrutura de membranas (MICHELIN *et al.*, 2005).

A terapia antimicrobiana contra *Staphylococcus spp* tem se tornado um grande problema no tocante a infecções hospitalares, devido à freqüente resistência adquirida por esse patógeno, desde a descoberta das penicilinas e, em seguida, aos outros beta-lactâmicos. A aquisição desses genes de resistência é facilitada pelo uso abusivo de drogas antimicrobianas, e disseminados via plasmídeo de resistência presentes em cepas como decrito por STRATTON, 2000.

A aroeira tem sido estudada por vários pesquisadores, tendo demonstrado propriedades medicinais nas cascas, folhas e nos frutos, com ação anti-inflamatória, analgésica, cicatrizante, adstringente, diurética, balsâmica, depurativa e febrífuga (LUCENA, 2006).

Lipinski (2008) em estudo sobre o efeito cicatrizante da aroeira em feridas na pele de bovinos demonstrou a atividade antimicrobiana do extrato hidroalcoólico e alcoólico da casca da aroeira sobre a bactéria *Staphylococcus aureus* ATCC 25923.

O chinchilho (*Tagetes minuta*) cujo, os principais sinônimos desta espécie são: *T. glandulifera* Schrank, *T. bonariensis* Pers., *T. glandulosa* Link, *T. porophyllum* Vell. É conhecida como, picão do reino, cravo de defunto, vara de rojão, estrondo, rabo de rojão, cravo de urubu, cravo bravo (LORENZI & MATOS, 2008). Planta nativa da América do Sul, inclusive do Brasil, mas atualmente é encontrada naturalizada ou sob cultivo em diversos países do mundo. Sua parte aérea é empregada na medicina caseira, sendo considerada aromática, excitante e diurética. É utilizada para tratamento de reumatismos, cólica intestinal, dispepsias, para expelir vermes intestinais e estimular o fluxo menstrual, como tônica, aromatizante, digestiva e aperitiva, além de possuir ação antimicrobiana (GOLENIOWSKI *et al.*, 2006).

A atividade antibacteriana dos extratos hidroalcoólicos e decocto do *T. minuta* L. já foi demonstrada, possuindo potente ação contra microrganismos causadores de mastite e de dermatofitose em humanos e animais demonstrando a ação antibacteriana e antifúngica da planta (SCHUCH *et al*, 2008).

ALMEIDA *et al* (2011) em estudo avaliou a execução do pós-séptico de ordenha em teto de gado, obtidos a partir de extrato hidroalcoólico de *T. minuta*, como .antisséptico / desinfetante onde a prevalência semanal do CMT variou no grupo 1 entre 29,5% e 17,1%, e no grupo 2 de 29,7% a 19,6%, não diferindo significativamente

em nenhuma das semanas. A incidência de cultura positiva para *Staphylococcus/Streptococcus* foi de 3,93 e 6,96/1000 quartos/dia para os grupos 1 e 2 respectivamente, com $p=0,057$.

Syzygium cumini (L.) Skeels – popularmente conhecido como jambolão, jamelão, jalão, cereja, azeitona e azeitona-roxa, árvore é de grande porte, pertence à família Myrtaceae, apesar de ser originária da Indonésia, China e Antilhas, é também cultivada em vários países, pois cresce muito bem em diferentes tipos de solo, largamente distribuído por todo o território brasileiro (PIO CORRÊA, 1984; PEPATO *et al.*, 2001, LORENZI & MATOS, 2002; MAZZANTI *et al.*, 2003).

A literatura relata suas ações antiviral e anticarcinogênica (ONG e KHOO, 2000), anti-inflamatória (BRAGA *et al.*, 2007; LIMA *et al.*, 2007), antibacteriana (OLIVEIRA *et al.*, 2007) e antialérgica (BRITO *et al.*, 2007) de extratos das folhas do jambolão, provavelmente, devido à presença de taninos hidrolizáveis e flavonóides (BRITO *et al.*, 2007; LIMA *et al.*, 2007) como a miricetina e seus glicosídeos (KUSKOSKI *et al.*, 2000; TIMBOLA *et al.*, 2002). As folhas da planta são ricas em taninos, saponinas, glicosídeos, peptídeos e terpenóides (LOGUERCIO *et al.*, 2005).

A carqueja é muito utilizada na medicina popular como diurética, tônica, digestiva protetora e estimulante do fígado, antianêmica, antirreumática, depurativa, para o controle da obesidade, diabetes, hepatite e gastroenterites. Há inúmeros trabalhos que foram desenvolvidos com o intuito de comprovar os efeitos biológicos atribuídos à *B. trimera*, dentre estes efeitos podemos destacar: atividade antiviral de extratos aquosos e etanólicos contra o herpes tipo I (HSV-1), vírus de estomatite vesicular (VSV) e polivírus do tipo IV; efeito antimicrobiano; atividade antioxidante e antiinflamatória; efeito terapêutico antiartrítico; efeitos antioxidantes e anti - inflamatórios (DUARTE, 2006).

O *C. citratus* (Capim limão) é bem conhecido nas regiões Sul e Sudeste do Brasil, sendo utilizado em ornamentações e em práticas medicinais (VIDA, 2006). Possui origem asiática distribuindo-se em regiões tropicais e subtropicais. No Brasil, recebe inúmeras denominações, como capim-cidró, capim-santo, cana-cidreira, capim-cheiroso (CARNEIRO, 2003; GUPTA e JAIN, 1978). A atividade biológica de *C. citratus* é atribuída ao seu principal componente, o citral (LEAL *et al.*, 2003 ; GUERRA *et al.*, 2000).

As espécies do gênero *Staphylococcus* estão relacionadas a infecções que acometem tanto humanos quanto animais. O crescimento da resistência microbiana, em geral, ocorre pelo uso inapropriado de antimicrobianos, esse aumento leva a busca por tratamentos alternativos.

A resistência de patógenos humanos e animais as drogas é um dos casos mais bem documentados de evolução biológica e um sério problema tanto em países desenvolvidos como em desenvolvimento. O consumo de mais de uma tonelada diária de antibióticos em alguns países da Europa tem resultado na resistência de populações bacterianas, causando assim um sério problema de saúde pública (DUARTE, 2006).

O objetivo deste estudo é avaliar a ação antibacteriana dos extratos hidroalcoólicos das folhas frescas e secas de Aroeira, Chinchilho, Jambolão, Capim limão, Carqueja sobre *Staphylococcus* coagulase positiva resistentes à meticilina, isolados de cães.

Parte experimental

Na realização deste trabalho foram utilizadas 5 plantas *Baccharis trimera* (carqueja), *Tagetes minuta* (Chinchilho), *Cymbopogon citratus* (Capim-limão), *Syzygium cumini* (Jambolão), *Schinus terebinthifolius Raddi* (Aroeira) com o indicativo etnográfico frente a nove amostras de *Staphylococcus* coagulase positivo metilina resistente coletadas de cães hígidos oriundos do Canil Municipal do Centro de Controle de Zoonoses de Pelotas;RS sendo uma cepa de referência utilizada para os controles. Foram preparadas exsiccatas de cada planta, segundo Ming (1995). A identificação e a conservação foram realizadas no herbário do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Pelotas (UFPel). As plantas em estudo foram submetidas ao processo de extração hidroalcoólica, segundo a Farmacopéia Brasileira (1959) com adaptação necessária para realização do experimento.

Material vegetal

Foram coletadas amostras das partes aéreas das plantas na Estação Experimental Cascata - Embrapa Clima temperado, Pelotas; RS localizada nas coordenadas geográficas 31° 37'S e 52° 31'W.

As amostras foram coletadas entre fevereiro e julho de 2011, sempre no período da manhã, de acordo com a distribuição natural e disponibilidade das espécies. As plantas foram secas em temperatura ambiente, para que as mesmas obtivessem um teor de água inferior ou próximo a 10%, sendo mantidas sobre tela, em local protegido da luz solar direta e de insetos.

Obtenção dos extratos vegetais

Os extratos hidroalcoólicos (EHAs) das plantas foram preparados utilizando-se parte da planta(folhas) seca para dez partes de álcool de cereais (1:10) a 70° GL. As plantas permaneceram por 15 dias em frascos com agitação manual diária, conforme a Farmacopéia Brasileira (2010), em seguida o extrato foi filtrado e seu o volume inicial repostado com o álcool. Após, o solvente foi extraído utilizando-se evaporador rotativo em aproximadamente 55°C sob 600 mm/hg de pressão negativa e o volume inicial restituído com água destilada estéril (PRESTES, 2008).

Isolados bacterianos

Foram utilizadas cepas de *Staphylococcus* coagulase positiva metilina resistentes (n=9) isoladas de cães, além de cepa de referência de *Staphylococcus aureus* (ATCC 12600).

Atividade Antimicrobiana bactericida

A atividade antimicrobiana, dos EHAs foi avaliada através da técnica de diluição em caldo em microplaca com determinação da concentração inibitória mínima (CIM) realizada pelo método de diluição em microplaca (SCHUCH, 2007). Os inóculos foram preparados com uma suspensão bacteriana equivalente a 10^6 UFC / mL. Os EHAs foram diluídos em base logarítmica dois em água destilada estéril (ADE). Após diluição dos extratos vegetais e adição dos inóculos os microrganismos foram mantidos sob temperatura de 37°C por 48 horas. Os testes foram realizados em triplicatas e a CIM foi estabelecida através da média geométrica da recíproca da diluição dos extratos vegetais que inativou o microrganismo, sendo demonstrado por meio de cultura de uma alíquota do conteúdo de cada de todos os orifícios da microplaca, após completado o período de incubação (OYARZABAL *et al*, 2011).

RESULTADOS

Os gráficos abaixo apresentam os resultados de concentração inibitória mínima (CIM) dos Extratos Hidroalcoólicos (EHA) *Baccharis trimera*(carqueja), *Tagetes minuta* (Chinchilho), *Syzygium cumini* (Jambolão) e *Schinus terebinthifolius Raddi*(Aroeira), utilizando o método de microdiluição em caldo. A CIM variou para todos os extratos de 1 à 63,28% frente aos isolados de *Staphylococcus* coagulase metilicina resistente (SMRA) provenientes das amostras de cães coletadas.

O extrato hidroalcoólico de *Cymbopogon citratus* (Capim limão) não foi efetivo em nenhuma concentração. Dentre as cinco espécies de plantas ensaiadas, o extrato de *Schinus terebinthifolius Raddi* (Aroeira) demonstrou melhor efeito antimicrobiano frente a *Staphylococcus* coagulase positiva metilicina resistente (SMRA), com os valores de CIM variando de 3,95 às 31%, demonstrando um padrão frente as 9 cepas testadas.

Resultados da efetividade antibacteriana das Concentrações Inibitórias Mínimas (CIM) dos extratos hidroalcoólicos (EHA) de *Baccharis trimera* (carqueja) - **Fig.1**, *Tagetes minuta* (Chinchilho)- **Fig.2**, *Syzygium cumini* (Jambolão)- **Fig.3** e *Schinus*

terebinthifolius Raddi (Aroeira)- **Fig.4** determinada pelo método de microdiluição em caldo frente aos *Staphylococcus* meticilina resistentes.

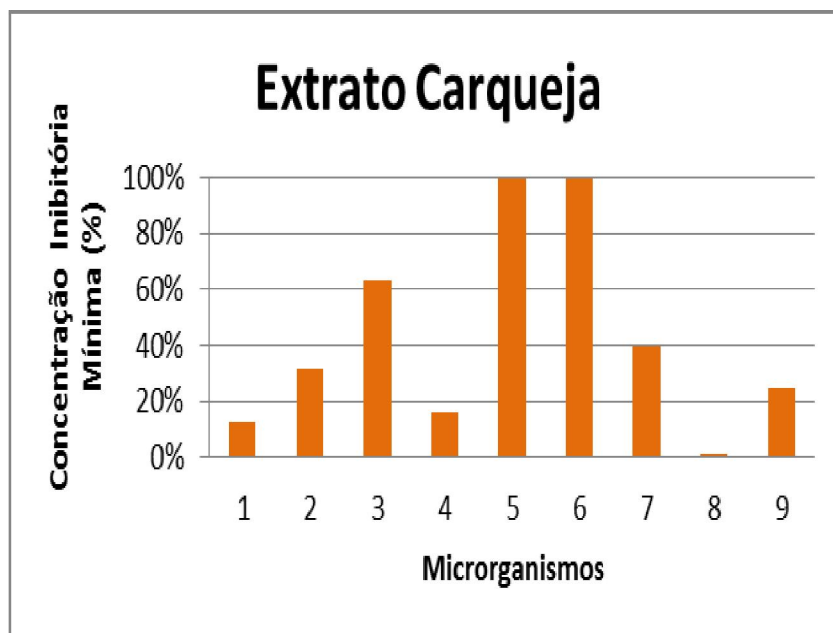


Figura 1- Concentração Inibitória Mínima (CIM) do extrato hidroalcoólico (EHA) de *Baccharis trimera* (Carqueja) em isolados clínicos meticilina resistente.

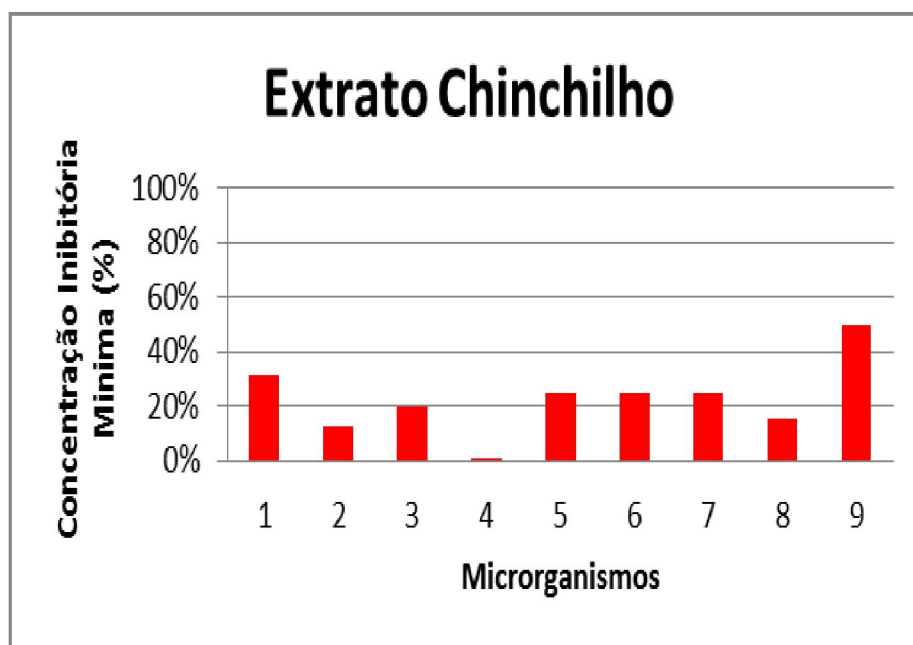


Figura 2 - Concentração Inibitória Mínima (CIM) do extrato hidroalcoólico (EHA) de *Tagetes minuta* (Chinchilho) em isolados clínicos meticilina resistente.

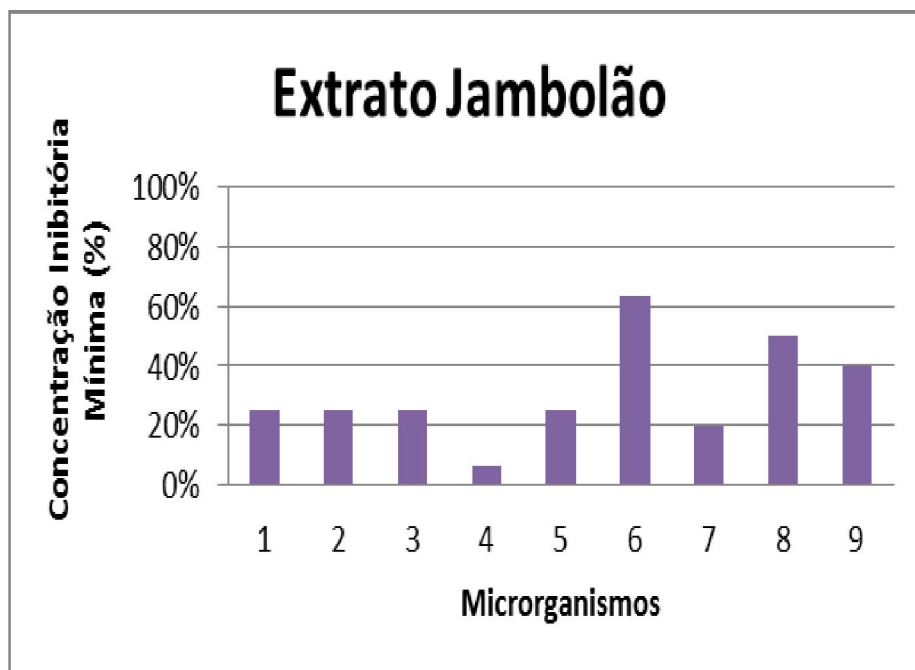


Figura 3 - Concentração Inibitória Mínima (CIM) do extrato hidroalcoólico (EHA) de *Syzygium cumini* (Jambolão) em isolados clínicos metilina resistente.

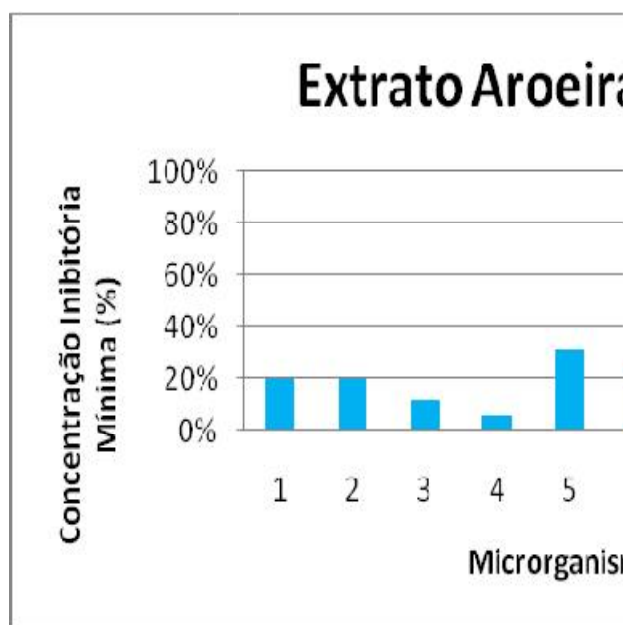


Figura 4- Concentração Inibitória mínima (CIM) do extrato hidroalcoólico (EHA) de *Schinus terebinthifolius Raddi* (Aroeira) em isolados clínicos metilina resistente.

DISCUSSÃO

A resistência bacteriana aos antimicrobianos tem se tornado um sério problema de saúde pública, por este motivo é preciso sempre a busca de novas fontes terapêuticas os quais sejam mais eficientes para o tratamento de infecções, como as bacterianas.

O uso de plantas medicinais é prática comum na medicina popular, por isso os produtos naturais se tornaram uma alternativa extremamente viável, uma vez que sempre foram importantes para o descobrimento de novas drogas, sendo fornecedoras de princípio ativo e por ser também uma alternativa mais econômica no controle de doenças.

De acordo com a literatura, o extrato de Aroeira possui efeito frente a bactérias gram-negativas e gram-positivas. Em um estudo realizado por Guerra *et. al* (2000), o extrato fluido (etanol a 80%) de folhas de *Schinus terebinthifolius Raddi* apresentou atividade antimicrobiana em diferentes concentrações frente às bactérias *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* e à levedura *Candida albicans* mediante avaliação pelo método de difusão em ágar por perfuração.

SOARES *et. al* (2006) em um estudo sobre a atividade antimicrobiana de diversas tinturas, inclusive a de Aroeira, demonstrando susceptibilidade variada das bactérias testadas, sendo *Staphylococcus aureus* o microrganismo mais sensível. Utilizando o método da difusão em ágar por perfuração, verificou que dentre as tinturas, o Jucá, a Aroeira e a Própolis apresentaram uma significativa atividade antibacteriana sobre *S. mutans*, *S. sobrinus*, *S. mitis*, *S. sanguis* e *L.casei*.

Considerando a riqueza de constituintes presentes em plantas, a atividade antimicrobiana positiva do extrato de Aroeira frente a amostras de *S. aureus*, pode ser devido à presença de compostos como: taninos (compostos polifenólicos) além de compostos presentes em menor quantidade, como os alcalóides, esteróides, chalcones e urundevinas (MATOS, 1994; OLIVEIRA, 1993). Uma vez que estes compostos têm comprovada ação antimicrobiana, e que compostos fenólicos possuem

uma ação inespecífica sobre a célula bacteriana, rompendo sua parede celular, inibindo os sistemas enzimáticos para a formação da mesma.

Estes compostos além da atividade antibacteriana são considerados responsáveis pela ação antifúngica, antiinflamatória, o que confere largo uso desta planta no tratamento de doenças infecciosas e inflamatórias (ALMAGBOUL *et* CHAABRA, 1990; HANDA, 1992; MATOS, 1994).

CONCLUSÃO

O extrato hidroalcolico da folha de *Schinus terebinthifolius raddi* (Aroeira), produziu significativa atividade antimicrobiana *in vitro* sobre as linhagens de *Staphylococcus* coagulase *positivo* resistentes à metilina (MRSA) de origem canina. Conclui-se que a aroeira, carqueja, jambolão e chincchilho apresentam-se como uma eficaz alternativa terapêutica para infecções provocadas por *Staphylococcus* metilina resistente, sendo de baixo custo e de fácil acesso a população, uma vez que já está difundido seu uso na medicina popular.

REFERÊNCIAS

AGRA, M. *et al.* 2007. Synopsis of the plants known as medicinal and poisonous in Northeast of Brazil. Rev. bras. farmacogn, v.17,1, p.114-40.

ALMAGBOUL, A.Z.; FAROUK, A.; BASHIR, A. K.; KARIM, A.; SALIH, A. 1985. Antimicrobial activity of certain sudanese plants used in folkloric medicine. Screening for antibacterial activity. Part II. Fitoterapia, v.56, n.2, p. 103-109.

ALMEIDA, S.B.D *et al.* 2011. Aplicación de plantas medicinales para la antisepsia de pezones de vacas posordeño. Rev Cubana Plant Med, v.16, n.3, p.253-259.

BRAGA, F. G.; BOUZADA, M. L. M.; FABRI, R. L.; MATOS, M. DE O.; MOREIRA, F. O.; SCIO, E.; COIMBRA, E. S. 2007. Anti leishmania and anti fungal activity of plant used in traditional medicine in Brazil. Journal of Ethnopharmacology, Lausanne, v. 111, p. 396-402.

BRITO, F. A.; LIMA, L. A.; RAMOS, M. F. S.; NAKAMURA, M. J.; MACHADO, S. C. C.; SIANI, A. C.; HENRIQUES, M. G. M. O.; SAMPAIO, A. L. F. 2007. Pharmacological

study of anti-allergic activity of *Syzygium cumini* (L.) Skeels. Brazilian Journal of Medical and Biological Research, Ribeirão Preto, v. 40, p. 105-115.

BRASIL, OV.; CARDOSO, J.L.C.; FRANÇA, F.O.S.; WEN, F.H.; MÁLAQUE.C.M.S.; HADDAD, JR.V. 2009. Animais peçonhentos no Brasil: Biologia, Clínica e Terapêutica dos acidentes. São Paulo: Sarvier. v. 1456, p. 36-46.

BRANCO NETO MLC *et al.* 2006. Avaliação do extrato hidroalcoólico de Aroeira (*Schinus terebinthifolius* Raddi) no processo de cicatrização de feridas em pele de ratos. Acta Cir. Bras., 21(Sup.2): 17-22.

COWAN, MM 1999. Plants products as antimicrobial agents. Clin Microbiol Rev 12: 564-582. Nascimento GGF, Locatelli J, Freitas PC, Silva GL 2000. Antibacterial activity of extracts and phytochemicals antibiotic-resistant bacteria. Braz J. Microbiol 31: 247-256

CHHABRA, SC.; VISO, FC. 1990. A survey of the medicinal plants of Eastern Tanzania for alkaloids, flavonóides, saponins and ta-nins. Fitoterapia, v.61, n.4, p. 307-316.

DUARTE, MCT, 2006. Rev: Atividade Antimicrobiana de Plantas Medicinais e Aromáticas Utilizadas no Brasil; Universidade Estadual de Campinas, Centro Pluridisciplinar de Pesquisas Químicas, Biológicas e Agrícolas DMB – Divisão de Microbiologia, Campinas, SP.

FARMACOPÉIA DOS ESTADOS UNIDOS DO BRASIL 1959. 2.ed. São Paulo: Siqueira, 610p.

FARMACOPÉIA BRASILEIRA -5º Edição, Agencia Nacional de Vigilância Sanitária, Brasília; 2010.

GOLENIOWSKI, M.E. *et al.* Medicinal plants from the "Sierra de Comechingones", Argentina. Journal of Ethno pharmacology, Lausanne, v.107, p. 324-341, 2006. Disponível em: <http://www.sciencedirect.com>. Acesso em 25 março.2013.

GUERRA, M^a. J. M.; BARREIRO, M. L.; RODRIGUEZ, Z. M.; RUBALCADA, Y. 2000. Actividad antimicrobiana de un extracto fluido al 80% de *Schinus terebinthifolius* Raddi. Inst. Superior de Ciencias Médicas de La Habana. Revista Cubana Plant. Med., v.5, n.1, p. 5-23.

GUERRA, M.J.M.; Badell, J.B.; Albajes, A.R.R.; Pérez, H.B.; Valencia, R.M.; Azcuy, A.L.. Evaluación toxicológica aguda de los extractos fluidos al 30 y 80% de *Cymbopogon citratus* (D.C.) Stapf (Caña Santa). Revista Cubana de Plantas Medicinales. v.5, n.1, p. 97-101, 2000.

HANDA, S. S.; CHAWLA, A. S.; SHARMA, A. K. 1992. Plants with anti-inflammatory activity. Fitoterapia, v.63, n.1, p.3-31.

JAIN, N.C. Common Mammary Pathogens and Factors in Infection and Mastitis. *Journal of Dairy Science*. v.62, n.1, p.128-134, 1979.

LEAL, T.C.A.B. 2003. Freitas, S.P.; Silva, J.F.; Carvalho, A.J.C. Produção de biomassa e óleo essencial em plantas de capim cidreira *Cymbopogon citratus* (DC.) Stapf em diferentes idades. *Revista Brasileira de Plantas Mediciniais*. v.5, n.1, p. 61-6.

LIMA, L. A.; SIANI, A. C.; BRITO, F. A.; SAMPAIO, A. L. F.; OLIVEIRA, M. G. M.; RIEHL, H. C. A. S. 2007. Correlation of anti-inflammatory activity with phenolic content in the leaves of *Syzygium cumini* (L.) skeels (Myrtaceae). *Quimica Nova*, São Paulo, v. 30, n. 4, p. 860-864.

LIPINSKI, L.C. 2012. Comparação da atividade cicatrizante na pele bovina entre fitoterápicos de uso tópico. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2008. Disponível em: <http://hdl.handle.net/1884/24103>. Acesso em 25 de jan.2012.

LORENZI H, MATOS F.J. 2002. A. Plantas medicinais no Brasil: nativas e exóticas. Nova Odessa (SP): Instituto Plantarum; p. 544.

LOGUERCIO, A.P.; BATTISTIN, A.; VARGAS, A.C.; HENZEL, A.; WITT, N.M. 2005. Atividade antibacteriana de extrato hidro-alcoólico de folhas de jambolão (*Syzygium cumini* (L.) Skells. *Ciência Rural*, Santa Maria, v.35, n.2, p.371-376.

LORENZI, H.; MATOS, F. J. A. Plantas medicinais do Brasil: nativas e exóticas. Computação gráfica Henrique Marins Lauriano. 2. ed, p.560. Nova Odessa, SP: Instituto Plantarum, 2008.

LUCENA, P.L.H., RIBAS-FILHO J.M.; NASCIMENTO, M.M.; CZECKO, N.G.; DIETZ, U.A.; CORREA-NETO, M.A.; HENRIQUES, G.S.; SANTOS, O.J.; CESCHIN, A. P.; THIELI, E.S. 2013. Avaliação da ação da Aroeira (*Schinus terebinthifolius Raddi*) na cicatrização de feridas cirúrgicas em bexiga de ratos. *Acta Cir Bras.*, vol.21, 2006; Suppl 2: 46-51. Disponível em: <http://www.ibb.unesp.br/serviços/publicações/rbpm/pdf-volv9-n3-2007/artigo9-v9-n3.pdf>. Acesso em: 17 setembro 2013.

M.A.M. *et al.* Plantas medicinais: a necessidade de estudos multidisciplinares. *Química Nova*, v.25, n.3, p.429 - 438, 2002. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-22022000300016&lng=en&nrm=iso>. Acesso em: 20 out. 2011.

MATOS, F. J. A. 1994. Farmácias vivas. 2. ed. Fortaleza: EUFC, 320p.

MEDEIROS K.C.P, 2007. MONTEIRO J.C, DINIZ MFFM, MEDEIROS IA, SILVA BA, PIUVEZAM MR. Effect of the activity of the Brazilian polyherbal formulation: Eucalyptus globules Labill, Peltodon radicans Pohl and *Schinus terebinthifolius Raddi* in inflammatory models. *Braz J of Pharmacogn*, 17(1): 23-28.

MICHELIN,C.P.E.,MORESCH,A.C,LIMA,G.G.F,NASCIMENTO,M.O,AGANELLMV,CHAUD 2005. Avaliação da atividade antimicrobiana de extratos vegetais *P.E.* Revista Brasileira de Farmacognosia Brazilian Journal of Pharmacognosy 15(4): 316-320, Out./Dez.

MING, L. C. Coleta de plantas medicinais. *In*: DI STASI, L.C. 1995. Plantas medicinais: arte e ciência. São Paulo: UNESP. 230p. p.69-86

OLIVEIRA, E. R.1993. Plantas medicinais Brasileiras. São Paulo: Hemus editora Ltda. 196p.

ONG,K.C.;KHOO,H. E .2000. Effects of myricetin on glycemia and glycogen metabolism in diabetic rats. Life Sciences, Amsterdam, v. 67, p. 1695-1705.

OLIVEIRA, G. F.; FURTADO, N. A. J. C.; FILHO, A. A. S.; MARTINS, C. H. G.; BASTOS, J. K.; CUNHA, W. R.; SILVA, M. L. A. 2007. Antimicrobial activity of *Syzygium cumini* (Myrtaceae) leaves extract. Brazilian Journal of Microbiology, São Paulo, v. 38, p. 381-384, 2007.

OYARZABAL,M.E.B.;SCHUCH,L.F.D.; PRESTES, L.S.P.;SCHIAVON, D.B.A.;RODRIGUE S,M.R.A.; MELLO, J.R.B.2011. Actividade antimicrobiana de aceite essencial de *Origanum vulgare* L. ante bactérias ais La da sem leche de bovino. Revista Cubana de Plantas Medicinales.v.16, n.3, p.260-266.

PEPATO, M.T. FOLGADO, V.B.B.; KETTELHUT, I.C.; BRUNETTE, I.L.; 2001. Lack antidiabetic effect of a *Eugenia jambolana* leaf decoction on rat streptozotocind diabetes. Brazilian Journal of Medical and Biological Research, Salvador, v.34, p. 389-395.

PIO CORRÊA, M., 1984, Dicionário das plantas úteis do Brasil e das exóticas cultivadas. Rio de Janeiro; Ministério da Agricultura/ IBDF, v. 2, p. 429-430.

PRESTES,L.S.; Frascolla,R.; Santin, R.; dos Santos' M.A.Z.; Schram,R.C.; Rodrigues, M.R.A.; Schuch,L.F.D.; Meireles, M.C.A.2008. Actividad de extractos de orégano y tomillo frente a microorganismos asociados a otitis externa. Revista Cubana Plantas Medicinales. v.13 n.4.

SCHUCH, L. F. D.2007. Plantas medicinais em atenção primária veterinária: atividade antimicrobiana frente a bactérias relacionadas com mastite bovina e com dermatófitos. Tese de Doutorado. PPG em Ciências Veterinárias, UFRGS.256p.

SCHUCH, L. F. D.; WIEST, J. M.; COIMBRA, H.S.; PRESTES, L.S.; TONI, L.; LEMOS, J. S.2008. Cinética da atividade antibacteriana in vitro de extratos naturais frente a microrganismos relacionados à mastite bovina. Ciência Animal Brasileira, v. 9, n. 1, p. 161-169, jan./mar.

SCHUCH, L. F. D.; WIEST, J. M.; GARCIA, E. N.; PRESTES, L. S.; SCHRAMM, R. SOARES DGS, OLIVEIRA CB, LEAL C, DRUMOND MRS, PADILHA WWN. 2007. Atividade Antibacteriana *in vitro* da Tintura de Aroeira (*Schinus terebinthifolius*) na Descontaminação de Escovas Dentais Contaminadas pelo *S. mutans*. Pesq Bras Odontoped Clin Integr, 7(3): 253-257.

SOARES, D. G. S.; OLIVEIRA, C. B.; LEAL, C.; DRUMOND, M. R. S.; PADILHA, W. W. N. 2006. Susceptibilidade *in vitro* de bactérias bucais a tinturas fitoterápicas. Fac. Odonto/PUCRS, v. 21, n. 53, jul./set.

SOUZA, C. A.S.; AVANCINI, C.A.M.; WIEST, J.M. 2000. Atividade antimicrobiana de *Tagetes minuta* L. - *Compositae* (Chinchilho) frente a bactérias Gram-positivas e Gram-negativas. Braz. J. Vet. Res. Anim. Sci. vol.37 no.6 São Paulo Dec.

SOLDATELLI, M.V. *et al. valeriana officinalis*: uma alternativa para o controle da ansiedade odontológica? Stomatos, v.16, n.30, p. 89- 97, jan./jun. 2010. Disponível em: <http://www.ulbra.br/odontologia/stomatos/v16n30jan-jun2010/89.valeriana-officinalis-uma-alternativa-para-o-controle-da-ansiedade-odontologica.pdf>. Acesso em: 06 de setembro 2013.

STRATTON MDCW. 2000. Nuances in antimicrobial susceptibility testing for resistant Gram - positive organisms. Antimicrobol Infec Dis New 18:57-64.

SNYDER, E. L. *et al.* 2004. Treatment of terminal Peritoneal Carcinomatosis by a Transducible p53 - Activating peptide. Los Biology. v.2 (2), p.0186 - 0193.

TIMBOLA, A. K.; SZPOGANICZ, B.; BRANCO, A.; MONACHE, F. D.; PIZZOLATTI, M. G.A , 2002. New flavonol from leaves of *Eugenia jambolana*. Fitoterapia, Amsterdam, v. 73, n. 2, p. 174-176.

VIDA, J.B.; Júnior, A.A.C.; Verzignassi, J.R. 2006. Primeira ocorrência de ferrugem em capim-limão causada por *Puccinia cymbopogonis* no Brasil. Summa Phytopathology. Botucatu, v. 32, n. 1, p. 89-91.

KUSKOSKI, E.M.; MARQUES, P.T.; FETT, R. 2000. Estudo comparativo da estabilidade das antocianinas do baguaçu, jambolão e da uva. Revista Brasileira de Corantes Naturais, Vitória da Conquista, v. 4, n. 1/2, p. 73-76.

HOESKTRA, K.A, *et al* Clinical prevalence and antimicrobial susceptibility of *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus intermedius* in dogs. Journal of Applied Microbiology 93,406-413.2002.

4 CONCLUSÃO GERAL

O *Staphylococcus spp*, bactéria de reconhecida importância médica, tornou-se uma “bactéria-problema” no âmbito da saúde pública mundial. O amplo espectro de resistência que os isolados têm apresentado ao lado das altas taxas de prevalência dos mesmos, colocada as cepas resistentes, em especial as cepas *S. metilicina resistente (MRSA)*, como um verdadeiro desafio à saúde pública. De acordo com o estudo concluiu-se a presença de cepas *S. metilicina resistente (MRSA)* na cavidade nasal e anal de cães saudáveis, cães com otite/dermatite, em leite de vacas com mastite na cavidade nasal de graduandos da Faculdade de Medicina Veterinária e profissionais da área da saúde.

Essas cepas têm expressiva importância clínica e epidemiológica, não só em função das altas taxas de incidência de suas infecções, mas principalmente pela dificuldade encontrada no tratamento das mesmas, o que, por sua vez, implica nas taxas de letalidade, que são bem maiores quando comparadas às infecções causadas por cepas sensíveis à metilicina.

Mais recentemente tem sido observada uma importante mudança no padrão epidemiológico das infecções por MRSA: elas não são mais problemas exclusivos do ambiente hospitalar. Ocorrências de infecções por MRSA na comunidade são cada vez mais frequentes.

O que se percebe é que a necessidade da adoção de medidas de controle mais eficazes e viáveis no caso das cepas MRSA é imprescindível. A conscientização dos profissionais de saúde no tocante à prevenção das infecções hospitalares deve ser mais criteriosa, ratificando a necessidade da adoção de todas as medidas propostas, desde as mais simples, como a lavagem das mãos, até as mais complexas, como o uso racional de antimicrobianos. Vale lembrar que tal conscientização deve ser estendida

também ao ambiente comunitário, em decorrência da mudança no padrão epidemiológico das cepas MRSA.

Diante do exposto, os extratos vegetais oriundos de *T. minuta* (Chinchilho), *Schinus terebinthifolius Raddi* (Aroeira), *Syzygium cumini* (Jambolão) e *Baccharis trimera* (Carqueja) mostraram eficiência sobre as bactérias *S. coagulase* positiva metilina resistente (SMRA). Deste modo, visando o controle da resistência microbiana, sugere-se uso das plantas como tratamento alternativo das doenças infecciosas e substituição aos antibióticos convencionais.

5 REFERÊNCIAS

CIFTY, A. et al. Detection of methicilin resistance and slime factor production *Staphylococcus aureus* in bovine mastitis. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 40, n.2, p.254 - 261. 2009.

COUTINHO, H.D.M. et al.. *In vitro* anti-staphylococcal activity of *Hyptis martiusii* Benth against methicilin-resistant *Staphylococcus aureus*: MRSA strains. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 18, p.670-675. 2008.

DEURENBERG, R.H. & STOBBERINGH, E.E. The evolution of *Staphylococcus aureus*. **Infection, Genetics and Evolution**, v. 8, n.6, p. 747-763. 2008.

FAIRES, M.C. Methicillin-resistant and susceptible *Staphylococcus aureus* infections in dogs. **Emerging Infectious Diseases**, v. 16, n.1, p.69-75, 2010.

GANDRA, T.K.V. et al. Perfil de resistência/sensibilidade a antibióticos em cepas de estafilococos coagulase positiva de embutidos e queijos. XVIII CIC – UFPel, Pelotas, RS. 2009. Disponível em: http://www.ufpel.edu.br/cic/2009/cd/pdf/CA/CA_01123.pdf, Acesso em: 23/03/2010.

GREENE, C.A. **Infectious disease of the dog and cat**. 3 ed., WB Saunders, 2006. 1424p.

GRIFFETH, G.C. et al. Screening for skin carriage of methicillin-resistant coagulase-positive *staphylococci* and *Staphylococcus schleiferi* in dogs with healthy and inflamed skin. **Vet. Dermatol.**, v. 19, n.3, p. 142-149. 2008.

HANSELMAN, B.A. et al. Coagulase positive staphylococcal colonization of humans and their household pets. **The Canadian Veterinary Journal**, v. 50, n.9, p.954-958. 2009.

LOEFFLER A., et al. First report of multiresistant, *mecA*-positive *Staphylococcus intermedius* in Europe: 12 cases from a veterinary dermatology referral clinic in Germany. **Veterinary Dermatology**, V.18, n.6, p. 412-421, 2007.

MENDES, W.R.S. **Resistência “in vitro” aos antimicrobianos de isolados de *Staphylococcus* associados a dermatites caninas.** 2011. 95f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) - Programa de Pós Graduação em Clínica Veterinária e Reprodução Animal, Universidade Federal Fluminense, Niterói

MOURA *et al.* J.P. A colonização dos profissionais de enfermagem por *Staphylococcus aureus*. **Rev. Latino-Am. Enfermagem**, v.19, n.2, p.1-7. 2011.

REMONATO,G. *et al.* CA-MRSA: um patógeno emergente. **News lab**, ed.80, 2007.
ROSENBACH, A.J. MIKRO-Organismen beiden Wund-Infecções Krankheitendes Menschen Wiesbaden, JF Bergmam,1884.P.18.

SILVA, J.G. *et al.* Atividade antimicrobiana do extrato de *Anacardium occidentale* Linn. em amostras multiresistentes de *Staphylococcus aureus*. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 17, n.4, p.572-577. 2007.

TENHAGEN, B.A. *et al.* Prevalence of mastitis pathogens and their resistance against antimicrobial agents in dairy cows in Brandenburg, Germany. **Journal of Dairy Science**, v.89, n.7, p. 2542– 2551, 2006.

VANDERHAEGHEN, W. *et al.* Methicilin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) ST398 associated with clinical and subclinical mastitis in Belgian cows. **Veterinary Microbiology**, v.144, n. 1,2. P.166-171. 2010.

ANEXOS

ANEXO I e ANEXO III – Modelo de ficha da coleta de dados de cães não domiciliados oriundos do Canil Municipal e Cães de Clínicas particulares/HCV do Município de Pelotas; RS.

FICHA DO ANIMAL			
N° apreensão: _____	n°.doc.: _____	data: _____	
Local da apreensão: _____			

Histórico: _____			

Agressões confirmadas _____			

Identificação (nome/ n°): _____		Boxe n°: _____	
Tatuagem _____			
Idade: _____	Sexo: _____	Raça: _____	Porte: _____
Pelagem: _____	Cor: _____	Cauda: _____	
Obs.: _____			
Comportamento: _____			
Período de observação:			
1° atestado ____/____/____			

2° atestado ____/____/____			

Boletim de sanidade:			

Desparasitação Interna ____/____/____ Desparasitação Externa ____/____/____			

Vacina da Raiva ____/____/____		Outros: ____/____/____	
Tratamentos/internação:			

ANEXO II - Modelo de ficha da coleta de dados de cães domiciliados- Residências – Bairros do Município de Pelotas; RS.

<u>Questionário de investigação epidemiológica de cães domiciliados</u>	
Data da Coleta:	_____
Endereço da coleta:	_____
1. Nome:	_____
2. Origem do cão:	_____
3. Idade:	_____
4. Sexo:	_____
5. Raça:	_____
6. Tipo de pelame:	_____
7. Tamanho:	_____
8. Proximidade com homem:	() Sim () Não
9. Permanência:	Interior da residência () Pátio ()
10. Enfermidades:	_____
11. História de tratamento prévio:	_____
12. História de infecções em seres humanos compatível com estafilococose:	_____

ANEXO IV- Modelo da ficha da coleta de dados de amostras Vacas com mastiteVacas com mastite

Data: ____ / ____ / ____.

Nº Amostra: _____

Local da coleta: _____

Vaca/ teto: _____ () AD () PD () AE () PE ()

Mastite: () Sim () Não

Tratamento: () Sim () Não

Raça: _____

ANEXO V- Ficha da coleta de dados dos Alunos da graduação da Faculdade de Veterinária e trabalhadores em saúde animal.



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS
FACULDADE DE VETERINÁRIA
DEPARTAMENTO DE VETERINÁRIA PREVENTIVA
LABORATÓRIO DE DOENÇAS INFECCIOSAS

PROJETO DE PESQUISA:

PESQUISA DE *STAPHYLOCOCCUS* COAGULASE POSITIVA METICILINA RESISTENTE EM ANIMAIS E TRABALHADORES EM SAÚDE ANIMAL E PROSPECÇÃO DE PLANTAS MEDICINAIS PARA SEU CONTROLE.

Responsável: MSc. Anna Beatriz Pizarro Chaffé – (Fone: 32847731)

Orientador: Dr Luiz Filipe DaméSchuch (fone: 32757561)

Questionário de Investigação Epidemiológica e Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

1. Data: _____; 2. Local da coleta: _____
 3. Identificação: _____ - _____ (primeiro nome e número da coleta)
 4. Sexo: Masc () Fem () 5. Idade: _____
 4. Profissão: _____ 5. Estudante / semestre: _____
 6. Contato: Cães sadios () Cães doentes em tratamento () nenhum contato ()
 7. Intensidade: Diária () 1-3 por semana () menos que semanal ()
 8. Local de contato: HCV () clínicas () Casa () outro: _____
 9. Faz uso de material de proteção: () Sim, qual? _____ () Não
() sempre () quando é obrigatório () as vezes
 10. Fez uso de antimicrobiano nos últimos 30 dias: () Sim, Qual? _____ () Não
 11. Possui algum histórico de infecção bacteriana nos últimos 60 dias? _____
- Onde? _____, Qual etiologia? _____ () não realizado.

Eu, _____ declaro que concordo em participar como colaborador do projeto acima identificado, permitindo que seja coletado suabe nasal e respondendo este questionário, e afirmo que fui informado (a) de maneira clara e detalhada sobre os objetivos e metodologia da pesquisa proposta e esclareci minhas dúvidas, estando ciente que a qualquer momento, poderei solicitar novas informações e modificar minha decisão sobre esta colaboração, se assim o desejar. O sigilo pessoal será garantido, sendo os dados publicados pelos autores de forma genérica e coletiva, sem identificação individual dos colaboradores.

ANEXO VI - Ficha caracterizações –Laboratório Doenças Infecciosas

	COAGULASE	NITRATO	HEMÓLOSE SG. OV.	VP	GALACTOSE	MALTOSE	MANITOL	TREALOSE	RIBOSE	RESIST. POLIMIXINA
<i>S. aureus sub. aureus</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>S. aureus sub. anaerobius</i>	+	-	+	-	-	+	-	-	-	
<i>S. delphini</i>	+	+	+	-		+	1	-		-
<i>S. hyicus</i>	d	+	-	-	+	-	-	+	+	+
<i>S. intermedius</i>	+	+	d	-	+	2	d	+	+	-
<i>S. lutrae</i>	+	+	+	-	+	+	+	+		-
<i>S. pseudointermedius</i>	+	+	+	+	+	+	3	+	+	-
<i>S. sheleiferi sub. coagulase</i>	+	+	+	+	+	-	d	-	+	-

(+): positivo (-): negativo

(d): variável (1): + fraco

(2): - ou fraco +(3): lento e fraco +