JUAN DAVID VALENCIA BACCA

**Pesquisa de genes codificadores de adesinas em *Staphylococcus* spp.
isolados de amostras clinicas em cães e gatos**

São Paulo

2015

JUAN DAVID VALENCIA BACCA

Pesquisa de genes codificadores de adesinas em *Staphylococcus* spp.

isolados de amostras clinicas em cães e gatos

Dissertacao apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Epidemiologia Experimental Aplicadas às Zoonoses da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências

Departamento:

Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Animal.

Área de Concentração:

Epidemiologia Experimental Aplicada às Zoonoses

Orientador

Prof. Dr. Nilson R. Benites

São Paulo

2015

Autorizo a reprodução parcial ou total desta obra, para fins acadêmicos, desde que citada a fonte.

DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO-NA-PUBLICAÇÃO

(Biblioteca Virginie Buff D'Ápice da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da
Universidade de São Paulo)

T.3085
FMVZ

Bacca, Juan David Valencia
Pesquisa de genes codificadores de adesinas em *Staphylococcus* spp. isolados de
amostras clínicas em cães e gatos / Juan David Valencia Bacca. -- 2015.
118 f. :il.

Dissertação (Mestrado) - Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina
Veterinária e Zootecnia. Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Saúde
Animal, São Paulo, 2015.

Programa de Pós-Graduação: Epidemiologia Experimental Aplicada às Zoonoses.
Área de concentração: Epidemiologia Experimental Aplicada às Zoonoses.

Orientador: Prof. Dr. Nilson R. Benites.

1. Animais de estimação. 2. Doenças infecciosas. 3. *Staphylococcus* spp. 4. Adesinas.
I. Título.

São Paulo, 19 de fevereiro de 2014
CEUAx N 4349281113

Ilmo(a). Sr(a).

Pesquisador(a): Nilson Roberti Benites

Executante: Juan David Valencia Bacca

Depto/Disc: Departamento De Medicina Veterinária Preventiva E Saúde Animal

Nilson Roberti Benites (orientador)

Título do projeto: ""Pesquisa de genes codificadores de adesinas em Staphylococcus spp. isolados de amostras clínicas obtidas de cães e gatos."".

Parecer Consubstanciado da CEUA FMVZ/USP

Este estudo tem como objetivos estimar a ocorrência dos genes codificadores de adesinas para Staphylococcus spp. em amostras clínicas de cães e gatos, e avaliar a susceptibilidade "in vitro" das estirpes Staphylococcus spp. isoladas frente a diferentes antimicrobianos, com amostras obtidas do banco de cepas processadas como parte da rotina do serviço diagnóstico do Laboratório de Bacteriologia e Micologia do departamento de Medicina Preventiva e Saúde Animal FMVZ/USP.

A Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, na reunião de 19/02/2014, **ANALISOU** e **APROVOU** o protocolo de estudo acima referenciado. A partir desta data, é dever do pesquisador:

1. Comunicar toda e qualquer alteração do protocolo.
2. Comunicar imediatamente ao Comitê qualquer evento adverso ocorrido durante o desenvolvimento do protocolo.
3. Os dados individuais de todas as etapas da pesquisa devem ser mantidos em local seguro por 5 anos para possível auditoria dos órgãos competentes.
4. **Relatórios parciais** de andamento deverão ser enviados **anualmente** à CEUA até a conclusão do protocolo.

Atenciosamente,

Profa. Dra. Denise Tabacchi Fantoni

Presidente da Comissão de Ética no Uso de Animais

Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo

São Paulo, 19th February 2014

CERTIFIED

Certificamos que o Projeto intitulado ""Pesquisa de genes codificadores de adesinas em Staphylococcus spp. isolados de amostras clínicas obtidas de cães e gatos." ", protocolado sob o CEUA nº 4349281113, sob a responsabilidade de Nilson Roberti Benites, foi aprovado na reunião de 19/02/2014, e está de acordo com os princípios éticos da Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo.

We certify that the Research "", protocol number CEUA 4349281113, under the responsibility Nilson Roberti Benites, was approved in the meeting of day 02/19/2014, and agree with Ethical Principles adopted by Ethic Committee on Animal Use of the School of Veterinary Medicine and Animal Science of the University of São Paulo.

yours faithfully,

Denise Tabacchi Fantoni
Coordinator of the Ethic Committee on Animal Use
School of Veterinary Medicine and Animal Science
University of São Paulo

FOLHA DE AVALIAÇÃO

Autor: BACCA, Juan David Valencia

Título: Pesquisa de genes codificadores de adesinas em *staphylococcus* spp.
isolados de amostras clinicas em cães e gatos

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Epidemiologia Experimental Aplicada às Zoonoses da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências

Data: ____/____/____

Banca Examinadora

Prof.Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof.Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof.Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Dedico esse trabalho aos meus pais Dario e Adelaida, aqueles que me ajudaram a construir o meu espaço neste mundo, meus maiores incentivadores, que sempre me ensinaram a lutar pelos meus sonhos.

A minha amada Tatiana pelo seu otimismo, apoio constante, carinho e compreensão,

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar a deus que me mostrou o caminho para fazer deste sonho uma realidade.

Agradeço a Universidade de São Paulo (USP) por permitir-me realizar estes estudos, em especial a faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia (FMVZ/USP), e ao Departamento de Medicina Veterinária Preventiva (VPS).

Ao meu orientador, o professor Dr. Nilson Roberti Benites pela oportunidade de acompanhar o seu trabalho durante estes anos de pós-graduação, pela paciência, ensinamentos e sabedoria que me transmitiu, muito obrigado por acreditar em minhas capacidades, e por depositar a confiança em mim para empreender esta viagem.

Dra. Priscilla Anne Melville obrigado pelo apoio constante, às boas ideias, e o esforço para que este projeto corresse bem.

A minha querida amiga e colega Eveline Zuniga pela amizade, a confiança, e os ensinamentos no universo da Microbiologia e a Biologia Molecular.

A Minha colega Patricia Braconaro pelo seu espírito de colaboração e a boa disposição de ajuda com as placas.

A o meu colega e amigo Raul Ossada, e novamente a minha namorada Tatiana Jimenez pela assessoria na área estatística.

A Carolina Torres Alejo, pela amizade, pela solidariedade, os bons conselhos, e os ensinamentos no complexo mundo da Biologia Molecular.

A Gina Polo, porque foi a primeira pessoa que me deu uma mão ao chegar a São Paulo, e me brindo sua amizade e apoio incondicional.

Aos funcionários do VPS, Danival, Cris e Virginia por toda a sua colaboração.

Ao pessoal da Biblioteca.

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (Capes), pela concessão da bolsa de mestrado.

RESUMO

BACCA, J. D. V. **Pesquisa de genes codificadores de adesinas em *Staphylococcus* spp. isolados de amostras clínicas em cães e gatos.** [Search for adhesins-encoding genes in *Staphylococcus* spp. Isolated from dogs and cats]. 2015. 118 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2015.

Os *Staphylococcus* spp., são bactérias Gram positivas com importância clínica, as quais são capazes de causar uma ampla variedade de doenças em seres humanos e animais. O uso excessivo de antimicrobianos pode selecionar bactérias resistentes aos antimicrobianos de uso comum em Veterinária, o que representa uma grande ameaça para a saúde animal, e a saúde pública no mundo inteiro. Apesar de sua importância clínica, existe um conhecimento limitado sobre a patogênese das infecções estafilocócicas em animais de estimação, e os fatores de virulência bacterianos específicos envolvidos em estas doenças. A Infecção estafilocócica iniciasse a partir da adesão do micro-organismo ao tecido do hospedeiro. A adesão é favorecida pela presença de fatores de virulência conhecidos como adesinas, que estão agrupadas em uma família conhecidas como as *microbial surface components recognising adhesive matrix molecules* (MSCRAMM). Após o isolamento e identificação dos micro-organismos, 118 estirpes de *Staphylococcus* spp., foram identificadas, 111 (94.07%), estirpes em cães, e 7 (5.93%) em gatos. Entre os *Staphylococcus*, sete espécies diferentes foram isoladas: 82 (69.49%) *Staphylococcus pseudintermedius*, 19 (16.10%) *Staphylococcus epidermidis*, 7 (5.93%) *Staphylococcus xylosus*, 4 (3.39%) *Staphylococcus chromogenes*, 3 (2.54%) *Staphylococcus* spp., 2 (1.69%) *Staphylococcus aureus*, 1 (0.85%) *Staphylococcus schleiferi*. A susceptibilidade a 26 agentes antimicrobianos foi determinada em todos os isolados. A pesquisa pelas MSCRAMM e o gene formador de biofilme nas estirpes de *Staphylococcus* spp., foi realizada usando a reação em cadeia da polimerase (PCR), foram usados diferentes pares de primers para detectar os genes que codificam para a proteína ligadora de colágeno (*cna*), proteína ligadora de laminina (*eno*), proteína ligadora de elastina (*ebpS*), proteína ligadora de fibrinogênio (*fib*), proteína A ligadora de fibronectina (*FnbA*), proteína B ligadora de fibronectina (*FnbB*), e proteína associada a formação

de biofilme (*Bap*). A resistência apresentada pelas estirpes isoladas aos diversos antimicrobianos foi observada com frequência, a percentagem de resistência geral das cepas de *Staphylococcus* spp isoladas foi: 54,32% para eritromicina, 40,79% para clindamicina, e 29,91% para norfloxacin. A susceptibilidade a oxacilina também foi testada, o 85,96% das estirpes isoladas foram susceptíveis. Todos os genes foram identificados com exceção do *Bap* e *EbpS*, o gene mais frequentemente isolado foi o *Eno* (89,9%), a associação entre os genes *Eno/Fib/FnbA* e *Eno/FnbB* foram também detectadas. Nossos resultados evidenciaram que os membros do gênero *Staphylococcus* apresentam frequentemente resistência *in vitro* aos antimicrobianos usados comumente. É necessário fazer um uso criterioso de antibióticos em animais de estimação em Medicina Veterinária. A informação sobre o assunto pode permitir o desenvolvimento de estratégias mais eficazes para o tratamento e controle das infecções causadas por *Staphylococcus* spp., em pequenos animais.

Palavras-chave: Animais de estimação. Doenças infecciosas. *Staphylococcus* spp. Adesinas.

ABSTRACT

BACCA, J. D. V. **Search for adhesins-encoding genes in *Staphylococcus* spp. Isolated from dogs and cats.** [Pesquisa de genes codificadores de adesinas em *staphylococcus* spp. isolados de amostras clínicas em cães e gatos]. 2015. 118 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2015.

Staphylococcus spp., are clinically important Gram-positive bacteria that are capable of causing a wide variety of diseases in humans and animals. The overuse of antimicrobials can select resistant bacteria strains, that represents a major threat to animal and public health worldwide. Despite its clinical importance, there is only very limited knowledge about the pathogenesis of staphylococcal infections in small animals, and the specific bacterial virulence factors involved in causing these diseases. Staphylococcal infection initiates from the adhesion of the microorganism to the tissue of the host. Adhesion is favoured by the presence of virulence factors known as adhesins, which are grouped in a family known as the *microbial surface components recognising adhesive matrix molecules* (MSCRAMM). After isolation and identification of microorganisms, 118 *Staphylococcus* strains were identified, 111 (94.07%) strains from canine and 7 (5.93%) from feline origin. Among *Staphylococcus*, seven different species were isolated: 82 (69.49%) *Staphylococcus pseudintermedius*, 19 (16.10%) *Staphylococcus epidermidis*, 7 (5.93%) *Staphylococcus xylosus*, 4 (3.39%) *Staphylococcus chromogenes*, 3 (2.54%) *Staphylococcus* spp., 2 (1.69%) *Staphylococcus aureus*, 1 (0.85%) *Staphylococcus schleiferi*. The susceptibility to 26 antimicrobials was determined in all the isolates. The search for MSCRAMM and biofilm-encoding genes in the strains of *Staphylococcus* spp. was performed using a polymerase chain reaction (PCR). Primers were used to detect the genes encoding for collagen-binding protein (*cna*), laminin-binding protein (*eno*), elastin-binding protein (*ebpS*), fibrinogen-binding protein (*fib*), fibronectin-binding protein A (*fnbA*) and fibronectin-binding protein B (*fnbB*) and biofilm formation-encoding genes (*bap*). Resistance of isolates to antibiotics was frequently observed, the percentage of resistance in the general *Staphylococcus* strains was: 54,32% to erythromycin, 40,79% to clindamycin, and 29,91% to norfloxacin. Susceptibility to oxacilin was also tested, 85,96%) % of the

isolates were susceptible. All genes were detected except for *ebpS* and *bap*. The most frequently detected gene in both species was *eno* (89, 9%). Association of genes *Eno/Fib/FnbA* and *Eno/FnbB* were also detected. Our results highlighted that members of the *Staphylococcus* genus often exhibit *in vitro* resistance to commonly used antimicrobials. Its necessary a judicious use of antibiotics in small animals Veterinary Medicine. Such information on the subject allows the development of more efficient strategies for treatment and control of *Staphylococcus* infection in small animals.

Keywords: Small animals. Infectious diseases. *Staphylococcus* spp. Adhesins.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Distribuição das faixas etárias (em numero absoluto e percentagem) para caninos e felinos	41
Tabela 2 - Frequência das raças felinas (em numero absoluto e percentagem)	42
Tabela 3 -Frequência das raças para cães (em numero absoluto e percentagem)	43
Tabela 4 - Frequência dos materiais e tecidos isolados (em numero absoluto e percentagem), em relação á espécie animal (cães e gatos), para o total de 118 amostras avaliadas.....	44
Tabela 5 - Frequência de ocorrência (em numero absoluto e percentagem), segundo a classificação em coagulase-positivo e coagulase-negativo.....	44
Tabela 6 - Frequência de ocorrência das estirpes de <i>Staphylococcus</i> (em numero absoluto e percentagem), segundo a classificação em coagulase-negativo	45
Tabela 7 - Frequência de ocorrência das estirpes de <i>Staphylococcus</i> (em numero absoluto e percentagem), segundo a classificação em coagulase-positivo.....	45
Tabela 8 - Frequência das bactérias isoladas em relação á espécie (cães – gatos) (em numero absoluto e percentagem).....	46
Tabela 9 - Frequência das bactérias isoladas (em numero absoluto e percentagem), em relação ao tecido	48
Tabela 10 - Frequência (em numero absoluto e percentagem) das estirpes de <i>Staphylococcus</i> spp. Isoladas de acordo com a susceptibilidade <i>in vitro</i> aos antimicrobianos testados	49
Tabela 11 - Frequência geral das estirpes de <i>Staphylococcus</i> coagulase-positivos de acordo com a susceptibilidade <i>in vitro</i> aos antimicrobianos testados.....	52
Tabela 12 - Frequência geral das estirpes de <i>Staphylococcus</i> coagulase-negativos de acordo com a susceptibilidade <i>in vitro</i> aos antimicrobianos testados.....	54
Tabela 13 - Teste <i>U</i> de <i>Mann Whitney</i> para Coagulase positivo e Coagulase negativo.....	57
Tabela 14 - Frequência (em numero absoluto e percentagem) das estirpes de <i>Staphylococcus aureus</i> . isoladas de acordo com a susceptibilidade <i>in vitro</i> aos antimicrobianos testados	58

Tabela 15	Frequência (em numero absoluto e percentagem) das estirpes de <i>Staphylococcus epidermidis</i> . isoladas de acordo com a susceptibilidade <i>in vitro</i> aos antimicrobianos testados	59
Tabela 16	- Frequência (em numero absoluto e percentagem) das estirpes de <i>Staphylococcus xylosus</i> isoladas de acordo com a susceptibilidade <i>in vitro</i> aos antimicrobianos testados	60
Tabela 17	- Frequência (em numero absoluto e percentagem) das estirpes de <i>Staphylococcus chromogenes</i> isoladas de acordo com a susceptibilidade <i>in vitro</i> aos antimicrobianos testados	62
Tabela 18	- Frequência (em numero absoluto e percentagem) das estirpes de <i>Staphylococcus pseudointermedius</i> isoladas de acordo com a susceptibilidade <i>in vitro</i> aos antimicrobianos testados	64
Tabela 19	- Frequência (em numero absoluto e percentagem) das estirpes de <i>Staphylococcus schleiferi</i> isoladas de acordo com a susceptibilidade <i>in vitro</i> aos antimicrobianos testados	66
Tabela 20	- Frequência (em numero absoluto e percentagem) de acordo com a susceptibilidade <i>in vitro</i> aos antimicrobianos testados em pele	68
Tabela 21	- Frequência (em numero absoluto e percentagem) de acordo com a susceptibilidade <i>in vitro</i> aos antimicrobianos testados em amostras de secreção otológica.....	69
Tabela 22	- Frequência (em numero absoluto e percentagem) de acordo com a susceptibilidade <i>in vitro</i> aos antimicrobianos testados em amostras de Urina	70
Tabela 23	- Frequência (em numero absoluto e percentagem) de acordo com a susceptibilidade <i>in vitro</i> aos antimicrobianos testados em amostras de tecido vulvar	72
Tabela 24	- Frequência (em numero absoluto e percentagem) de acordo com a susceptibilidade <i>in vitro</i> aos antimicrobianos testados em amostras de fragmento de bexiga	73
Tabela 25	- Frequência (em numero absoluto e percentagem) de acordo com a susceptibilidade <i>in vitro</i> aos antimicrobianos testados em amostras de fragmento torácico	74
Tabela 26	- Frequência (em numero absoluto e percentagem) de acordo com a susceptibilidade <i>in vitro</i> aos antimicrobianos testados em amostras de secreção nasal.....	76
Tabela 27	- Frequência (em numero absoluto e percentagem) de acordo com a susceptibilidade <i>in vitro</i> aos antimicrobianos testados em amostras de secreção ocular	77

Tabela 28 - Test de Kruskal Wallis para pele, urina, sec_otologica, em relação a tecido isolado e bactéria isolada.....	78
Tabela 29 - Frequência geral (em numero absoluto e percentagem) dos genes codificadores de adesinas e formador de biofilme das diferentes estirpes de Staphylococcus spp. isoladas neste estudo	79
Tabela 30 - Frequência dos genes codificadores para adesinas (em numero absoluto e percentagem), em relação á espécie (cães – gatos)	80
Tabela 31 - Frequência dos genes codificadores de adesinas e formador de biofilme detectados nas diferentes estirpes de Staphylococcus spp. Isoladas de cães e gatos	83
Tabela 32 - Frequência dos genes codificadores de adesinas e formador de biofilme em relação ao tecido que deu origem ao isolamento das diferentes estirpes de Staphylococcus spp	84

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1 -	Frequência das bactérias isoladas em relação ao tecido.....	47
Gráfico 2 -	Frequencia geral das estirpes de <i>Staphylococcus</i> spp. De acordo com a susceptibilidade <i>in vitro</i> aos antimicrobianos testados	50
Gráfico 3 -	Frequência geral das estirpes de <i>Staphylococcus</i> coagulase-positivos de acordo com a susceptibilidade <i>in vitro</i> aos antimicrobianos testados	53
Gráfico 4 -	Frequência geral das estirpes de <i>Staphylococcus</i> coagulase-negativos de acordo com a susceptibilidade <i>in vitro</i> aos antimicrobianos testados	55
Gráfico 5 -	Frequência das estirpes de <i>Staphylococcus aureus</i> .de acordo com a susceptibilidade <i>in vitro</i> aos antimicrobianos testados	58
Gráfico 6 -	Frequência das estirpes de <i>Staphylococcus epidermidis</i> . isoladas de acordo com a susceptibilidade <i>in vitro</i> aos antimicrobianos testados	60
Gráfico 7 -	Frequência das estirpes de <i>Staphylococcus xylosus</i> isoladas de acordo com a susceptibilidade <i>in vitro</i> aos antimicrobianos testados	61
Gráfico 8 -	Frequência das estirpes de <i>Staphylococcus chromogenes</i> isoladas de acordo com a susceptibilidade <i>in vitro</i> aos antimicrobianos testados	63
Gráfico 9 -	Frequência das estirpes de <i>Staphylococcus pseudointermedius</i> isoladas, de acordo com a susceptibilidade <i>in vitro</i> aos antimicrobianos testados.....	65
Gráfico 10 -	Frequência das estirpes de <i>Staphylococcus schleiferi</i> isoladas de acordo com a susceptibilidade <i>in vitro</i> aos antimicrobianos testados	66
Gráfico 11 -	Frequência de acordo com a susceptibilidade <i>in vitro</i> aos antimicrobianos testados em pele.....	68
Gráfico 12 -	Frequência de acordo com a susceptibilidade <i>in vitro</i> aos antimicrobianos testados em amostras de secreção otológica	70
Gráfico 13 -	Frequência de acordo com a susceptibilidade <i>in vitro</i> aos antimicrobianos testados em amostras de Urina	71
Gráfico 14 -	Frequência de acordo com a susceptibilidade <i>in vitro</i> aos antimicrobianos testados em amostras de tecido vulvar.....	72

Gráfico 15 -	Frequência de acordo com a susceptibilidade <i>in vitro</i> aos antimicrobianos testados em amostras de fragmento de bexig	73
Gráfico 16	Frequência de acordo com a susceptibilidade <i>in vitro</i> aos antimicrobianos testados em amostras de fragmento torácico	75
Gráfico 17 -	Frequência de acordo com a susceptibilidade <i>in vitro</i> aos antimicrobianos testados em amostras de secreção nasal.....	76
Gráfico 18 -	Frequência de acordo com a susceptibilidade <i>in vitro</i> aos antimicrobianos testados em amostras de secreção ocular.....	77
Gráfico 19 -	Frequência geral dos genes codificadores de adesinas e formador de biofilme das diferentes estirpes de <i>Staphylococcus</i> spp. isoladas neste estudo.....	79
Gráfico 20 -	Frequência (percentagem) Genes codificadores de adesinas em relação a espécie de <i>Staphylococcus</i> spp., isolada	81
Gráfico 21 -	Frequência (valores absolutos) Genes codificadores de adesinas em relação a espécie de <i>Staphylococcus</i> spp., isolada.....	82
Gráfico 22 -	Frequência (%) Genes codificadores de adesinas em relação ao tecido isolado	85
Gráfico 23 -	Frequência (Valor absoluto) Genes codificadores de adesinas em relação ao tecido isolado.....	86

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	18
2	REVISAO DE LITERATURA.....	20
2.1	Adesão Bacteriana.....	20
2.2	Adesinas.....	21
2.3	Adesinas em <i>Staphylococcus</i> spp.....	22
2.4	<i>Staphylococcus. aureus</i>	24
2.5	<i>Staphylococcus. pseudointermedius</i>	27
2.6	<i>Staphylococcus. epidermidis</i>	32
3	OBJETIVOS	34
4	MATERIAIS E MÉTODOS.....	35
4.1	Obtenção do material de estudo	35
4.2	Identificação e verificação de colônias de <i>Staphylococcus</i> spp.....	35
4.3	Avaliação da susceptibilidade in vitro das estirpes de <i>Staphylococcus</i> spp. isoladas frente a diversos antimicrobianos.....	36
4.4	Pesquisa de genes codificadores de adesinas e biofilme utilizando a reação em cadeia da polimerase (PCR)	37
4.5	Extração do DNA bacteriano.....	38
4.6	Reação em cadeia da polimerase e detecção do produto amplificado	39
5	RESULTADOS	41
5.1	Identificação e caracterização do grupo de estudo.....	41
5.2	Isolamento e identificação dos <i>staphylococcus</i> spp. presentes em diversas amostras clinicas	44
5.3	Avaliação da susceptibilidade in vitro das estirpes de <i>staphylococcus</i> spp. isoladas, frente a diferentes antimicrobianos.....	49
5.4	Avaliação da susceptibilidade in vitro frente a diferentes antimicrobianos em relação a todas as estirpes de <i>staphylococcus</i> spp. identificadas.....	57
5.5	Avaliação da susceptibilidade in vitro aos antimicrobianos testados em relação ao tecido.....	67
5.6	Pesquisa de genes codificadores de adesinas e biofilme em estirpes de <i>staphylococcus</i> spp. isoladas em amostras clinicas de cães e gatos.	79
6	DISCUSSÃO.....	87

6.1	Frequencia de ocorrencia dos patógenos	87
6.2	Avaliacao da susceptibilidade in vitro das estirpes de staphylococcus spp., isoladas frente a diferentes antimicrobianos.....	90
6.3	Avaliacao da susceptibilidade in vitro frente a diferentes antimicrobianos em relacao a todas as estirpes de staphylococcus spp. identificadas.....	95
6.4	Avaliacao da susceptibilidade in vitro aos antimicrobianos testados em relacao ao tecido.....	101
6.5	Pesquisa de genes codificadores de adesinas e biofilme em estirpes de staphylococcus spp. isoladas em amostras clinicas de caes e gatos.	103
7	CONCLUSOES.....	108
	REFERENCIAS	110

1 INTRODUÇÃO

O esclarecimento dos fatores envolvidos na patogênese das doenças infecciosas causadas por *Staphylococcus* spp., na apresentação de problemas dermatológicos, urinários e complicações como infecções em órgãos internos (endocardite, pneumonia) são pouco entendidas nos animais de companhia. Dentre estes fatores devem ser considerados os elementos intrínsecos das bactérias patogênicas envolvidas no desenvolvimento na apresentação de quadros clínicos complexos.

O resultado insatisfatório na resolução destes problemas na clínica de pequenos animais, faz que o estudo nesta área seja fundamental, pois permite melhor orientação de medidas de controle e tratamento, como a geração de vacinas e medicamentos.

São escassos os dados na literatura acerca da frequência de genes codificadores de adesinas e formador de biofilme, nas espécies de *Staphylococcus* spp., isoladas de cães e gatos. Não existem estudos no Brasil pesquisando a presença destes genes em pequenos animais, sendo necessários estudos que elucidem a presença das adesinas nestas espécies, e sua atuação como fatores de virulência.

Além disto, torna-se importante mensurar a ocorrência das diferentes espécies de *Staphylococcus* spp., em cães e gatos, e a susceptibilidade aos diversos antimicrobianos, já que na atualidade é amplamente aceitado que o uso inadequado e indiscriminado de antibióticos em Medicina Veterinária, pode ter um impacto negativo na saúde pública. Sendo isto importantíssimo na área de pequenos animais devido ao estreito convívio do homem com estas espécies, e o risco potencial de que desses animais possam atuar como fonte de infecção para os seres humanos.

Este trabalho pretende contribuir pesquisando a presença de genes codificadores de adesinas e formador de biofilme em *Staphylococcus* spp., de colônias identificadas em amostras clínicas isoladas de cães e gatos. Tem-se como

anteriores no Brasil dois estudos nos quais foi evidenciada a presença destes genes em amostras isoladas de mastite bovina e caprina (ZUNIGA, 2012; SALABERRY, 2014), representando estas pesquisas um importante ponto de partida.

O presente estudo tem a intenção de ampliar o conhecimento no tocante as características genotípicas, principalmente no que se refere à pesquisa dos genes codificadores de adesinas e formador de biofilme, em isolados de *Staphylococcus* spp., obtidos de amostras clínicas de cães e gatos.

2 REVISAO DE LITERATURA

2.1 Adesão Bacteriana

Os micróbios são ubíquos no ambiente, incluindo a pele, as membranas mucosas, e o trato gastrointestinal dos animais. O sucesso ecológico dos microrganismos é extensamente atribuível à sua capacidade de sobreviver em condições hostis e se adaptar às mudanças no ambiente (CLARKE, 2006).

Durante o curso da evolução as bactérias desenvolveram maneiras de colonizar os hospedeiros de forma eficiente evadindo os mecanismos de defesa, interferindo com a atividade celular e destruindo os tecidos causando uma doença (JOH et al., 1999).

Sem embargo a patogenicidade de um microrganismo depende dos fatores do hospedeiro como status imune, presença de traumas, feridas, e como foram mencionados acima, os fatores relativos à bactéria, como a apresentação de fatores de virulência, a produção de toxinas, enzimas, ou a capacidade de adesão e formação de biofilmes.

Durante o curso da infecção, os microrganismos têm que se regular frente às alterações ambientais, e apresentar o seu repertório de mecanismos de virulência de forma rápida e coordenada, para conseguir a colonização dos tecidos do hospedeiro (FISCHETI; NOVICK; FERRETI, 2006).

O processo de infecção microbiana envolve uma sequencia complexa de eventos, que podem provocar o mau funcionamento, ou a destruição do tecido do hospedeiro. A adesão dos microrganismos aos tecidos do hospedeiro representa um primeiro passo nesta serie de fenômenos; portanto a superfície de um hospedeiro fornece um ambiente ideal para a adesão, colonização e crescimento bacteriano (SEO et al., 2008). Esta capacidade de se aderir a uma ampla variedade de superfícies vivas ou inertes (dispositivos médicos), é uma característica fundamental, que pode promover a sobrevivência dos microrganismos, é pode ser um fator de

virulência imprescindível na invasão bacteriana (GERLACH; HENSEL, 2007; SEO et al., 2008).

Na maioria dos casos as bactérias que não possuem a capacidade de adesão podem ser facilmente eliminadas do organismo pelos mecanismos fisiológicos de limpeza e excreção (JOH et al., 1999).

A adesão é definida, como a capacidade de fixação dos microrganismos e parasitas às células dos hospedeiros. Sendo esta um passo crucial na patogênese de muitas bactérias, parasitas e vírus, sendo constantemente um pré-requisito para que a colonização do epitélio seja bem sucedida (HARTMUT; NIEMANN; HEINZ, 2004; MCEWAN; KALNA; MELLOR, 2005).

O conceito de adesão bacteriana às células do hospedeiro foi apreciado pela primeira vez em 1908, quando foi relatado que a *Eschericia coli*, tinha a capacidade de se fixar a células animais por meio de apêndices, que depois foram chamados de pilus.

A caracterização continuada destas estruturas e sua função, bem como a descoberta das adesinas e seus papéis no tropismo tecidual, preparou um vasto campo de estudo em torno dos mecanismos de adesão das bactérias aos hospedeiros e da resposta do hospedeiro para essa interação (KLINE et al., 2009).

2.2 Adesinas

As adesinas são proteínas especializadas na ancoragem bacteriana à matriz extracelular (ECM), proteínas plasmáticas, células epiteliais, endoteliais e componentes plasmáticos da superfície celular do hospedeiro (ZECCONI; SCALI, 2013). Estas proteínas reconhecem especificamente os receptores na superfície das células alvo do hospedeiro, isto determina o tropismo da bactéria no tecido do hospedeiro, o envolvimento destas proteínas na patogenia ainda é pouco esclarecido (HARTMUT; NIEMANN; HEINZ., 2004; SIMPSON et al., 2004). Acredita-se que estas proteínas conferem virulência para as bactérias permitindo-lhes fixar-se

a superfícies epiteliais. As proteínas produzidas durante o processo de cicatrização de feridas fornecem também uma matriz para a fixação de bactérias (CLUTTERBUCK et al., 2007).

Estas adesinas estão agrupadas em uma família denominadas *microbial surface components recognizing adhesive matrix molecules* (MSCRAMMs) (FOSTER; HÖÖK, 1998; ARCIOLA et al., 2005; HAUCK; OHLSEN, 2006). A produção destas é controlada geneticamente (MCEWAN; KALNA; MELLOR, 2005).

Uma abordagem pratica para a detecção dos genes codificadores de adesinas em *Staphylococcus* é usando a reação em cadeia da polimerase (PCR) (TRISTAN et al., 2003); VANCRAEYNEST; HERMANS; HAESBROUCK, 2004).

2.3 Adesinas em *Staphylococcus* spp

Staphylococcus são bactérias Gram-positivas anaeróbias facultativas do gênero *Staphylococcus*, família *Staphylococcaceae*, que atualmente inclui 41 espécies, mesmo que sua classificação esteja em constante evolução (VANNI et al., 2009).

Staphylococcus spp. São microrganismos reconhecidos na flora comensal da pele, glândulas da pele e membranas mucosas de seres humanos e animais (VENGUST et al., 2006). Os *Staphylococcus* coagulase positivos (SCP), são frequentemente agentes oportunistas que causam doença em pacientes com condições predisponentes, como doenças imunológicas e infecções de feridas (CHANCHATHONG; PRAPASARAKUL, 2011).

Estas bactérias podem ser facilmente isoladas a partir do ambiente, e o ar. O primeiro passo da infecção por *Staphylococcus* é a união a superfícies de diversos materiais, incluindo os dispositivos médicos e os tecidos do hospedeiro (SEO et al., 2008). Estas reações são atribuídas a uma combinação de fatores extracelulares e propriedades tais como a adesão, e a formação de um biofilme.

A produção de exotoxinas, proteínas de superfície, e a formação de complexos multicelulares altamente organizadas por bactérias, conhecidas como biofilmes, são cada vez mais aceitas como fatores de virulência relevantes na infecção por *Staphylococcus* spp., (CUCARELLA et al., 2004).

Os biofilmes são descritos como uma comunidade estruturada de células bacterianas fechadas em uma matriz polimérica autoproduzida e aderidas a uma superfície inerte ou viva. No interior desta matriz as bactérias são imobilizadas em estreita proximidade, como tal, são dependentes umas das outras compartilhando o substrato, e os nutrientes dentro do biofilme. Os biofilmes são responsáveis por uma grande variedade de infecções humanas, incluindo otite média, osteomielite, endocardite, pneumonia e fibrose cística. A antibioticoterapia muitas vezes não consegue erradicar biofilmes, consequentemente infecções podem persistir por anos com sintomas recorrentes. Uma vez que um biofilme se estabeleceu o tratamento com concentrações tradicionais de antimicrobianos não são efetivos (CLUTTERBUCK et al., 2007). A formação do biofilme protege o microrganismo da opsonofagocitose, e da ação dos agentes antimicrobianos, levando a infecções crônicas e sepses (VANCRAEYNEST; HERMANS; HAESEBROUCK, 2004).

As adesinas de *Staphylococcus* spp., são cruciais para interagir com as proteínas da superfície celular de células, tais como o colagénio, o fibrinogénio, fibronectina, elastina e laminina. Estes componentes da superfície bacteriana geralmente estão covalentemente ligados ao peptidoglicano da parede celular, e reconhecem colágeno (proteína ligadora de colágeno), fibronectina (proteína ligadora de fibronectina), fibrinogénio (proteína ligadora de fibrinogénio), elastina (proteína ligadora de elastina) e laminina (proteína ligadora de laminina) (FOSTER; HÖÖK, 1998).

Estas adesinas estão presentes na parede celular bacteriana, e tem a capacidade de causar um processo inflamatório no hospedeiro (CLUTTERBUCK et al., 2007). No momento em que a bactéria consegue a adesão e multiplicação, superando os mecanismos de defesa do organismo, ocorre o aumento na população e colonização bacteriana, intensificando o processo de invasão dos tecidos, geralmente resultando em processos supurativos, ou a formação de abscessos,

sendo comuns estas condições em infecções por *Staphylococcus* spp., (FISCHETTI; NOVICK; FERRETI, 2006).

Dentre os *Staphylococcus*, existe uma variedade de agentes oportunistas que representam um crescente interesse na Medicina Veterinária e Humana. Em cães, no gênero *Staphylococcus* os dois membros mais patogênicos são: os *Staphylococcus coagulase* positivos (SCP), principalmente *Staphylococcus* do grupo *intermedius*, particularmente *Staphylococcus pseudointermedius*, e o *Staphylococcus aureus*. Uma propriedade notável deste gênero é a capacidade de tornarem-se resistentes aos antimicrobianos (HANSELMAN; KRUTH; WEESE, 2008; WEESE; VAN DUIJKEREN, 2010; WEDLEY et al., 2014). Recentemente, existe preocupação em relação aos *Staphylococcus* resistentes, devido a que o contato com animais de estimação pode servir como uma fonte de infecção para as pessoas (CLARKE, 2006).

Contudo os *Staphylococcus coagulase* negativos (CoNS), principalmente o *S. epidermidis*, que antigamente foi considerado como não patogênico, na atualidade é implicado como uma das espécies patogênicas emergentes mais relevantes em animais de estimação (MAY; KINYON; NOXON, 2012).

2.4 *Staphylococcus aureus*

O *S. aureus*, é um patógeno fascinante, cuja versatilidade em termos de capacidade de causar infecções em diversos hospedeiros, torna ele em uma ameaça grave para a saúde animal, segurança alimentar, saúde humana, e consequentemente para a saúde pública (PETON; LE LOIR, 2014). Nas últimas décadas o *S. aureus* adquiriu uma importância dramática na medicina humana por várias razões, uma delas representada pela alta prevalência de estirpes resistentes aos antibióticos (ZECCONI; SCALI, 2013).

Descreve-se a resistência, como a capacidade adquirida de uma bactéria para sobreviver na presença de concentrações de uma substância química que

normalmente seria letal para estes microrganismos (CLUTTERBUCK et al., 2007). Isto pode levar à emergência de novas estirpes capazes de causar surtos de infecção tanto em animais, quanto em humanos (MANGIERI JUNIOR, 2010). A resistência aos antibióticos hoje está na vanguarda das preocupações globais em saúde pública (EPSTEIN et al., 2009). Nos últimos anos, esta preocupação tem aumentado, principalmente em relação ao uso das Fluoroquinolonas, Cefalosporinas de terceira geração e antibióticos Beta-lactâmicos (THOMPSON et al., 2011).

A resistência às penicilinas tem sido denominada resistência à meticilina, desta forma a denominação MRSA (*Methicillin Resistant Staphylococcus aureus*) é normalmente utilizada, não obstante a meticilina não seja mais o antibiótico de escolha para tratamento ou teste de suscetibilidade. Os antibióticos como a oxacilina e a cefoxitina podem ser empregados como referência para caracterizar a resistência à meticilina.

Os *Staphylococcus aureus* resistentes à meticilina ou MRSA, são bactérias que apresentam resistência a todos os antibióticos beta lactâmicos. As primeiras linhagens dessas cepas foram descritas na Inglaterra em 1961, depois de que a meticilina tornou-se disponível para o uso clínico. Nos Estados Unidos, o primeiro informe de infecção por essa espécie foi efetuado em 1968, posteriormente a proporção de MRSA de origem hospitalar apresentou aumento de 2%, em 1974, e de 50% em 1997 em humanos (FERREIRA et al., 2009).

É importante mencionar que os *Staphylococcus* resistentes à meticilina também apresentam, com frequência, resistência múltipla a várias classes de agentes antimicrobianos, incluindo aminoglicosídeos, clindamicina, macrolídeos, fenicóis, quinolonas, sulfonamidas e tetraciclina (NCCLS, 2003).

Os reportes de *S. aureus* resistente a Meticilina (MRSA), tornaram-se mais habituais nos últimos anos. Na metade da década dos anos 1990s, tornou-se um grande problema em todo o mundo. O isolamento em animais de MRSA foi praticado em 1972 após a sua detecção em leite proveniente de Bovinos com mastite. Relatórios ocasionais têm sido publicados devido à infecção em animais domésticos pelo MRSA, incluindo cães, gatos, gado, ovelhas, galinhas, coelhos e cavalos. Em anos recentes o numero de casos parece estar em aumento (O'MAHONY et al., 2005). Cada vez são mais comuns os reportes de MRSA em cães, gatos, hospitais

veterinários e a comunidade (HANSELMAN; KRUTH; WEESE, 2008). Pode estar relacionado à disseminação na comunidade do MRSA, com a identificação deste agente em animais de estimação. O surgimento de MRSA em animais domésticos é motivo de preocupação em termos de saúde animal, pelo risco de que os animais possam atuar como fonte de infecção ou colonização do MRSA (CLARKE, 2006; WEESE et al., 2006; WEESE; VAN DUIJKEREN, 2010).

Na Medicina Veterinária de pequenos animais poucos são os estudos que tem abordado o surgimento de resistência bacteriana, assim como o impacto gerado por esta, os mecanismos de transmissão de resistência, a relação entre o uso de agentes antibacterianos com o desenvolvimento da mesma, e o seguimento da avaliação de mecanismos de controle (WEESE et al., 2006; UMBER; BENDER, 2009). O *S. aureus*, causa uma grande variedade de doenças variando desde infecções cutâneas superficiais leves, ate infecções complicadas com risco de vida como septicemia, endocardite e pneumonia. Atualmente é um dos principais patógenos hospitalares em hospitais em todo o mundo (HAUCK; OHLSEN, 2006; UMBER; BENDER, 2009). Nos Estados unidos *S. aureus* é uma das principais causas de morte, de fato esta envolvido em 18.000 decessos por ano, aproximadamente 290.000 hospitalizações, e cerca de 12 milhões de visitas medicas e tratamentos. Em medicina veterinária a severidade das doenças é mais leve comparada com a medicina humana, mas diversas patologias foram descritas em animais de estimação e animais de fazenda (ZECCONI; SCALI, 2013).

Como foi dito anteriormente a fixação inicial de certos tipos de bactéria, incluindo o *S. aureus*, a proteínas de matriz extracelular (ECM) em tecidos, é mediada por adesinas agrupadas em uma família conhecida como *microbial surface components recognizing adhesive matrix molecules* (MSCRAMMs), que estão covalentemente ancoradas na parede celular bacteriana (SIMPSON et al., 2004; VANCRAEYNEST; HERMANS; HAESBROUCK, 2004), e permitem a adesão bacteriana em tecidos normais e inflamados (CASTAGLIUOLO et al., 2006). O potencial virulento do *S. aureus* é atribuído a estes fatores extracelulares, e propriedades invasivas que são controladas ao nível genético (KUMAR et al., 2010). A expressão destes genes é controlada por uma rede complexa de regulamentação (HAUCK; OHLSEN, 2006).

Diversos estudos tem identificado para o *S. aureus*, duas proteínas de ligação de fibronectina (*FnbA* e *FnbB*), três proteínas de ligação de fibrinogénio (*ClfA*, *ClfB* e *Fib*), proteína ligadora de colágeno (*cna*), a proteína de ligação a elastina (*EbpS*), e a proteína de ligação sialoproteína óssea (*Bbp*); (FOSTER; HÖÖK, 1998; TRISTAN et al., 2003; ARCIOLA et al., 2005; ZECCONI; SCALI, 2013).

Kouidhi et al. (2010), pesquiso a ocorrência das adesinas *FnbA*, *FnbB*, *ClfA*, *ClfB* e *Cna* em crianças que apresentavam caries dental. Além das adesinas identificadas por estes pesquisadores, (VANCRAEYNEST; HERMANS; HAESBROUCK, 2004), determinou a presença em cepas de *S. aureus* de coelho os genes codificadores para as adesinas *Fib* e *Eno*.

Em bovinos tem se constatado a presença dos genes responsáveis da expressão das adesinas *EbpS*, *Eno*, *FnbA*, *FnbB*, *Cna*, *Bbp* e *Fib* em animais com Mastite (KUMAR et al., 2010). Por outro lado, Seo et al. (2008). Num estudo feito na Coreia constataram a existência das mesmas adesinas em cepas de *Staphylococcus* spp., isoladas de cães, porcos e o ambiente.

Em *S. aureus* diferentes adesinas pertencentes a família das MSCRAMM muitas vezes coexistem com outros componentes de superfície cruciais, tais como proteína associada à formação de biofilme (*bap*) (ARCIOLA et al., 2005). As cepas que contem o gene *bap* (biofilm associated protein) são fortes produtores de biofilme (VANCRAEYNEST; HERMANS; HAESBROUCK, 2004). A matriz do biofilme confere propriedades anti-fagocíticas para as bactérias dentro do biofilme, isso significa que as células fagocíticas que são a primeira linha de defesa do organismo não podem atuar nestes casos, levando a infecções crônicas e alta resistência a antimicrobianos (CLUTTERBUCK et al., 2007).

2.5 *Staphylococcus pseudointermedius*

O *Staphylococcus. intermedius* foi descrito pela primeira vez em 1976 por Hajek's, desde esse momento tem se encontrado colonizando a pele, pelo, o conduto auditivo, e as regiões muco cutâneas de cães, gatos, cavalos, gambás,

doninhas, guaxinins, ursos, martas, camelos e pombos (FUTAGAWA-SAITO; BATHEN; FUKUYASU, 2007; FITZGERALD, 2009).

Durante os últimos anos houve ambiguidade sobre a sua classificação. No ano 2005, isolados anteriormente nomeados como *S. intermedius* devido as suas características fenotípicas, foram reclassificados baseados em técnicas moleculares. Seguindo isto os isolados pertencentes ao grupo dos *S. intermedius* foram divididos em três: *S. intermedius*, *S. pseudointermedius*, *S. delphini*.

Na atualidade, foi proposto reportar todas as estirpes pertencentes ao grupo *S. intermedius* em cães, como *S. pseudointermedius*, ate que novas investigações genômicas provem que a estirpe pertence à outra espécie (ROTA et al., 2011; VAN DUIJKEREN et al., 2011; BANNOEHR; GUARDABASSI, 2012; CAIN, 2013; MOODLEY; DAMBORG; NIELSEN, 2014).

Consequentemente neste trabalho, será usado o termo *S. pseudointermedius* para todas as referencias bibliográficas, incluindo aquelas feitas antes da reclassificação das espécies, assim como para os isolados pertencentes a este grupo nesta pesquisa.

O *S. pseudointermedius*, é o *Staphylococcus* coagulase positivo isolado com maior frequência em cães saudáveis e doentes. *S. pseudointermedius* é o agente predominante em cães com infecção cutânea (GEOGHEGAN et al., 2009; KAWAKAMI et al., 2010; ROTA et al., 2011; CAIN, 2013). É uma causa importante de doença ocular, otite externa, cistite, infecção respiratória e infecções em feridas; (HAUSCHILD; WÓJCIK, 2007; VANNI et al., 2009; NIENHOFF et al., 2011; RUBIN; CHIRINO-TREJO, 2011; WEDLEY et al., 2014).

Semelhante à colonização pelo *S. aureus* em humanos, os cães saudáveis comumente albergam o *S. pseudointermedius* como parte de sua microbiota habitual (HARTMANN et al., 2005). O *S. pseudointermedius* pode ser isolado em ate o 68% dos cães sadios (RUBIN; CHIRINO-TREJO, 2011).

O *S. pseudointermedius* é o agente mais associado à piodermite canina, condição da pele que normalmente resulta de um distúrbio primário subjacente como ectoparasitismo, atopia, desequilíbrios hormonais, ou dermatite imuno mediada. Além disso, o *S. pseudointermedius* é muitas vezes responsável pelo

desenvolvimento de processos piogênicos, afetando a conjuntiva, articulações, trato urinário e ouvido externo em cães (VANNI et al., 2009).

Este agente é uma das principais causas de infecções pós-operatórias em cães e gatos, e tem potencial zoonótico (FUTAGAWA-SAITO; BA-THEIN; FUKUYASU, 2007; FITZGERALD, 2009; PERRETEEN et al., 2010; BANNOEHR; GUARDABASSI, 2012). Uma rota comum de invasão e infecção pelo *S. pseudointermedius*, em humanos é decorrente de lesões e feridas feitas por mordedura de cães (GUARDABASSI; LOEBER; JACOBSON, 2004; FITZGERALD, 2009; FRANK et al., 2009).

As recentes mudanças na taxonomia, e a emergência de cepas resistentes a meticilina, têm renovado o interesse da comunidade científica no *S. pseudointermedius*, obtendo novas descobertas sobre a ecologia, epidemiologia, estrutura populacional e virulência desta espécie (BANNOEHR; GUARDABASSI, 2012).

O *S. pseudointermedius* Resistente a Meticilina (MRSP), surgiu recentemente como um importante agente patógeno em animais de estimação (FITZGERALD, 2009; VAN DUIJKEREN et al., 2011). A primeira cepa isolada do MRSP em cães foi reportada na França na metade dos anos 1980s, em cães saudáveis e animais que apresentavam pioderma (MOODLEY; DAMBORG; NIELSEN, 2014). Num centro diagnostico veterinário na Holanda o numero de MRSP, isolados encontrados em amostras clinicas de cães e gatos aumento desde um (1) caso em 2004 a 76 em 2009. Muitas das infecções causadas pelo MRSP são cirúrgicas e infecções em feridas, mas uma variedade de outras infecções, como piodermite, otite externa, e infecções do trato urinário também estão associados com o MRSP (VAN DUIJKEREN et al., 2011; CAIN, 2013).

A transmissão de MRSP entre seres humanos e animais numa instituição veterinária já foi reportado, contudo as informações sobre a transmissão entre espécies e a contaminação do meio ambiente com o MRSP é escassa (SASAKI et al., 2007; VAN DUIJKEREN et al., 2011). Não obstante a comparação das cepas de *S. pseudointermedius*, provenientes de 13 cães com pioderma profunda e seus donos, revelaram que os humanos carregavam frequentemente as mesmas estirpes que seus animais de estimação (FITZGERALD, 2009).

Tem sido motivo de preocupação a crescente propagação mundial de cepas de *S. pseudointermedius* resistentes a praticamente todos os agentes antimicrobianos disponíveis em medicina veterinária (MRSP) (GUARDABASSI; LOEBER; JACOBSON, 2004). A manutenção da eficácia dos antibióticos tornou-se um desafio global para a saúde pública, e existem recomendações para a utilização prudente destes agentes na saúde animal (KROEMER et al., 2014).

O uso de produtos farmacêuticos em animais de companhia representa 24% das vendas de saúde animal na União Europeia, o 41% desta percentagem são antimicrobianos. O pioderma canino geralmente é associado ao *S. pseudointermedius*, esta é uma das principais indicações para o tratamento com antimicrobianos em cães. Tratamentos prolongados são muitas vezes requeridos incluindo o uso de antimicrobianos importantes na medicina humana como as cefalosporinas (GUARDABASSI; LOEBER; JACOBSON, 2004).

Enquanto o problema da resistência aos antibióticos está aumentando com uma velocidade dramática em humanos e animais, medidas efetivas para o controle das infecções causadas pelo *S. pseudointermedius* são urgentes. O desenvolvimento de tais medidas requer um profundo conhecimento dos fatores bacterianos e do hospedeiro envolvidos na patogênese da infecção em animais de estimação por esta agente (BANNOEHR; GUARDABASSI, 2012).

O *S. pseudointermedius*, possui diversos fatores de virulência, incluindo alguns que estão intimamente relacionados aos fatores de virulência do *S. aureus* (VAN DUIJKEREN et al., 2011). O *S. pseudointermedius* expressa proteínas de superfície que se assemelham às proteínas apresentadas pelo *S. aureus*. O *S. pseudointermedius* tem a capacidade de se ligar a componentes de matriz extracelular (ECM) tais como o fibrinogénio, fibronectina e citoqueratina (BANNOEHR et al., 2011). Indicando a presença de adesinas de superfície como as pertencentes à família das *microbial surface components recognizing adhesive matrix molecules* (MSCRAMMs) (FITZGERALD, 2009; BANNOEHR et al., 2011). Fato pelo qual poderia se explicar a capacidade de adesão que apresenta o *S. pseudointermedius* aos corneócitos da pele dos cães (FITZGERALD, 2009; VAN DUIJKEREN et al., 2011).

Segundo Geoghegan et al. (2009). O *S. pseudointermedius* adere-se com mais acerto aos corneócitos de cães com dermatite atópica quando estes são colhidos de uma área da pele com inflamação, do que os corneócitos de animais saudáveis, ou de regiões da pele não inflamadas. Isto pode ser devido a diferentes respostas imunes às quais poderiam mudar a expressão das adesinas de superfície a níveis mais elevados. Entretanto somente uma limitada quantidade de informação se encontra atualmente disponível sobre o papel das condições específicas do hospedeiro na infecção pelo *S. pseudointermedius*.

Algumas estirpes do *S. pseudointermedius* tem a capacidade de formar biofilmes tal como o *S. aureus* (FITZGERALD, 2009; VAN DUIJKEREN et al., 2011).

O mecanismo exato pelo qual o *S. pseudointermedius* se adere aos corneócitos em cães, é desconhecido atualmente (BANNOEHR et al., 2011). Mas acreditasse que diversas bactérias patogênicas expressem em sua superfície componentes que permitam sua adesão a matriz extracelular e tecidos do hospedeiro (BORDT, 2013).

Como foi referido acima, cepas de *S. pseudointermedius* isolado de cães com piodermite, acrescentou à adesão as proteínas de matriz extracelular (ECM), em comparação com cepas de *S. pseudointermedius* isoladas de cães saudáveis (MCEWAN; KALNA; MELLOR, 2005). Diante deste cenário e dado a semelhança entre o *S. pseudointermedius* e o *S. aureus*, e o fato da capacidade de adesão de ambos as células escamosas dos seus hospedeiros, e a eficácia do *S. pseudointermedius* em infectar a pele inflamada na dermatite atópica, é razoável esperar que o *S. pseudointermedius* apresente um repertório de proteínas de superfície semelhante às apresentadas pelo *S. aureus* (GEOGHEGAN et al., 2009). Devido a isto é fundamental determinar o rol das adesinas como fatores de virulência na infecção pelo *S. pseudointermedius*, e pesquisar a ocorrência dos genes codificadores de adesinas e formador de biofilme em cães e gatos.

2.6 *Staphylococcus epidermidis*

Os estafilococos coagulase-negativos (ECN) foram considerados inicialmente microrganismos saprófitos e ocasionalmente patogênicos. Sem embargo, na atualidade, são reconhecidos como agentes patogênicos de uma variedade de processos infecciosos, sendo isolados com relativa frequência em amostras clínicas em animais e humanos. A importância dos ECN relacionados com a mastite bovina tem aumentado nos últimos anos, representando principalmente perdas econômicas (THORBERG et al., 2006; NUNES et al., 2007; SOARES et al., 2008). Os ECN estão também associados a infecções do conduto auditivo de cães, apesar de fazer parte da microbiota normal (SOARES et al., 2008).

As infecções nosocomiais representam um problema crescente na medicina moderna. São de grande importância às infecções respiratórias, infecções de feridas, e especialmente infecções que ocorrem após a implantação permanente ou intermitente de dispositivos médicos. Neste contexto um dos patógenos isolados mais importantes é o *S. epidermidis* (VUONG; OTTO, 2002; ZIEBUHR et al., 2006; ROHDE et al., 2010; SCHOENFELDER et al., 2010). Não obstante o seu potencial zoonótico, e sua importância na medicina veterinária ainda é incerto (VENGUST et al., 2006).

O *S. epidermidis*, não produz uma variedade tão grande de toxinas e exoenzimas quanto o *S. aureus*. Ainda não foi determinado detalhadamente o papel das toxinas do *S. epidermidis* como fatores de virulência. Geralmente o sucesso deste agente em causar infecções deve ser atribuído a sua habilidade de se aderir a superfícies e permanecer lá, sob a cobertura de um material extracelular (VUONG; OTTO, 2002).

Como sabemos, é uma tendência natural De alguns microrganismos incluindo o *S. epidermidis*, fixarem-se em superfícies inertes ou vivas, para posteriormente multiplicar-se e inserir-se em uma matriz viscosa composta de substâncias poliméricas extracelulares, autoproduzidas, formando um biofilme (SIMÕES; SIMÕES; VIEIRA, 2010). Como já foram citados neste trabalho, os biofilmes são definidos como uma comunidade bacteriana agregada, incrustada em uma matriz

polimérica hidratada auto sintetizada (ROHDE et al., 2010). Devido a sua capacidade de formar biofilmes e causar diversas infecções nosocomiais de fundamental importância em humanos, é importante estudar este agente e determinar o possível envolvimento das adesinas e os biofilmes como fatores de virulência imprescindíveis na patogênese do *S. epidermidis*, em Medicina Veterinária.

3 OBJETIVOS

- Pesquisar a presença de genes codificadores de adesinas e formador de biofilme em amostras clínicas de cães e gatos, em estirpes de *Staphylococcus* spp, das seguintes adesinas: proteína ligadora de colágeno (*cna*), proteína ligadora de laminina (*eno*), proteína ligadora de elastina (*ebpS*), proteína ligadora de fibrinogênio (*fib*), Proteína A ligadora de fibronectina (*fnbA*), proteína B ligadora de fibronectina (*fnbB*), e proteína associada a formação de biofilme (*bap*).
- Avaliar a susceptibilidade “*in vitro*” das espécies de *Staphylococcus* spp isoladas frente aos antimicrobianos.
- Realizar um análise de estatística descritiva e comparativa da presença de genes codificadores de adesinas em relação aos resultados reportados no antibiograma.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

O trabalho de laboratório foi realizado no Laboratório de Doenças Infecciosas (Bacteriologia e Micologia), no Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Animal da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo.

4.1 Obtenção do material de estudo

Foram estudadas 118 amostras de cães e gatos para identificação do agente infeccioso no Laboratório de Bacteriologia e Micologia – FMVZ/USP.

Os espécimes clínicos de animais com infecções são processados como parte da rotina e fazem parte do serviço diagnóstico do Laboratório de Bacteriologia e Micologia- FMVZ/USP.

4.2 Identificação e verificação de colônias de *Staphylococcus* spp.

As 118 amostras utilizadas neste projeto foram recebidas no laboratório de Bacteriologia e Micologia FMVZ/USP para diagnóstico de cães e gatos com diversos processos infecciosos, que apresentavam manifestações clínicas, sendo as infecções mais comuns reportadas em pele, ouvido, e trato urinário entre outras. As amostras foram recebidas a partir do mês de junho de 2013 até o mês de março de 2014. Não foi obtida informação das amostras recebidas em quanto a tratamentos prévios com antimicrobianos.

Foram selecionadas para este projeto, amostras que apresentaram cepas com crescimento puro de bactérias do gênero *Staphylococcus* spp., Os crescimentos bacterianos não identificados como *Staphylococcus* spp., foram descartados, e não fizeram parte deste estudo.

Conforme as amostras chegaram ao laboratório, foram semeadas em tubos de ensaio contendo caldo de Infusão de Cérebro e Coração (BHI) (Merck), para enriquecimento primário, e então semeadas diretamente com um swab, na superfície de placas de Petri contendo ágar sangue ovino a 5%, sendo este um meio rico e não seletivo diferencial para a hemólise, nele crescem a maioria dos Gram negativos e Gram positivos, além de fungos filamentosos (bolors) e leveduras, e em Agar MacConkey, o qual é utilizado para Isolar bacilos Gram negativos (enterobactérias e não fermentadores) e verificar a fermentação ou não da lactose. Após a semeadura as placas foram incubadas em estufa por 72 horas a 37°C, sendo realizada a leitura das placas as 24, 48 e 72 horas de incubação. As bactérias isoladas foram identificadas de acordo com características macroscópica (verificação e morfologia da colônia) e microscópicas (esfregaços corados pelo método Gram). Analisou-se a presença de colônias hemolíticas que apresentassem coloração branco - acinzentada ou amarelo-ouro. As bactérias que se revelaram como cocos Gram-positivos foram submetidos à prova de catalase. Posteriormente realizaram-se provas bioquímicas conforme descrito por Murray et al. (1999), como prova da coagulase lenta em plasma de coelho, urease, produção de acetoina em caldo VP ("VogesProskauer"), lactose, trealose, maltose, sacarose, manitol. Nos casos em que houve necessidade, foi utilizado o sistema *RapID Staph* (Thermo Fisher Scientific®) para confirmação das espécies de *Staphylococcus* spp.

4.3 Avaliação da susceptibilidade in vitro das estirpes de *Staphylococcus* spp. isoladas frente a diversos antimicrobianos

Os testes de sensibilidade são indicados para qualquer organismo responsável por um processo infeccioso que exija terapia antimicrobiana, quando é impossível prever a sensibilidade desse organismo, mesmo conhecendo a sua identificação. Os testes de sensibilidade são indicados, com maior frequência, quando se acredita que o organismo causador pertence a uma espécie capaz de apresentar resistência aos agentes antimicrobianos normalmente usados (NCCLS, 2003; PAPICH, 2013). Entretanto, o comportamento da linhagem isolada frente ao

tratamento imposto pode ser diferente, pois a amostra foi testada “*in vitro*” e não “*in vivo*”.

Os testes de susceptibilidade *in vitro* das amostras isoladas de *Staphylococcus* spp. foram realizados frente a diversos antimicrobianos, a saber: amoxicilina-ac clavulanico (10µg), azitromizina (15µg), cefadroxil, cefalexina (30µg), ceftiofur (30µg), cefovecin, ciprofloxacina (5µg), ceftriaxona (30µg), clindamicina (2µg), cloranfenicol (30µg), doxiciclina (30µg), enrofloxacin (5µg), eritromicina (15µg), gentamicina (10µg), neomicina (30µg), marbofloxacina (5µg), nitrofurantoina (300µg), ofloxacina (5µg), norfloxacina (10µg), oxacilina (1µg), sulfametoxazol+trimetropin (25µg), tetraciclina (30µg), tobramicina (10µg), rifampicina(30µg), levofloxacina (5µg), moxifloxacina (5µg).

Os testes foram realizados em meio de Muller Hinton, empregando-se o método de disco difusão, segundo técnica de Bauer et al. (1996). Suas interpretações foram realizadas pela medida do diâmetro do halo de inibição do crescimento do microrganismo. As concentrações, bem como o critério de interpretação, foram os sugeridos pela “*Clinical and Laboratory Standards Institute*” (2008).

4.4 Pesquisa de genes codificadores de adesinas e biofilme utilizando a reação em cadeia da polimerase (PCR)

A pesquisa de genes codificadores de adesinas em estirpes de *Staphylococcus* spp. isoladas de amostras clínicas de cães e gatos foi realizada pela reação em cadeia da polimerase (PCR) de todas as estirpes isoladas de *Staphylococcus* spp.

Foram utilizados diferentes pares de oligonucleotídeos disponíveis comercialmente, sendo PCR-1, para detectar os genes que codificam para proteína ligadora de colágeno (*cna*), proteína ligadora de laminina (*eno*), e proteína ligadora de elastina (*ebpS*); PCR-2, proteína B ligadora de fibronectina (*fnbB*), e proteína ligadora de fibrinogênio (*fib*), conforme descrito por (TRISTAN et al., 2003). Para PCR-3, foi realizada a pesquisa de genes codificadores de proteína associada a

formação de biofilme (*bap*) utilizando o protocolo exposto por (VANCRAEYNEST; HERMANS; HAESBROUCK, 2004). Finalmente para PCR- 4 proteína A ligadora de fibronectina (*fnbA*), foi utilizado o protocolo referido por (KUMAR et al., 2010). O tamanho dos amplicons e literatura relevante estão apresentados no quadro 1.

Quadro 1 - Primers utilizados na PCR para amplificar fragmentos de genes codificadores de adesinas (*cna*, *eno*, *ebpS*, *fnbA*, *fnbB*, *fib*, *bap*)

Proteína	Iniciador	Sequencia (5' - 3')	Tamanho do produto amplificado
Ligadora de Colageno	cna – 1	GTCAAGCAGTTATTAACACCAGAC	423
	cna – 2	AATCAGTAATTGCACTTTGTCCACTG	
Ligadora de Laminina	eno – 1	ACGTGCAGCAGCTGACT	302
	eno – 2	CAACAGCATYCTTCAGTACCTTC	
Ligadora de Elastina	ebpS – 1	CATCCAGAACCAATCGAAGAC	186
	ebpS – 2	CTTAACAGTTACATCATCATGTTTATCTTTTG	
B Ligadora de Fibronectina	fnbB– 1	GTAACAGCTAATGGTCGAATTGATACT	524
	FnbB– 2	CAAGTTCGATAGGAGTACTATGTTC	
Ligadora de Fibrinogenio	fib – 1	CTACAACACTACAATTGCCGTCAACAG	404
	fib– 2	GCTCTTGTAAGACCATTTTCTTCAC	
Associada a Formação de Biofilme	bap – 1	CCCTATATCGAAGGTGTAGAATTG	971
	bap – 2	GCTGTTGAAGTTAATACTGTACCTGC	
A Ligadora de Fibronectina	fnbA– 1	GCGGAGATCAAAGACAA	1280
	fnbA– 2	CCATCTATAGCTGTGTGG	

4.5 Extração do DNA bacteriano

A obtenção do material genético foi realizada mediante a técnica de Boom et al. (1990). Foi realizada a suspensão da colônia em PBS, após isto foi adicionada 20µl de proteinase K e 100 µl de lisozima, e incubados em estufa a 37 °C. Foram adicionados 1000 µl de tampão de lise e 40 µl de suspensão carreadora.

Após isto foi centrifugada a 12800rpm por 1' e 30", descartando o sobrenadante, e ressuspendida a reação em 500 µl de tampão de lavagem.

Descartando o conteúdo sem tocar o pelet, e se adicionou 500 µl de álcool etílico a 70%, foi centrifugada de novo a 12800 rpm por 1' e 30" descartando o sobrenadante e adicionando 500 µl de acetona 99,5%. Após nova centrifugação 12800 rpm por 2', descartando após o sobrenadante, e o tubo aberto colocado em estufa a 37°C por um mínimo de 30'. Foram adicionados 150 µl de tampão de eluição (TE) e se incubaram em banho-seco 55-56 °C por 10'. Foi ainda realizada outra centrifugação 12800 rpm por 5', após foi retirado o sobrenadante e para assegurar a ausência de sílica, se centrifugou de novo pela ultima vez a 12800 rpm por 2'. Até que o produto fosse amplificado foi mantido em freezer a -20 °C.

4.6 Reação em cadeia da polimerase e detecção do produto amplificado

Foi realizado o protocolo de reação descrito por (TRISTAN et al., 2003). Dois conjuntos de primers foram utilizados em reação de PCR multiplex: PCR-1 para amplificar *cna*, *ebpS* e *eno* e PCR-2 para amplificar *fnbB* e *fib*. Para amplificação do gene *bap* foi utilizado o protocolo de reação conforme (VANCRAEYNEST; HERMANS; HAESEBROUCK, 2004). E para o gene *fnbA* foi empregado o protocolo citado por (KUMAR et al., 2010). A cada extração foram utilizados controles positivos contendo os genes codificadores das adesinas e biofilme conforme quadro 1, e um controle negativo.

Para as reações de amplificação foi utilizado um volume final de 25µl da mistura, contendo 1µl da solução de DNA extraído, 2,5µl de Tampão concentrado 10x, 4µl de DNTPs, 0,8µl de MgCl₂, 0,2µl de Taq DNA Polimerase, 1,25µl de cada primer, 9µl de água (PCR 1 e 2) e 14µl de água para (PCR-3) e (PCR-4). As reações foram amplificadas em um termociclador 2720 *ThermalCycler* (Termo Applied Biosystems ®). Para PCR-1 e 2 as reações foram realizadas nas seguintes condições: desnaturação inicial de 30s a 4°C, seguida de 5 min a 94°C, 25 ciclos de amplificação com duração 1 minuto a 94°C, com temperatura de anelamento de 1 minuto a 53°C e 1 min a 72°C. A reação foi concluída com incubação de 10 min a 72°C. Para PCR-3, as condições de amplificação incluem uma desnaturação inicial

de 2 minutos a 94°C, seguida de 30 ciclos de amplificação, sendo 1 minuto a 55°C, e anelamento de 1 min a 62°C e elongação de 1 min a 72 C, terminando com a temperatura de incubação de 7 min a 72°C), a finalização foram 7 minutos de incubação a 72°C. As condições de amplificação para PCR-4 foram: desnaturalização inicial de 94°C durante 3 minutos, seguida de 1 minuto a 94°C, 25 ciclos de amplificação, duração 1 minuto e 50 segundos a 50°C, com temperatura de anelamento de 1 minuto a 72°C, e incubação de 10 minutos a 72°C.

Para visualização e análise dos fragmentos de DNA amplificado pela reação de PCR, os produtos foram submetidos a electroforese em gel de agarose a 1,5%, preparado em tampão de 0,5X TBE (Tris base 890 mM; EDTA 25 mM; ácido bórico 89 Mm). Para visualização dos tamanhos dos produtos da PCR, alíquotas dessas amostras misturadas a solução tampão (azul de bromofenol 0,25% e glicerol 30%) e padrão de massa molecular conhecido (1000pb DNA Ladder – Invitrogen TM) foram submetidos a separação eletroforética por cerca de 40 minutos a 110 volts. O gel, então foi corado com brometo de etídio e visualizado sob luz ultravioleta em um transiluminador e finalmente registrado por fotografia digital.

5 RESULTADOS

5.1 Identificação e caracterização do grupo de estudo

Foram avaliadas um total de (N=118) amostras clínicas provenientes de cães e gatos, nas quais se identificou crescimento bacteriano puro para *Staphylococcus* spp., em 94,07% (N=111), dos isolados para a espécie canina, e 5,93% (N=7), correspondente a espécie felina.

Em relação ao sexo; dentro dos caninos o 59,46 % (N=66) das amostras eram originárias de fêmeas, e o 40,54% (N=45), resultantes de machos. Com respeito à espécie felina se registrou 42,86 % (N=3), amostras de fêmeas, e 57,14 % (N=4), de machos.

Do total das 118 amostras testadas, em quatro animais não foi obtida a informação da idade. A composição etária dos animais variou entre os três meses - 18 anos de idade, com uma média de 6,7 anos. A distribuição da faixa etária para as duas espécies foi categorizada em animais Jovens (< 1 ano), adultos (1 - 7anos) e idosos (>7anos). Do total dos 114 animais com idade determinada, os animais jovens contribuíram com 15,8 % (18), sendo 17 (14,9%) caninos e um animal (0,9%) felino; um total de 49 animais (43%) fizeram parte do grupo dos adultos, destes 44 (38,6%) eram caninos e 5 (4,4%) felinos, e finalmente 47 (41,2%) animais conformaram o grupo dos idosos, sendo 46 (40,4%) caninos e 1 (0,9%) felino, (Tabela 1).

Tabela 1 - Distribuição das faixas etárias (em número absoluto e percentagem) para caninos e felinos

Faixa Etária	Caninos		Felinos		Total	
	Absoluto	%	Absoluto	%	absoluto	%
Jovens (< 1ano)	17	14,9	1	0,9	18	15,8
Adultos (1 - 7anos)	44	38,6	5	4,4	49	43,0
Idosos (> 7anos)	46	40,4	1	0,9	47	41,2
Total	107	93,9	7	6,1	114	100

Respeito as raças em felinos, os animais Sem Raça Definida SRD apresentaram uma frequência de 4 (57,14%) animais, seguidas da raça Persa com 2 (28,57%) e Sagrado da Birmânia 1 (14,29%) animal respectivamente (Tabela 2).

Tabela 2 -Frequência das raças felinas (em numero absoluto e percentagem)

Raça Felinos	Absoluto	%
Persa	2	28,57
Sagrado da Birmânia	1	14,29
SRD	4	57,14

Com respeito às raças na espécie canina, os animais Sem Raça Definida SRD e Poodle apresentam uma frequência 13,51% representados por 15 animais para cada uma, seguida das raças Golden Retriever com 7 (6,30 %) animais; Cocker Spaniel 6 (5,40%); Maltes, Pinscher, Schnauzer e Shih–zu 5 (4,50%), Beagle, Bulldog, Dachshund, Lhasa Apso e Pug 4 (3,64%) ; West Highland White Terrier e Yorkshire 3 (2,70 %); Labrador , Pit bull , São Bernardo Spitz Alemão e Teckel 2 (1,80 %) ; Akita, Basset Hound, Bichon Frise, Border Collie, Bull terrier, Bulldog francês, Chow chow, Coton de Tulear, Dogue Alemão, Fox Paulistinha, Lulu da Pomerania e Pastor alemão 1 (0,90 %) animal respectivamente (Tabela 3).

Tabela 3 -Frequência das raças para cães (em numero absoluto e percentagem)

Raça caninos	Absoluto	%
Poodle	15	13,51
Srd	15	13,51
Golden retriever	7	6,30
Cocker spaniel	6	5,40
Maltes	5	4,50
Pinscher	5	4,50
Schnauzer	5	4,50
Shih tzu	5	4,50
Beagle	4	3,60
Bulldog	4	3,60
Dachshund	4	3,60
Lhasa Apso	4	3,60
Pug	4	3,60
West Highland White Terrier	3	2,70
Yorkshire	3	2,70
Labrador	2	1,80
Pitbull	2	1,80
Sao Bernardo	2	1,80
Spitz Alemão	2	1,80
Teckel	2	1,80
Akita	1	0,90
Basset hound	1	0,90
Bichon frise	1	0,90
Border collie	1	0,90
Bull terrier	1	0,90
Bulldog francês	1	0,90
Chow chow	1	0,90
Coton de Tulear	1	0,90
Dogue Alemão	1	0,90
Fox paulistinha	1	0,90
Lulu da pomerania	1	0,90
Pastor Alemão	1	0,90

5.2 Isolamento e identificação dos *staphylococcus* spp. presentes em diversas amostras clínicas

Do total das 118 amostras, 75 (63,55%) delas foram obtidas de pele, 25 (21,18%) de secreção otológica, 12 (10,16%) de Urina, 2 (1,69%) de secreção vulvar e 1 (0,84%) de secreção ocular, nasal, fragmento de bexiga e torácico respectivamente. Na espécie felina só foram isoladas amostras de pele e urina (Tabela 4).

Tabela 4 - Frequência dos materiais e tecidos isolados (em número absoluto e percentagem), em relação à espécie animal (cães e gatos), para o total de 118 amostras avaliadas

Material isolado	Caninos (N = 111)		Felinos (N = 7)		Total (N = 118)	
	Absoluto	%	Absoluto	%	Absoluto	%
Pele	70	63,00	5	71,429	75	63,55
Urina	10	9,00	2	28,571	12	10,16
Secreção nasal	1	0,90			1	0,84
Secreção ocular	1	0,90			1	0,84
Secreção vulvar	2	1,80			2	1,69
Secreção otológica	25	22,52			25	21,18
Fragmento de bexiga	1	0,90			1	0,84
Fragmento de tubo torácico	1	0,90			1	0,84

Das estirpes de *Staphylococcus* spp., isoladas, 84 (73,0%) foram *Staphylococcus* coagulase-positivo, representados em sua totalidade na espécie canina; e 31 (27,0%) *Staphylococcus* coagulase-negativo, os quais são compartilhados pelas duas espécies (cães-gatos). Três amostras não foram classificadas nestes grupos (Tabela 5).

Tabela 5 - Frequência de ocorrência (em número absoluto e percentagem), segundo a classificação em coagulase-positivo e coagulase-negativo

Coagulase	Caninos (N= 109)		felinos (N= 6)		Total (115)	
Positivo	84	73,04%	0		84	73%
Negativo	25	21,70%	6	5,21%	31	27%

Em relação à frequência de ocorrência das estirpes de *Staphylococcus* Coagulase Negativos (SCN) (N=31), houve crescimento de 4 estirpes sendo: o *S. chromogenes* com 4 (12,9%) em relação aos SCN, e (3,48%) com relação ao total das amostras testadas e identificadas (N=115), o *S. epidermidis* com 19 (61,29%) em relação aos SCN, e (16,52%) com relação ao total das amostras, o *S. xylosus* com 7 (22,58%) em relação aos SCN, e (6,09%) em relação ao total das amostras, e finalmente o *S. schleiferi* subsp. *schleiferi* com 1 (3,23%) em relação aos SCN, e (0,87%) para o total das amostras identificadas (Tabela 6).

Tabela 6 - Frequência de ocorrência das estirpes de *Staphylococcus* (em numero absoluto e percentagem), segundo a classificação em coagulase-negativo

Estirpes Coagulase Negativos	Absoluto	% em relação aos SCN (N=31)	% em relação ao total (N=115)
<i>S. chromogenes</i>	4	12,9	3,48
<i>S. epidermidis</i>	19	61,29	16,52
<i>S. xylosus</i>	7	22,58	6,09
<i>S. schleiferi</i>	1	3,23	0,87

Em relação a frequência de ocorrência das estirpes de *Staphylococcus* Coagulase Positivos (SCP) (N=84), houve crescimento de duas estirpes sendo: o *S. aureus* com 2 (2,38%) em relação aos SCP, e (1,74%) em relação ao total das amostras testadas e identificadas (N=115), e o *S. pseudointermedius* com 82 (97,62%) em relação aos SCP, e (71,30%) em relação ao total das amostras testadas e identificadas (Tabela 7).

Tabela 7 - Frequência de ocorrência das estirpes de *Staphylococcus* (em numero absoluto e percentagem), segundo a classificação em coagulase-positivo

Estirpes Coagulase Positivo	Absoluto	% em relação aos SCP (N=84)	% em relação ao total (N=115)
<i>S. aureus</i>	2	2,38	1,74
<i>S.pseudointermedius</i>	82	97,62	71,30

Analisando o total das amostras isoladas de *Staphylococcus* spp., houve crescimento de sete estirpes diferentes, sendo 82 (69,49%) *Staphylococcus pseudointermedius*, 19 (16,10%) *Staphylococcus epidermidis*, 7 (5,93%) *Staphylococcus xylosum*, 4 (3,39%) *Staphylococcus chromogenes*, 3 (2,54%) *Staphylococcus spp*, 2 (1,69%) *Staphylococcus aureus*, 1 (0,85%) *Staphylococcus schleiferi*. Em felinos se identificaram três estirpes que foram: *Staphylococcus epidermidis*, o *Staphylococcus xylosum*, e o *Staphylococcus spp* (Tabela 8).

Tabela 8 - Frequência das bactérias isoladas em relação à espécie (cães – gatos) (em numero absoluto e percentagem)

Bactéria isolada	Felinos (N = 7)		Caninos (N = 111)		Total (N=118)	
	Absoluto	%	Absoluto	%	Absoluto	%
<i>S. aureus</i>	0	0,00	2	1,8	2	1,69
<i>S. chromogenes</i>	0	0,00	4	3,6	4	3,39
<i>S. epidermidis</i>	5	71,43	14	12,61	19	16,1
<i>S.pseudointermedius</i>	0	0,00	82	73,87	82	69,49
<i>S.schleiferi</i>	0	0,00	1	0,9	1	0,85
<i>S.spp</i>	1	14,29	2	1,8	3	2,54
<i>S. xylosum</i>	1	14,29	6	5,41	7	5,93

Em relação a o total das 118 amostras enquanto a frequência das estirpes de *Staphylococcus* spp., associadas ao tecido ou material isolado, encontrou-se que o *Staphylococcus aureus* e o *Staphylococcus schleiferi* só foram encontrados em amostras de pele, sendo 2 (1,69%) *Staphylococcus aureus*, e 1 (0,85%) para *Staphylococcus schleiferi*. O *Staphylococcus chromogenes* foi isolado em 4 (3,39%) amostras, sendo 3 de urina (2,54%) e 1 amostra de secreção otológica (0,85%). Do total das 82 (69,5) amostras isoladas de *Staphylococcus pseudointermedius*, 54 (45,8%), foram de pele, 22 (18,6%) de secreção otológica, 2 (1,69%) de urina, 2 (1,69%) de secreção vulvar, 1 (0,85%) secreção nasal e também 1 (0,85%) de secreção ocular. Das 19 (16,1%) amostras isoladas de *Staphylococcus epidermidis*, 17 (14,4%) eram pele, e 2 (1,69%) de secreção otológica. *Staphylococcus xylosum*, foi isolado em 7 (5,93) amostras, 5 (4,24%) amostras de urina, 1 (0,85%) fragmento de bexiga e 1 (0,85%) torácico. Finalmente 3 (2,54%) amostras não identificadas da

estirpe *Staphylococcus spp*, foi isolado em 1 (0,85%) amostra de pele, e duas 2 (1,69%) amostras de urina (Gráfico 1 e Tabela 9).

Gráfico 1 - Frequência das bactérias isoladas em relação ao tecido

Tabela 9 - Frequência das bactérias isoladas (em numero absoluto e percentagem), em relação ao tecido

Tecido	<i>Staphylococcus schleiferi</i> (%)		<i>Staphylococcus aureus</i> (%)		<i>Staphylococcus chromogenes</i> (%)		<i>Staphylococcus epidermidis</i> (%)		<i>Staphylococcus pseudointermedius</i> (%)		<i>Staphylococcus spp</i> (%)		<i>Staphylococcus xylosus</i> (%)		Total	%
Pele	1,00	0.85	2,00	1.69	0,00	0,00	17,00	14.40	54,00	45.8	1,00	0.85	0,00	0,00	75	63.60
Secreção otológica	0,00	0,00	0,00	0,00	1,00	0.85	2,00	1.69	22,00	18.60	0,00	0,00	0,00	0,00	25	21.20
Urina	0,00	0,00	0,00	0,00	3,00	2.54	0,00	0,00	2,00	1.69	2,00	1.69	5,00	4.24	12	10.20
Secreção vulvar	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	2,00	1.69	0,00	0,00	0,00	0,00	2	1.69
Fragmento de bexiga	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	1,00	0.85	1	0.85
Fragmento de tubo torácico	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	1,00	0.85	1	0.85
Secreção nasal	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	1,00	0.85	0,00	0,00	0,00	0,00	1	0.85
Secreção ocular	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	1,00	0.85	0,00	0,00	0,00	0,00	1	0.85
Total	1,00	0.85	2,00	1.69	4,00	3.39	19,00	16.10	82,00	69.5	3,00	2.54	7,00	5.93	118	100

5.3 Avaliação da susceptibilidade *in vitro* das estirpes de *Staphylococcus* spp. isoladas, frente a diferentes antimicrobianos

Avaliou-se o perfil de sensibilidade e resistência das estirpes de *Staphylococcus* spp., isoladas frente a diferentes antimicrobianos, os resultados estão apresentados na tabela 10 e gráfico 2. O maior índice de resistência encontrado foi para eritromicina com (54,32%) em 81 amostras testadas, seguido por clindamicina com (40,79%) em 76 amostras testadas, um índice importante de resistência foi apresentado pela norfloxacin com (29,91%) em 117 amostras testadas, e a ciprofloxacina, com (28,07%) em 114 amostras testadas, o cloranfenicol mostrou uma percentagem de resistência de (25,00%) em 100 amostras, e a enrofloxacin com (23,73%) em 118 amostras, a oxacilina teve (14,04%) em 114 amostras testadas.

Os antimicrobianos que apresentaram o maior índice de sensibilidade foram: oxacilina com (85,96%) em 114 amostras testadas, seguido por cefalexina com (84,75%) em 118 amostras testadas, amoxicilina/ac clavulâmico com (83,90%) em 118 amostras, cefadroxil com (82,35%) em 102 amostras, e finalmente a doxiciclina com (77,78%) em 117 amostras testadas.

Tabela 10 - Frequência (em numero absoluto e percentagem) das estirpes de *Staphylococcus* spp. Isoladas de acordo com a susceptibilidade *in vitro* aos antimicrobianos testados
(Continua)

Antibiótico	Sensível		Intermediário		Resistente		Total N
	Absoluto	%	Absoluto	%	Absoluto	%	
Enrofloxacin	86	72.88	4	3.39	28	23.73	118
Gentamicina	88	74.58	9	7.63	21	17.80	118
Amoxicilina / ac clavulâmico	99	83.90	0	0.00	19	16.10	118
Cefalexina	100	84.75	0	0.00	18	15.25	118
Norfloxacin	81	69.23	1	0.85	35	29.91	117
Doxiciclina	91	77.78	13	11.11	13	11.11	117
Ciprofloxacina	81	71.05	1	0.88	32	28.07	114
Oxacilina	98	85.96	0	0.00	16	14.04	114
Cefadroxil	84	82.35	0	0.00	22	21.57	102
Cloranfenicol	74	74.00	1	1.00	25	25.00	100
Neomicina	69	69.00	13	13.00	18	18.00	100

(Conclusão)

Antibiótico	Sensível		Intermediário		Resistente		Total N
	Absoluto	%	Absoluto	%	Absoluto	%	
Eritromicina	37	45.68	0	0.00	44	54.32	81
Clindamicina	45	59.21	0	0.00	31	40.79	76
Cefovecin	42	79.25	0	0.00	11	20.75	53
Ceftiofur	23	85.19	0	0.00	4	14.81	27
Tobramicina	20	76.92	3	11.54	3	11.54	26
Ofloxacin	12	54.55	0	0.00	10	45.45	22
Azitromicina	15	68.18	0	0.00	7	31.82	22
Tetraciclina	12	75.00	1	6.25	3	18.75	16
Sulfametoxazol trimetropin	6	50.00	0	0.00	6	50.00	12
Ceftriaxona	10	83.33	0	0.00	2	16.67	12
Rifampicina	8	100.00	0	0.00	0	0.00	8
Marbofloxacin	3	50.00	0	0.00	3	50.00	6
Nitrofurantoina	4	100.00	0	0.00	0	0.00	4
Levofloxacin	0	0.00	0	0.00	1	100.00	1
Moxifloxacin	1	100.00	0	0.00	0	0.00	1

Gráfico 2 - Frequência geral das estirpes de *Staphylococcus* spp. De acordo com a susceptibilidade *in vitro* aos antimicrobianos testados

De acordo com as diferentes percentagens de resistência apresentados pelas estirpes de *Staphylococcus* spp., foram divididos os antimicrobianos testados em três grupos: 1) percentagem de resistência baixa (<20%), 2) percentagem de

resistência média (20-30%), 3) percentagem de resistência alta (>30%). Os antimicrobianos que fizeram parte do grupo 1 foram: Neomicina, Gentamicina, Amoxicilina, Cefalexina, Oxacilina e Doxiciclina. Os antimicrobianos que fizeram parte do grupo 2 foram: Cloranfenicol, Cefadroxil e Enrofloxacin. Os antimicrobianos que fizeram parte do grupo 3 foram: Eritromicina e Clindamicina.

A proporção de resistência entre os diferentes grupos de antimicrobianos foi comprovada mediante o teste Qui-Quadrado para determinar se existia alguma diferença estatística. As análises foram feitas utilizando o programa Minitab 17 e considerando um nível de significância de 5%.

Foi determinado que existia diferença estatística da proporção de resistência entre os 3 os grupos de antimicrobianos ($p = 0,000$) devido a que o resultado foi menor a 0,05 . Contudo neste caso não sabíamos onde estava esta diferença, por isso foi realizado o teste Qui-Quadrado para todos os grupos por separado, os primeiros testados foram os grupos 1 e 2: Onde também foi determinada que existia uma diferença estatística nestes dois grupos. ($p=0,000$). Posteriormente se testaram os grupos 1 e 3: Onde também foi determinada que existia diferença estatística nestes dois grupos. ($P=0,000$). Posteriormente se testaram os grupos 2 e 3: Onde também foi determinada que existia diferença estatística nestes dois grupos. ($P=0,000$). Finalmente foram testados os dois antimicrobianos que conformaram o grupo 3, porque estes dois medicamentos (Eritromicina e Clindamicina), exibiram os maiores índices de resistência, e tínhamos a intenção de ver se entre eles existia alguma diferença: Neste caso no grupo 3, não foi encontrada diferença estatisticamente significativa $p= 0,089$.

Avaliou-se também o perfil de resistência e sensibilidade das estirpes de *Staphylococcus* coagulase positivos, assim como dos coagulase negativos, os resultados obtidos estão apresentados nas tabelas 11 e 12 e gráficos 3 e 4 respectivamente.

Para os SCP, os antimicrobianos que apresentaram os maiores índices de resistência foram eritromicina com (55,74%) em 61 amostras testadas, seguido por clindamicina com (40,35%) em 57 amostras, a norfloxacin teve resistência de (34,94%) em 83 amostras, e finalmente a ciprofloxacina com (30,86%) em 81 amostras avaliadas.

As frequências mais altas de sensibilidade foram verificadas para oxacilina com (85,00%) em 80 amostras testadas, seguida por cefalexina com (83,33%) em 84 amostras, amoxicilina/ac clavulânico com (82,14%) em 84 amostras, cefadroxil com (80,82%) em 73 amostras, doxiciclina com (75,90%) em 83 amostras, cloranfenicol com (74,68%) em 79 amostras, e finalmente enrofloxacin com (70,25%) em 84 amostras avaliadas.

Tabela 11 - Frequência geral das estirpes de *Staphylococcus* coagulase-positivos de acordo com a susceptibilidade *in vitro* aos antimicrobianos testados

Antibiótico	Sensível		Intermediário		Resistente		Total N
	absoluto	%	absoluto	%	absoluto	%	
Cefalexina	70	83.33	0	0.00	14	16.67	84
Gentamicina	63	75.00	6	7.14	15	17.86	84
Amoxicilina / ac clavulânico	69	82.14	0	0.00	15	17.86	84
Enrofloxacin	59	70.24	2	2.38	23	27.38	84
Doxiciclina	63	75.90	11	13.25	9	10.84	83
Norfloxacin	53	63.86	1	1.20	29	34.94	83
Ciprofloxacina	55	67.90	1	1.23	25	30.86	81
Oxacilina	68	85.00	0	0.00	12	15.00	80
Neomicina	51	64.56	12	15.19	16	20.25	79
Cloranfenicol	59	74.68	1	1.27	19	24.05	79
Cefadroxil	59	80.82	0	0.00	14	19.18	73
Eritromicina	27	44.26	0	0.00	34	55.74	61
Clindamicina	34	59.65	0	0.00	23	40.35	57
Cefovecin	30	78.95	0	0.00	8	21.05	38
Tobramicina	17	73.91	3	13.04	3	13.04	23
Ceftiofur	18	81.82	0	0.00	4	18.18	22
Ofloxacin	10	50.00	0	0.00	10	50.00	20
Tetraciclina	9	81.82	1	9.09	1	9.09	11
Azitromicina	4	50.00	0	0.00	4	50.00	8
Marbofloxacina	2	50.00	0	0.00	2	50.00	4
Rifampicina	4	100.00	0	0.00	0	0.00	4
Sulfametoxazol trimetropin	0	0.00	0	0.00	2	100.00	2
Ceftriaxona	1	100.00	0	0.00	0	0.00	1
Levofloxacin	1	100.00	0	0.00	0	0.00	1
Moxifloxacin	1	100.00	0	0.00	0	0.00	1
Nitrofurantoina	1	100.00	0	0.00	0	0.00	1

Gráfico 3 - Frequência geral das estirpes de *Staphylococcus* coagulase-positivos de acordo com a susceptibilidade *in vitro* aos antimicrobianos testados

De acordo com as diferentes percentagens de resistência apresentados pelas estirpes de *Staphylococcus* coagulase positivos, foram novamente divididos os antimicrobianos testados em três grupos: 1) percentagem de resistência baixa (<20%), 2) percentagem de resistência média (20-30%), 3) percentagem de resistência alta (>30%). Os antimicrobianos que fizeram parte do grupo 1 foram: Cefadroxil, Gentamicina, Amoxicilina, Cefalexina, Oxacilina e Doxiciclina. Os antimicrobianos que fizeram parte do grupo 2 foram: Enrofloxacin, Cloranfenicol e Neomicina. E os antimicrobianos que fizeram parte do grupo 3 foram: Eritromicina, Clindamicina, Norfloxacina e Ciprofloxacina.

A proporção de resistência entre os diferentes grupos de antimicrobianos foi comprovada mais uma vez mediante o teste Qui-Quadrado para determinar se

existia alguma diferença estatística. As análises foram feitas utilizando o programa Minitab 17 e considerando um nível de significância de 5%.

Foi encontrado que existia diferença estatística da proporção de resistência entre os 3 grupos de antimicrobianos ($p = 0,000$) devido a que o resultado foi menor a 0,05. Além disso foi realizado o teste Qui-Quadrado para todos os grupos por separado, os primeiros testados foram os grupos 1 e 2: Onde também foi determinada que existia uma diferença estatística nestes dois grupos. ($p = 0,011$). Posteriormente se testaram os grupos 1 e 3: Onde também foi determinada que existia diferença estatística nestes dois grupos. ($P = 0,000$). Posteriormente se testaram os grupos 2 e 3: Onde também foi determinada que existia diferença estatística nestes dois grupos ($P = 0,000$).

Em relação aos SCN, os antimicrobianos que apresentaram maior frequência de resistência foram: eritromicina com (52,64%) em 19 amostras testadas, seguida por clindamicina com (44,44%) em 18 amostras, cloranfenicol com (30,00%) em 20 amostras, ciprofloxacina com (23,33) em 30 amostras, e finalmente Gentamicina e norfloxacina com (19,35%) em 31 amostras avaliadas respectivamente.

Os maiores índices de sensibilidade foram apresentados por: amoxicilina/ac clavulânico, cefalexina e oxacilina com (87,10%) em 31 amostras testadas respectivamente, seguidas por cefadroxil com (85,19%) em 27 amostras, os índices para norfloxacina e doxiciclina foram (80,65%) em 31 amostras respectivamente, e finalmente a enrofloxacin apresentou uma sensibilidade de (77,42%) em 31 amostras avaliadas (Tabela 12 e Gráfico 4).

Tabela 12 - Frequência geral das estirpes de *Staphylococcus* coagulase-negativos de acordo com a susceptibilidade *in vitro* aos antimicrobianos testados

(Continua)

Antibiótico	Sensível		Intermediário		Resistente		Total N
	absoluto	%	absoluto	%	absoluto	%	
Gentamicina	22	70.97	3	9.68	6	19.35	31
Norfloxacina	25	80.65	0	0.00	6	19.35	31
Enrofloxaci	24	77.42	2	6.45	5	16.13	31
Doxiciclina	25	80.65	2	6.45	4	12.90	31
Amoxicilina / ac clavulânico	27	87.10	0	0.00	4	12.90	31
Cefalexina	27	87.10	0	0.00	4	12.90	31
Oxacilina	27	87.10	0	0.00	4	12.90	31

(Conclusão)

Antibiótico	Sensível		Intermediário		Resistente		Total N
	absoluto	%	absoluto	%	absoluto	%	
Ciprofloxacina	23	76.67	0	0.00	7	23.33	30
Cefadroxil	23	85.19	0	0.00	4	14.81	27
Cloranfenicol	14	70.00	0	0.00	6	30.00	20
Neomicina	17	85.00	1	5.00	2	10.00	20
Eritromicina	9	47.37	0	0.00	10	52.63	19
Clindamicina	10	55.56	0	0.00	8	44.44	18
Azitromicina	9	75.00	0	0.00	3	25.00	12
Cefovecin	9	75.00	0	0.00	3	25.00	12
Ceftriaxona	8	80.00	0	0.00	2	20.00	10
Sulfametoxazol trimetropin	5	55.56	0	0.00	4	44.44	9
Tetraciclina	2	50.00	0	0.00	2	50.00	4
Rifampicina	4	100.00	0	0.00	0	0.00	4
Nitrofurantoina	3	100.00	0	0.00	0	0.00	3
Tobramicina	3	100.00	0	0.00	0	0.00	3
Marbofloxacin	1	50.00	0	0.00	1	50.00	2
Ceftiofur	2	100.00	0	0.00	0	0.00	2
Ofloxacin	2	100.00	0	0.00	0	0.00	2

Gráfico 4 - Frequência geral das estirpes de *Staphylococcus* coagulase-negativos de acordo com a susceptibilidade *in vitro* aos antimicrobianos testados

Novamente, e de acordo com as diferentes percentagens de resistência apresentados pelas estirpes de *Staphylococcus* coagulase negativos, foram

divididos os antimicrobianos testados em três grupos: 1) percentagem de resistência baixa (<20%), 2) percentagem de resistência média (20-30%), 3) percentagem de resistência alta (>30%). Os antimicrobianos que fizeram parte do grupo 1 foram: Gentamicina, Norfloxacin, Enrofloxacin, Cefadroxil, Doxiciclina, Amoxicilina, Cefalexina, e Oxacilina. Os antimicrobianos que fizeram parte do grupo 2 foram: Ciprofloxacina e Cloranfenicol. E os antimicrobianos que fizeram parte do grupo 3 foram: Eritromicina e Clindamicina.

A proporção de resistência entre os diferentes grupos de antimicrobianos foi comprovada mais uma vez mediante o teste Qui-Quadrado para determinar se existia alguma diferença estatística. As análises foram feitas utilizando o programa Minitab 17 e considerando um nível de significância de 5%.

Foi encontrado que existia diferença estatística da proporção de resistência entre os 3 os grupos de antimicrobianos ($p = 0,000$) devido a que o resultado foi menor a 0,05. Além disso foi realizado o teste Qui-Quadrado para todos os grupos por separado, os primeiros testados foram os grupos 1 e 2: Onde foi determinada que não existia uma diferença estatística nestes dois grupos. ($p = 0,063$). Posteriormente se testaram os grupos 1 e 3: Onde foi determinada que existia diferença estatística nestes dois grupos. ($P = 0,000$). Posteriormente se testaram os grupos 2 e 3: Onde também foi determinada que existia diferença estatística nestes dois grupos ($P = 0,029$).

Foi realizado o teste *U* de *Mann Whitney* para verificar se existia diferença significativa entre as medianas dos escores assignados aos antimicrobianos de acordo com o índice apresentado de sensibilidade ou resistência (1 “sensível”; 2 “Intermédio”; 3 “resistente”) entre os grupos de coagulase-positivo e coagulase-negativo ($p < 0,05$) mais não foi encontrada diferença significativa (Tabela 13).

Tabela 13 - Teste *U* de Mann Whitney para Coagulase positivo e Coagulase negativo

Relação coagulase Positiva e Negativa	Prova para medianas independentes	Test U Mann Whitney
	p valor	p valor
Amoxicilina	0,725	0,527
Azitromicina	0,356 ^{1 2}	0,384 ¹
Cefadroxil	0,833	0,616
Cefalexina	0,839	0,624
Ceftiofur	1,000 ^{1 2}	0,725 ¹
Cefovecin	0,911	0,776
Ciprofloxacina	0,507	0,389
Ceftriaxona	1,000 ^{1 2}	1,0 ¹
Clindamicina	0,974	0,760
Cloranfenicol	0,888	0,648
Doxiciclina	0,775	0,671
Enrofloxaci	0,597	0,368
Eritromicina	NSP	0,813
Gentamicina	0,843	0,694
Marbofloxacina	1,000 ^{1 2}	1000 ¹
Neomicina	0,136	0,93
Nitrofurantoina	*	1000 ¹
Ofloxacin	0,481 ^{1 2}	0,312
Norfloxacina	0,136	0,093
Oxacilina	0,985	0,779
Sulfametoxazol trimetropin	*	0,327 ¹
Tetraciclina	0,516 ^{1 2}	0,343 ¹
Tobramicina	1,000 ^{1 2}	0,490 ¹
Rifampicina	*	1000 ¹
Levofloxacina	*	
Moxifloxacina	*	

¹ Significancia exata para esta prova² Significancia exata de Fisher

5.4 Avaliacao da susceptibilidade *in vitro* frente a diferentes antimicrobianos em relacao a todas as estirpes de *staphylococcus* spp. identificadas

Foi avaliada a susceptibilidade *in vitro* aos diversos antimicrobianos testados, (em numero absoluto e percentagem) para cada estirpe de *Staphylococcus* spp. isolada e identificada.

O *Staphylococcus aureus* foi isolado em duas amostras das 118 testadas, O antimicrobiano que apresentou a maior frequência de resistência foi a eritromicina

com (100%) em duas amostras testadas, os antimicrobianos amoxicilina/ac clavulanico, cefadroxil, cefalexina, clindamicina, cloranfenicol, doxiciclina, gentamicina, neomicina e oxacilina finalmente, apresentaram (50%) de resistência nas duas amostras avaliadas.

O maior índice de sensibilidade foi reportado pelos antimicrobianos ciprofloxacina, enrofloxacina e norfloxacina com (100%) nas duas amostras respectivamente (Tabela 14 e Gráfico 5).

Tabela 14 - Frequência (em numero absoluto e percentagem) das estirpes de *Staphylococcus aureus*. isoladas de acordo com a susceptibilidade *in vitro* aos antimicrobianos testados

Antibiótico	Sensível		Resistente		Total N
	Absoluto	%	absoluto	%	
Eritromicina	0	0	2	100	2
Amoxicilina /ac clavulânico	1	50	1	50	2
Cefadroxil	1	50	1	50	2
Cefalexina	1	50	1	50	2
Clindamicina	1	50	1	50	2
Cloranfenicol	1	50	1	50	2
Doxiciclina	1	50	1	50	2
Gentamicina	1	50	1	50	2
Neomicina	1	50	1	50	2
Oxacilina	1	50	1	50	2
Ciprofloxacina	2	100	0	0	2
Enrofloxacina	2	100	0	0	2
Norfloxacina	2	100	0	0	2

Gráfico 5 - Frequência das estirpes de *Staphylococcus aureus*. de acordo com a susceptibilidade *in vitro* aos antimicrobianos testados

O *Staphylococcus epidermidis* foi isolado em 19 amostras das 118 testadas, os maiores índices de resistência foram apresentados por: eritromicina com (47,06%) em 17 amostras testadas, seguido por cefadroxil com (33,33%) em 18 amostras, e cloranfenicol com (26,32%) em 19 amostras.

Os antimicrobianos que apresentaram os maiores índices de sensibilidade foram: norfloxacin e enrofloxacin com (89,47%) em 19 amostras testadas, seguido por ciprofloxacina com (88,89%) em 18 amostras, e finalmente os antimicrobianos oxacilina, cefalexina e amoxicilina/ ac clavulanico com (84,21%) em 19 amostras respectivamente (Tabela 15 e Gráfica 6).

Tabela 15 Frequência (em numero absoluto e percentagem) das estirpes de *Staphylococcus epidermidis*. isoladas de acordo com a susceptibilidade *in vitro* aos antimicrobianos testados

(continua)

Antibiotico	Sensível		Intermediario		Resistente		Total N
	absoluto	%	absoluto	%	absoluto	%	
Cloranfenicol	14	73.68	0	0.00	5	26.32	19
Gentamicina	15	78.95	1	5.26	3	15.79	19
Oxacilina	16	84.21	0	0.00	3	15.79	19
Cefalexina	16	84.21	0	0.00	3	15.79	19
Amoxacilina / acido clavulâmico	16	84.21	0	0.00	3	15.79	19
Doxiciclina	15	78.95	2	10.53	2	10.53	19
Neomicina	16	84.21	1	5.26	2	10.53	19
Norfloxacin	17	89.47	0	0.00	2	10.53	19
Enrofloxaci	17	89.47	1	5.26	1	5.26	19
Cefadroxil	12	66.67	0	0.00	6	33.33	18
Ciprofloxacina	16	88.89	0	0.00	2	11.11	18
Eritromicina	9	52.94	0	0.00	8	47.06	17
Clindamicina	10	62.50	0	0.00	6	37.50	16
Cefovecin	8	72.73	0	0.00	3	27.27	11
Azitromicina	5	83.33	0	0.00	1	16.67	6
Tetraciclina	2	66.67	0	0.00	1	33.33	3
Marbofloxacina	1	50.00	0	0.00	1	50.00	2
Tobramicina	2	100.00	0	0.00	0	0.00	2
Ofloxacin	2	100.00	0	0.00	0	0.00	2
Ceftiofur	1	100.00	0	0.00	0	0.00	1

Gráfico 6 - Frequência das estirpes de *Staphylococcus epidermidis*. isoladas de acordo com a susceptibilidade *in vitro* aos antimicrobianos testados

O *Staphylococcus xylosus* foi isolado em 7 amostras das 118 testadas, os maiores índices de resistência foram apresentados pelos antimicrobianos: sulfametoxazol trimetropin com (50,00%) em 6 amostras testadas, seguido por gentamicina, enrofloxacin e ciprofloxacina com (42,86%) em 7 amostras respectivamente.

Os antimicrobianos que apresentaram maior índice de sensibilidade foram: oxacilina, doxiciclina, cefalexina, cefadroxil e amoxicilina/ac clavulanico com (85,71%) em 7 amostras testadas respectivamente, seguidas por norfloxacin e ceftriaxona com (71,43%) em 7 amostras (Tabela 16 e Gráfica 7).

Tabela 16 - Frequência (em numero absoluto e percentagem) das estirpes de *Staphylococcus xylosus* isoladas de acordo com a susceptibilidade *in vitro* aos antimicrobianos testados

(continua)

Antibiótico	Sensível		Resistente		Total N
	absoluto	%	absoluto	%	
Oxacilina	6	85.71	1	14.29	7
Doxiciclina	6	85.71	1	14.29	7
Cefalexina	6	85.71	1	14.29	7
Cefadroxil	6	85.71	1	14.29	7

(conclusão)

Antibiótico	Sensível		Resistente		Total N
	absoluto	%	absoluto	%	
Amoxicilina /ac clavulâmico	6	85.71	1	14.29	7
Norfloxacina	5	71.43	2	28.57	7
Ceftriaxona	5	71.43	2	28.57	7
Gentamicina	4	57.14	3	42.86	7
Enrofloxaci	4	57.14	3	42.86	7
Ciprofloxacina	4	57.14	3	42.86	7
Sulfametoxazol trimetropin	3	50.00	3	50.00	6
Azitromicina	3	75.00	1	25.00	4
Rifampicina	3	100.00		0.00	3
Nitrofurantoina	2	100.00		0.00	2
Tetraciclina	0	0.00	1	100.00	1
Eritromicina	0	0.00	1	100.00	1
Clindamicina	0	0.00	1	100.00	1

Gráfico 7 - Frequência das estirpes de *Staphylococcus xylosus* isoladas de acordo com a susceptibilidade *in vitro* aos antimicrobianos testados

O *Staphylococcus Chromogenes* foi isolado em 4 amostras das 118 testadas, e os antimicrobianos que apresentaram os maiores índices de resistência foram: ciprofloxacina e norfloxacina com (25,00%) em 4 amostras testadas.

A enrofloxacin e a gentamicina apresentaram resistência intermediária com (25,00%) em 4 amostras testadas respectivamente.

Os antimicrobianos que mostraram maior índice de sensibilidade foram: cefadroxil, cefalexina, doxiciclina, e oxacilina com (100%) em 4 amostras e ceftriaxona com (100%) em 3 amostras testadas (Tabela 17 e Gráfica 8).

Tabela 17 - Frequência (em número absoluto e porcentagem) das estirpes de *Staphylococcus chromogenes* isoladas de acordo com a susceptibilidade *in vitro* aos antimicrobianos testados

Antibiótico	Sensível		Intermediário		Resistente		Total N
	absoluto	%	Absoluto	%	absoluto	%	
Azitromicina	1	50.00		0.00	1	50.00	2
Sulfametoxazol trimetopim	2	66.67		0.00	1	33.33	3
Ciprofloxacina	3	75.00		0.00	1	25.00	4
Norfloxacina	3	75.00		0.00	1	25.00	4
Enrofloxacin	3	75.00	1	25.00		0.00	4
Gentamicina	3	75.00	1	25.00		0.00	4
Amoxicilina / ac clavulâmico	4	100.00		0.00		0.00	4
Cefadroxil	4	100.00		0.00		0.00	4
Cefalexina	4	100.00		0.00		0.00	4
Doxiciclina	4	100.00		0.00		0.00	4
Oxacilina	4	100.00		0.00		0.00	4
Ceftriaxona	3	100.00		0.00		0.00	3
Ceftiofur	1	100.00		0.00		0.00	1
Neomicina	1	100.00		0.00		0.00	1
Nitrofurantoina	1	100.00		0.00		0.00	1
Tobramicina	1	100.00		0.00		0.00	1
Rifampicina	1	100.00		0.00		0.00	1

Gráfico 8 - Frequência das estirpes de *Staphylococcus chromogenes* isoladas de acordo com a susceptibilidade *in vitro* aos antimicrobianos testados

O *Staphylococcus pseudointermedius* foi isolado num total de 82 amostras das 118 testadas, foi avaliada também a susceptibilidade *in vitro* a diferentes antimicrobianos, os que apresentaram maior índice de resistência foram: eritromicina com (54,25%) em 59 amostras testadas, seguida por clindamicina com (40,00%) em 55 amostras e finalmente a norfloxacina com (35,00%) em 80 amostras avaliadas.

Para esta estirpe os antimicrobianos que apresentaram maior índice de sensibilidade foram: oxacilina com (85,90%) em 78 amostras, seguido por cefalexina com (84,15%) em 82 amostras, amoxacilina/ac clavulanico com (82,93%) em 82 amostras, cefadroxil com (81,69%) em 71 amostras, doxiciclina com (76,54%), em 81 amostras, e finalmente gentamicina com (75,61%) em 82 amostras avaliadas (Tabela 18 e Gráfica 9).

Tabela 18 - Frequência (em numero absoluto e percentagem) das estirpes de *Staphylococcus pseudointermedius* isoladas de acordo com a susceptibilidade *in vitro* aos antimicrobianos testados

Antibiotico	Sensível		Intermediario		Resistente		Total N
	absoluto	%	absoluto	%	absoluto	%	
Amoxicilina / ac clavulânico	68	82.93	0	0.00	14	17.07	82
Cefalexina	69	84.15	0	0.00	13	15.85	82
Enrofloxaci	57	69.51	2	2.44	23	28.05	82
Gentamicina	62	75.61	6	7.32	14	17.07	82
Doxiciclina	62	76.54	11	13.58	8	9.88	81
Norfloxacin	51	63.75	1	1.25	28	35.00	80
Ciprofloxacina	53	67.09	1	1.27	25	31.65	79
Oxacilina	67	85.90	0	0.00	11	14.10	78
Cloranfenicol	58	75.32	1	1.30	18	23.38	77
Neomicina	50	64.94	12	15.58	15	19.48	77
Cefadroxil	58	81.69	0	0.00	13	18.31	71
Eritromicina	27	45.76	0	0.00	32	54.24	59
Clindamicina	33	60.00	0	0.00	22	40.00	55
Cefovecin	30	78.95	0	0.00	8	21.05	38
Tobramicina	17	73.91	3	13.04	3	13.04	23
Ceftiofur	18	81.82	0	0.00	4	18.18	22
Ofloxacin	10	50.00	0	0.00	10	50.00	20
Tetraciclina	9	81.82	1	9.09	1	9.09	11
Azitromicina	4	50.00	0	0.00	4	50.00	8
Marbofloxacina	2	50.00	0	0.00	2	50.00	4
Rifampicina	4	100.00	0	0.00	0	0.00	4
Sulfametoxazol trimetropin	0	0.00	0	0.00	2	100.00	2
Levofloxacina	0	0.00	0	0.00	1	100.00	1
Ceftriaxona	1	100.00	0	0.00	0	0.00	1
Nitrofurantoina	1	100.00	0	0.00	0	0.00	1
Moxifloxacina	1	100.00	0	0.00	0	0.00	1

Gráfico 9 - Frequência das estirpes de *Staphylococcus pseudointermedius* isoladas, de acordo com a susceptibilidade *in vitro* aos antimicrobianos testados

O *Staphylococcus schleiferi* foi isolado numa amostra somente, foi avaliado também a susceptibilidade *in vitro* a diferentes antimicrobianos.

Os antimicrobianos que apresentaram maior índice de resistência foram: clindamicina, cloranfenicol, doxiciclina, enrofloxacin, eritromicina e norfloxacin com (100%) em uma amostra.

Os antimicrobianos que apresentaram maior índice de sensibilidade foram: amoxicilina/ ac clavulanico, cefadroxil, cefalexina, cefovecin, e oxacilina com (100%) em uma amostra testada (Tabela 19 e Gráfica 10).

Tabela 19 - Frequência (em número absoluto e porcentagem) das estirpes de *Staphylococcus schleiferi* isoladas de acordo com a susceptibilidade *in vitro* aos antimicrobianos testados

Antibiótico	Sensível		Intermediário		Resistente		Total N
	absoluto	%	absoluto	%	absoluto	%	
Clindamicina		0.00		0.00	1	100.00	1
Cloranfenicol		0.00		0.00	1	100.00	1
Doxiciclina		0.00		0.00	1	100.00	1
Enrofloxaci		0.00		0.00	1	100.00	1
Eritromicina		0.00		0.00	1	100.00	1
Norfloxacina		0.00		0.00	1	100.00	1
Amoxicilina / ac clavulânico	1	100.00		0.00		0.00	1
Cefadroxil	1	100.00		0.00		0.00	1
Cefalexina	1	100.00		0.00		0.00	1
Cefovecin	1	100.00		0.00		0.00	1
Oxacilina	1	100.00		0.00		0.00	1
Gentamicina		0.00	1	100.00		0.00	1

Gráfico 10 - Frequência das estirpes de *Staphylococcus schleiferi* isoladas de acordo com a susceptibilidade *in vitro* aos antimicrobianos testados

Bactérias identificadas como *Staphylococcus* spp. foram isoladas em 3 amostras. Neste caso foi avaliada também a susceptibilidade *in vitro* a diferentes antimicrobianos. As 3 amostras de *Staphylococcus* spp (não identificadas) foram

sensíveis para todos os antibióticos testados ceftriaxona, clindamicina, cloramfenicol, eritromicina, neomicina, sulfa trimetropin e tetraciclina cefadroxil e azitromicina, norfloxacin, gentamicina, enrofloxacin, doxicilina, ciprofloxacina, cefovecin, ceftiofour, cefalexina e amoxicilina + ac clavulamico

5.5 Avaliacao da susceptibilidade *in vitro* aos antimicrobianos testados em relacao ao tecido

Avaliou-se também o perfil de sensibilidade e resistência dos diferentes antimicrobianos (em numero absoluto e percentagem), usados nesta pesquisa, em relação ao tecido de origem da estirpe isolada.

A susceptibilidade *in vitro* de diversos antimicrobianos foi avaliada para as amostras de pele, os antimicrobianos que apresentaram maior índice de resistência foram: eritromicina com (53,33%) em 75 amostras testadas, seguido por clindamicina com (40,28%) em 72 amostras, e finalmente o cloranfenicol com (27,03%) em 74 amostras avaliadas.

Os antimicrobianos que apresentaram o maior índice de sensibilidade foram: oxacilina com (82,67%) em 75 amostras testadas, seguido por enrofloxacin e amoxicilina/ ac clavulanico com (80,00%) em 75 amostras respectivamente, doxicilina com (77,33%) em 75 amostras e finalmente gentamicina com (76,00%) em 75 amostras avaliadas (Tabela 20 e Gráfica 11).

Tabela 20 - Frequência (em numero absoluto e percentagem) de acordo com a susceptibilidade *in vitro* aos antimicrobianos testados em pele

Antibiotico	Sensível		Intermediário		Resistente		Total N
	absoluto	%	absoluto	%	absoluto	%	
Eritromicina	35	46.67		0.00	40	53.33	75
Gentamicina	57	76.00	4	5.33	14	18.67	75
Doxiciclina	58	77.33	7	9.33	10	13.33	75
Enrofloxaci	60	80.00	2	2.67	13	17.33	75
Amoxicilina / ac clavullânico	60	80.00		0.00	15	20.00	75
Cefalexina	61	81.33		0.00	14	18.67	75
Oxacilina	62	82.67	13	17.33	0	0.00	75
Cloranfenicol	53	71.62	1	1.35	20	27.03	74
Norfloxacina	56	75.68	1	1.35	17	22.97	74
Neomicina	50	68.49	11	15.07	12	16.44	73
Ciprofloxacina	56	76.71		0.00	17	23.29	73
Clindamicina	43	59.72		0.00	29	40.28	72
Cefadroxil	51	79.69		0.00	13	20.31	64
Cefovecin	37	80.43		0.00	9	19.57	46
Ceftiofur	16	84.21		0.00	3	15.79	19
Tetraciclina	10	76.92	1	7.69	2	15.38	13
Azitromicina	8	66.67		0.00	4	33.33	12
Marbofloxacina	3	50.00		0.00	3	50.00	6
Rifampicina	3	100.00		0.00		0.00	3

Gráfico 11 - Frequência de acordo com a susceptibilidade *in vitro* aos antimicrobianos testados em pele

A susceptibilidade *in vitro* de diversos antimicrobianos foi avaliada para as amostras provenientes de secreção otológica, os antimicrobianos que apresentaram maior índice de resistência foram: norfloxacin com (48%) em 25 amostras testadas, seguido por ofloxacin com (42,86%) em 21 amostras, enrofloxacin com (40,00%) em 25 amostras, e finalmente ciprofloxacina com (34,78%) em 23 amostras avaliadas.

Os antimicrobianos que apresentaram o maior índice de sensibilidade foram: amoxicilina/ac clavulanico e cefalexina com (96,00%) em 25 amostras respectivamente, seguido por oxacilina com (95,65%), cloranfenicol e doxiciclina com (79,17%) em 24 amostras, e finalmente gentamicina e tobramicina com (76,00%) em 25 amostras testadas respectivamente (Tabela 21 e Gráfica 12).

Tabela 21 - Frequência (em numero absoluto e percentagem) de acordo com a susceptibilidade *in vitro* aos antimicrobianos testados em amostras de secreção otológica

Antibiotico	Sensível		Intermediário		Resistente		Total N
	absoluto	%	absoluto	%	absoluto	%	
Norfloxacin	13	52.00	0	0.00	12	48.00	25
Enrofloxaci	15	60.00	0	0.00	10	40.00	25
Neomicina	18	72.00	2	8.00	5	20.00	25
Gentamicina	19	76.00	3	12.00	3	12.00	25
Tobramicina	19	76.00	3	12.00	3	12.00	25
Amoxacilina / ac clavulânico	24	96.00	0	0.00	1	4.00	25
Cefalexina	24	96.00	0	0.00	1	4.00	25
Cloranfenicol	19	79.17	0	0.00	5	20.83	24
Doxiciclina	19	79.17	5	20.83		0.00	24
Ciprofloxacina	14	60.87	1	4.35	8	34.78	23
Oxacilina	22	95.65	0	0.00	1	4.35	23
Ofloxacin	12	57.14	0	0.00	9	42.86	21
Cefadroxil	19	90.48	0	0.00	2	9.52	21
Ceftiofur	5	83.33	0	0.00	1	16.67	6
Cefovecin	2	66.67	0	0.00	1	33.33	3
Eritromicina	0	0.00	0	0.00	2	100.00	2

Gráfico 12 - Frequência de acordo com a susceptibilidade *in vitro* aos antimicrobianos testados em amostras de secreção otológica

A susceptibilidade *in vitro* de diversos antimicrobianos foi avaliada para as amostras provenientes de Urina, os antimicrobianos que apresentaram maior índice de resistência foram: sulfametoxazol trimetropin com (45,45) em 11 amostras testadas, seguido por ciprofloxacina com (25,00%) em 12 amostras, e finalmente norfloxacina com (16,67%) em 12 amostras avaliadas.

Os antimicrobianos que apresentaram o maior índice de sensibilidade foram: amoxicilina/ ac clavulanico e cefalexina com (100%) em 12 amostras testadas, seguido por cefadroxil e oxacilina com (100%) em 11 amostras avaliadas respectivamente (Tabela 22 e Gráfica 13).

Tabela 22 - Frequência (em numero absoluto e percentagem) de acordo com a susceptibilidade *in vitro* aos antimicrobianos testados em amostras de Urina

(continua)

Antibiotico	Sensível		Intermediário		Resistente		Total N
	absoluto	%	absoluto	%	absoluto	%	
Ciprofloxacina	9	75.00		0.00	3	25.00	12
Norfloxacina	10	83.33		0.00	2	16.67	12
Enrofloxacina	9	75.00	2	16.67	1	8.33	12
Gentamicina	9	75.00	2	16.67	1	8.33	12
Doxiciclina	11	91.67		0.00	1	8.33	12

(conclusão)

Antibiótico	Sensível		Intermediário		Resistente		Total N
	absoluto	%	absoluto	%	absoluto	%	
Amoxicilina / ac clavulânico	12	100.00	0.00	0.00	0	0.00	12
Cefalexina	12	100.00	0.00	0.00	0	0.00	12
Sulfametoxazol trimetropin	6	54.55	0.00	0.00	5	45.45	11
Cefadroxil	11	100.00	0.00	0.00	0	0.00	11
Oxacilina	11	100.00	0.00	0.00	0	0.00	11
Ceftriaxona	9	90.00	0.00	0.00	1	10.00	10
Azitromicina	6	75.00	0.00	0.00	2	25.00	8
Nitrofurantoina	4	100.00	0.00	0.00	0	0.00	4
Cefovecin	3	100.00	0.00	0.00	0	0.00	3
Rifampicina	3	100.00	0.00	0.00	0	0.00	3
Ceftiofur	2	100.00	0.00	0.00	0	0.00	2
Cloranfenicol	1	100.00	0.00	0.00	0	0.00	1
Tetraciclina	1	100.00	0.00	0.00	0	0.00	1

Gráfico 13 - Frequência de acordo com a susceptibilidade *in vitro* aos antimicrobianos testados em amostras de Urina

A susceptibilidade *in vitro* de diversos antimicrobianos foi avaliada para as amostras provenientes de tecido vulvar, os antimicrobianos que apresentaram maior índice de resistência foram: amoxicilina/ac clavulanico, cefadroxil, cefalexina,

ciprofloxacina, enrofloxacin, gentamicina, norfloxacina e oxacilina com (50,00%) em duas amostras avaliadas.

Os antimicrobianos que apresentaram o maior índice de sensibilidade foram: clindamicina, doxiciclina e eritromicina com (100%) em 2 amostras testadas respectivamente (Tabela 23 e Gráfica 14).

Tabela 23 - Frequência (em numero absoluto e percentagem) de acordo com a susceptibilidade *in vitro* aos antimicrobianos testados em amostras de tecido vulvar

Antibiotico	Sensível		Resistente		Total N
	absoluto	%	absoluto	%	
Amoxacilina / ac clavulânico	1	50.00	1	50.00	2
Cefadroxil	1	50.00	1	50.00	2
Cefalexina	1	50.00	1	50.00	2
Ciprofloxacina	1	50.00	1	50.00	2
Enrofloxaci	1	50.00	1	50.00	2
Gentamicina	1	50.00	1	50.00	2
Norfloxacina	1	50.00	1	50.00	2
Oxacilina	1	50.00	1	50.00	2
Clindamicina	2	100.00	0	0.00	2
Doxiciclina	2	100.00	0	0.00	2
Eritromicina	2	100.00	0	0.00	2
Cefovecin	0	0.00	1	100.00	1
Azitromicina	1	100.00	0	0.00	1
Neomicina	1	100.00	0	0.00	1

Gráfico 14 - Frequência de acordo com a susceptibilidade *in vitro* aos antimicrobianos testados em amostras de tecido vulvar

A susceptibilidade *in vitro* de diversos antimicrobianos foi avaliada para as amostras provenientes de fragmento de Bexiga, todos os antimicrobianos testados, exceto rifampicina apresentaram (100%) de resistência em uma amostra testada (Tabela 24 e Gráfico 15).

Tabela 24 - Frequência (em numero absoluto e porcentagem) de acordo com a susceptibilidade *in vitro* aos antimicrobianos testados em amostras de fragmento de bexiga

Antibiótico	Sensível		Resistente		Total N
	absoluto	%	absoluto	%	
Amoxicilina / ac clavulâmico		0.00	1	100.00	1
Azitromicina		0.00	1	100.00	1
Cefadroxil		0.00	1	100.00	1
Cefalexina		0.00	1	100.00	1
Cefovecin		0.00	1	100.00	1
Ciprofloxacina		0.00	1	100.00	1
Ceftriaxona		0.00	1	100.00	1
Clindamicina		0.00	1	100.00	1
Doxiciclina		0.00	1	100.00	1
Enrofloxaci		0.00	1	100.00	1
Eritromicina		0.00	1	100.00	1
Gentamicina		0.00	1	100.00	1
Norfloxacina		0.00	1	100.00	1
Oxacilina		0.00	1	100.00	1
Sulfametoxazol trimetropin		0.00	1	100.00	1
Rifampicina	1	100.00		0.00	1

Gráfico 15 - Frequência de acordo com a susceptibilidade *in vitro* aos antimicrobianos testados em amostras de fragmento de bexiga

A susceptibilidade *in vitro* de diversos antimicrobianos foi avaliada para as amostras provenientes de fragmento torácico, os antimicrobianos que apresentaram maior índice de resistência foram: ciprofloxacina, clindamicina, enrofloxacin, gentamicina, norfloxacina e tetraciclina com (100%) em uma amostra testada respectivamente.

Os antimicrobianos que apresentaram o maior índice de sensibilidade foram: amoxicilina / ac clavulâmico, cefadroxil, cefalexina, ceftriaxona, doxiciclina, eritromicina e oxacilina com (100%) em uma amostra avaliada respectivamente (Tabela 25 e Gráfica 16).

Tabela 25 - Frequência (em numero absoluto e percentagem) de acordo com a susceptibilidade *in vitro* aos antimicrobianos testados em amostras de fragmento torácico

Antibiotico	Sensível		Resistente		Total N
	absoluto	%	absoluto	%	
Ciprofloxacina		0.00	1	100.00	1
Clindamicina		0.00	1	100.00	1
Enrofloxaci		0.00	1	100.00	1
Gentamicina		0.00	1	100.00	1
Norfloxacina		0.00	1	100.00	1
Tetraciclina		0.00	1	100.00	1
Amoxicilina / ac	1	100.00		0.00	1
clavulâmico					
Cefadroxil	1	100.00		0.00	1
Cefalexina	1	100.00		0.00	1
Ceftriaxona	1	100.00		0.00	1
Doxiciclina	1	100.00		0.00	1
Eritromicina	1	100.00		0.00	1
Oxacilina	1	100.00		0.00	1

Gráfico 16 Frequência de acordo com a susceptibilidade *in vitro* aos antimicrobianos testados em amostras de fragmento torácico

A susceptibilidade *in vitro* de diversos antimicrobianos foi avaliada para as amostras provenientes de secreção nasal, os antimicrobianos que apresentaram o maior índice de resistência foram: clindamicina, eritromicina e neomicina com (100%) em uma amostra testada.

Os antimicrobianos que apresentaram o maior índice de sensibilidade foram: amoxicilina/ac clavulanico, cefadroxil, cefalexina ciprofloxacina, c, enrofloxacina, gentamicina, norfloxacina e oxacilina com (100%) em uma amostra avaliada respectivamente.

A doxiciclina apresentou susceptibilidade Intermedia em uma amostra testada (Tabela 26 e Gráfico 17).

Tabela 26 - Frequência (em numero absoluto e porcentagem) de acordo com a susceptibilidade *in vitro* aos antimicrobianos testados em amostras de secreção nasal

Antibiótico	Sensível		Intermediário		Resistente		Total N
	absoluto	%	absoluto	%	absoluto	%	
Clindamicina		0.00		0.00	1	100.00	1
Eritromicina		0.00		0.00	1	100.00	1
Neomicina		0.00		0.00	1	100.00	1
Amoxicilina / ac clavulânico	1	100.00		0.00		0.00	1
Cefadroxil	1	100.00		0.00		0.00	1
Cefalexina	1	100.00		0.00		0.00	1
Ciprofloxacina	1	100.00		0.00		0.00	1
cloranfenicol	1	100.00		0.00		0.00	1
Enrofloxaci	1	100.00		0.00		0.00	1
Gentamicina	1	100.00		0.00		0.00	1
Norfloxacina	1	100.00		0.00		0.00	1
Oxacilina	1	100.00		0.00		0.00	1
Rifampicina	1	100.00		0.00		0.00	1
Doxiciclina		0.00	1	100.00		0.00	1

Gráfico 17 - Frequência de acordo com a susceptibilidade *in vitro* aos antimicrobianos testados em amostras de secreção nasal

A susceptibilidade *in vitro* de diversos antimicrobianos foi avaliada para as amostras provenientes de secreção ocular, os antimicrobianos que apresentaram maior índice de resistência foram: amoxicilina / ac clavulânico, cefadroxil, cefalexina, ciprofloxacina, doxiciclina, enrofloxacin, ofloxacina, norfloxacina e levofloxacina com (100%) em uma amostra testada respectivamente.

Os antimicrobianos que apresentaram maior índice de sensibilidade foram: gentamicina, tobramicina e moxifloxacina com (100%) em uma amostra avaliada respectivamente (Tabela 27 e Gráfico 18).

Tabela 27 - Frequência (em número absoluto e porcentagem) de acordo com a susceptibilidade in vitro aos antimicrobianos testados em amostras de secreção ocular

Antibiótico	Sensível		Resistente		Total N
	absoluto	%	absoluto	%	
Amoxicilina / ac clavulânico	0	0.00	1	100.00	1
Cefadroxil	0	0.00	1	100.00	1
Cefalexina	0	0.00	1	100.00	1
Ciprofloxacina	0	0.00	1	100.00	1
Doxiciclina	0	0.00	1	100.00	1
Enrofloxaci	0	0.00	1	100.00	1
Ofloxacin	0	0.00	1	100.00	1
Norfloxacina	0	0.00	1	100.00	1
Levofloxacina	0	0.00	1	100.00	1
Gentamicina	1	100.00	0	0.00	1
Tobramicina	1	100.00	0	0.00	1
Moxifloxacina	1	100.00	0	0.00	1

Gráfico 18 - Frequência de acordo com a susceptibilidade in vitro aos antimicrobianos testados em amostras de secreção ocular

Em relação aos tecidos recebidos para o isolamento das estirpes de *Staphylococcus* spp. Que representaram o maior número de amostras (pele, secreção de ouvido e urina), foi realizado o teste de *Kruskal Wallis* para comparar se

existia diferença estatística significativa na avaliação dos antibiogramas ($p < 0,05$); nos outros tecidos não foi aplicado o teste estatístico pois o tamanho da amostra era muito pequeno. Nos resultados deste teste a **Amoxicilina + Acido Clavulâmico ($p = 0,047$) e Norfloxacin ($p = 0,044$) são significativos**, posteriormente estes antibióticos foram submetidos para o teste de **Dunn Post- Roc** para tentar descobrir onde estava a diferença, encontrando-se que não foi encontrada uma diferença significativa.

Além disto, também foi realizado o teste de *Kruskal Wallis* para comparar se existia diferença estática significativa na avaliação dos antibiogramas em relação a estirpe isolada, mais os resultados não foram significativos (Tabela 28).

Tabela 28 - Test de Kruskal Wallis para pele, urina, sec_otologica, em relação a tecido isolado e bactéria isolada

Test Kruskal Wallis	tecido isolado		bacteria isolada	
	p valor	p valor ajustado	p valor	p valor ajustado
Amoxicilina / ac clavulâmico	0,326	0,047	0,953	0,633
Azitromicina	0,758	0,698	0,510	0,266
Cefadroxil	0,485	0,161	0,947	0,647
Cefalexina	0,384	0,064	0,957	0,621
Ceftiofur	0,933	0,833	0,942	0,795
Cefovecin	0,777	0,583	0,886	0,709
Ciprofloxacina	0,562	0,377	0,589	0,247
Ceftriaxona			0,965	0,801
Clindamicina			0,804	0,689
Cloranfenicol	0,782	0,656	0,689	0,424
Doxiciclina	0,729	0,531	0,585	0,153
Enrofloxacin	0,274	0,102	0,580	0,216
Eritromicina	0,262	0,194	0,556	0,400
Gentamicina	0,990	0,983	0,903	0,690
Marbofloxacina			1	1
Neomicina	0,893	0,868	0,657	0,449
Nitrofurantoina			1	1
Ofloxacina			0,281	0,209
Norfloxacin	0,146	0,044	0,304	0,071
Oxacilina	0,477	0,110	0,959	0,609
Sulfametoxazol trimetropin			0,500	0,368
Tetraciclina	0,710	0,604	0,855	0,738
Tobramicina			0,753	0,602
Rifampicina	1	1	1	1
Levofloxacina				
Moxifloxacina				

* só pele, urina, sec_otologica.

5.6 Pesquisa de genes codificadores de adesinas e biofilme em estirpes de *staphylococcus* spp. isoladas em amostras clinicas de caes e gatos

Em relação aos 118 isolados de *Staphylococcus* spp. (SCP - SCN), os resultados obtidos para detecção de genes codificadores de adesinas e formador de biofilme foram: 0,847% (N=1) amostras positivas para o gene *Cna*, 89,83% (N=106) amostras positivas para o gene *Eno*, 0,847% (N=1) amostra positiva para o gene *Fib*, 0,847% (N=1) amostra positiva para o gene *Fnba*, e 0,847 (N=1) amostra positiva para o gene *Fnbb*.

Em nenhuma das amostras foi detectado a presença dos genes *Bap*, e o gene *EbpS* (Tabela 29 e Gráfico 19).

Tabela 29 - Frequência geral (em numero absoluto e percentagem) dos genes codificadores de adesinas e formador de biofilme das diferentes estirpes de *Staphylococcus* spp. isoladas neste estudo

Genes	Positivos		Negativos	
	absoluto	%	Absoluto	%
Bap	0	0	118	100
Cna	1	0.847	117	99.15
EbpS	0	0	118	100
Eno	106	89.83	12	10.17
Fib	1	0.847	117	99.15
Fnba	1	0.847	117	99.15
Fnbb	1	0.847	117	99.15

Gráfico 19 - Frequência geral dos genes codificadores de adesinas e formador de biofilme das diferentes estirpes de *Staphylococcus* spp. isoladas neste estudo

Na próxima tabela, verificamos a frequência geral das 118 amostras avaliadas (em numero absoluto e percentagem), com relação à detecção dos genes codificadores de adesinas e formador de biofilme em cães e gatos.

Para os caninos a percentagem da detecção de genes codificadores de adesinas e formador de biofilme foi: para o gene *Fnbb* (0,9%) 1 amostra positiva, *Fib* (0,9%) 1 amostra positiva, *Fnba* (0,9%) 1 amostra positiva, e finalmente o gene *Eno* com (91,9%) 102 amostras positivas para cães.

Para os felinos a percentagem da detecção de genes codificadores de adesinas e formador de biofilme foi: Para o gene *Cna* (14,3%) 1 amostra positiva, e (57,1%) com 4 amostras positivas para o gene *Eno*.

A totalidade da percentagem da detecção do gene *Eno* para as duas espécies foi: (89,8%) em 106 amostras positivas (102 amostras para cães) e (4 amostras para felinos) (Tabela 30).

Tabela 30 - Frequência dos genes codificadores para adesinas (em numero absoluto e percentagem), em relação à espécie (cães – gatos)

Gen	Caninos				Felinos				Total			
	Positivos		Negativos		Positivos		Negativos		Positivos		Negativos	
	Absoluto	%	absoluto	%	Absoluto	%	absoluto	%	Absoluto	%	Absoluto	%
Cna	0	0	111	100	1	14,3	6	85,7	1	0,8	117	99,2
EbpS	0	0	111	100	0	0	7	100	0	0	118	100
Fnbb	1	0,9	110	99,1	0	0	7	100	1	0,8	117	99,2
Fib	1	0,9	110	99,1	0	0	7	100	1	0,8	117	99,2
Bap	0	0	111	100	0	0	7	100	0	0	118	100
Fnba	1	0,9	110	99,1	0	0	7	100	1	0,8	117	99,2
Eno	102	91,9	9	8,1	4	57,1	3	42,9	106	89,8	12	10,2

Em relação aos genes codificadores de adesinas e formador de biofilme detectados nas diferentes estirpes de *Staphylococcus* spp. Isoladas das 110 amostras de cães e gatos que foram positivas para algum dos genes pesquisados, foi constatada a percentagem da frequência destes, obtendo os seguintes resultados: Para o *Staphylococcus pseudointermedius* foram detectados os genes:

Fnb em (0,85%) 1 amostra positiva, e o gene *Eno* em (65,3%) em 77 amostras, para um total de (66,1%) em 78 amostras para esta estirpe. Para o *Staphylococcus epidermidis* foi detectado o gene *Eno* (11,9%) num total de 14 amostras desta estirpe, para o *Staphylococcus xylosus* foi detectado o gene *Eno* (5,08%) em 6 amostras desta estirpe. Para o *Staphylococcus Chromogenes* foi detectado o gene *Eno* (3,39%) em 4 amostras desta estirpe. Para o *Staphylococcus aureus* foram detectados os genes *Eno* (1,69%) em duas amostras, o gene *Fnb* (0,85%) em 1 amostra, e o gene *Fib* (0,85%) em 1 amostra. Para o *Staphylococcus* spp. Foram detectados os genes *Eno* (1,69%) em duas amostras, e o gen *Cna* (0,85%) 1 amostra. Para o *Staphylococcus schleiferi* foi detectado o gen *Eno* (0,85%) em 1 amostra (tabela 31) (Gráficos 20 e 21).

Gráfico 20 - Frequência (percentagem) Genes codificadores de adesinas em relação a espécie de *Staphylococcus* spp., isolada

Gráfico 21 - Frequência (valores absolutos) Genes codificadores de adesinas em relação a espécie de *Staphylococcus* spp., isolada

Tabela 31 - Frequência dos genes codificadores de adesinas e formador de biofilme detectados nas diferentes estirpes de *Staphylococcus* spp. Isoladas de cães e gatos

Estirpe	Cna (%)		Ebp (%)		Fnbb (%)		Fib (%)		Bap (%)		Fnba (%)		Eno (%)		total	%
<i>Staphylococcus pseudintermedius</i>	0		0		1	0.85	0		0		0		77	65.3	78	66.1
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	0		0		0		0		0		0		14	11.9	14	11.9
<i>Staphylococcus xylosus</i>	0		0		0		0		0		0		6	5.08	6	5.08
<i>Staphylococcus chromogenes</i>	0		0		0		0		0		0		4	3.39	4	3.39
<i>Staphylococcus aureus</i>	0		0		0		1	0.85	0		1	0.85	2	1.69	4	3.39
<i>Staphylococcus spp</i>	1	0.85	0		0		0		0		0		2	1.69	3	2.54
<i>Staphylococcus schleiferi</i>	0		0		0		0		0		0		1	0.85	1	0.85
Total	1	0.85	0		1	0.85	1	0.85	0		1	0.85	106	89.8	110	93.2

Tabela 32 - Frequência dos genes codificadores de adesinas e formador de biofilme em relação ao tecido que deu origem ao isolamento das diferentes estirpes de *Staphylococcus* spp

Tecido	Cna (%)		Ebp (%)		Fnbb (%)		Fib (%)		Bap (%)		Fnba (%)		Eno (%)		Total (%)	
Pele	0		0		1	0.85	1	0.85	0		1	0.85	67	56.8	70	59.3
Secreção otológica	0		0		0		0		0		0		23	19.5	23	19.5
Urina	1	0.85	0		0		0		0		0		10	8.47	11	9.32
Secreção vulvar	0		0		0		0		0		0		2	1.69	2	1.69
Fragmento de bexiga	0		0		0		0		0		0		1	0.85	1	0.85
Fragmento de tubo torácico	0		0		0		0		0		0		1	0.85	1	0.85
Secreção nasal	0		0		0		0		0		0		1	0.85	1	0.85
Secreção ocular	0		0		0		0		0		0		1	0.85	1	0.85
Total	1	0.85	0		1	0.85	1	0.85	0		1	0.85	106	89.8	110	93.2

Avaliou-se também a presença dos genes codificadores de adesinas e formador de biofilme em relação ao tecido que deu origem ao isolamento das diferentes estirpes de *Staphylococcus* spp.

Dentre os genes detectados em amostras de pele, os resultados foram: os genes *Fnba*, *Fnbb*, *Fib* foram reportados em (0,85%), em 1 amostra para cada gene respectivamente, o gen *Eno* teve uma frequência (56.8%) em 67 amostras, para um total de 70 amostras (59.3%). Nas amostras de secreção otológica foi detectado o gene *Eno* em (19,5%) em 23 amostras. Nas amostras de Urina foram detectados os gene *Cna* (0,85%) em 1 amostra, e o gene *Eno* (8,47%) em 10 amostras. Nas amostras de secreção vulvar foi detectado o gene *Eno* (1.69%) em 2 amostras. Nas amostras de Fragmento de bexiga Fragmento de tubo torácico, Secreção nasal e Secreção ocular foi detectado o gene *Eno* em (0.85%) em 1 amostra para cada material respectivamente (Tabela 32 e Gráfico 22 e 23).

Gráfico 22 - Frequência (%) Genes codificadores de adesinas em relação ao tecido isolado

Gráfico 23 - Frequência (Valor absoluto) Genes codificadores de adesinas em relação ao tecido isolado

6 DISCUSSÃO

6.1 Frequencia de ocorrencia dos patógenos

No presente estudo os SCP foram isolados em maior frequência (N=84), quando comparados com a frequência dos SCN (N=31), em relação ao total das amostras testadas e identificadas (N=115). Sendo estes resultados semelhantes aos reportados por outros autores (MAY; KINYON; NOXON, 2012) Dentre os SCP houve crescimento de duas estirpes sendo: o *S. aureus* com 2 (2,38%) em relação aos SCP, e (1,74%) em relação ao total das amostras, e o *S. pseudointermedius* com 82 (97,62%) em relação aos SCP, e (71,30%) em relação ao total das amostras testadas e identificadas (tabela 7). Tais valores se assemelham aos reportados por Barbosa (2009), num estudo feito na Universidade Federal do Paraná, na qual avaliaram o padrão de susceptibilidade aos antimicrobianos isolados de 100 cães de abrigos acometidos por piodermite, nessa pesquisa, assim como no presente trabalho, o *S aureus* foi identificado somente em duas amostras de pele (2,15%), estando estes achados de acordo com (PETON; LE LOIR, 2014) o qual cita que animais de estimação como cães, são mais susceptíveis a colonização pelos SCP, principalmente o *S. pseudointermedius*, e em menor medida pelo o *S. aureus*. Embora a colonização pelo o *S aureus* em cães sadios tem sido reportada, a prevalência parece ser muito menor quando comparada a prevalência do *S. pseudointermedius* (CAIN, 2013). De novo no Brasil, Mendes (2011), declarou que numa pesquisa feita na Universidade Federal Fluminense com 72 amostras provenientes de cães afetados por piodermite, foram isolados membros do gênero *Staphylococcus*, principalmente SCP, sendo apenas 5 cepas identificadas como *S. aureus*. Um resultado aproximado foi descrito no Japão por (SASAKI et al., 2007), no qual testaram 57 amostras de cães, e conseguiram isolar o *S. aureus* em 5 animais (8,8%). O *S aureus* tem sido relacionado tradicionalmente com diferentes doenças em humanos, em cães é considerado um habitante transitório, e acreditasse que este envolvido em menos de 5% dos casos de infecções da pele em pequenos animais (HUERTA et al., 2011). Contudo o potencial zoonotico desta espécie deve

ser tomado em conta, já que o número de cães, gatos e cavalos acometidos pelo *S. aureus* em anos recentes parece estar em aumento, e sua detecção pode estar relacionada ao contato com seres humanos (O'MAHONY et al., 2005; CLARKE, 2006; MAY, 2006; HANSELMAN; KRUTH; WEESE, 2008; MORGAN, 2008; WEESE; VAN DUIJKEREN, 2010; GÓMEZ-SANZ et al., 2011; WEISS et al., 2013).

A elevada frequência de isolamento do *S. pseudointermedius* no presente trabalho ratifica os reportes feitos por inúmeros pesquisadores dentro e fora do Brasil. De fato o 90% dos cães sadios frequentemente carregam o *S. pseudointermedius* como parte de sua microbiota normal (EPSTEIN et al., 2009; RUBIN; CHIRINO-TREJO, 2011). Além disso, deve lembrar-se que as bactérias do gênero *Staphylococcus* representam os mais importantes e mundialmente reconhecidos patógenos em infecções em animais e seres humanos (ZUBEIR et al., 2007). O *Staphylococcus pseudointermedius* é o SCP mais prevalente, isolado em cães e gatos, com infecções clínicas da pele, ouvido e urina principalmente (LILENBAUM; NUNES; AZEREDO, 1999; VENGUST et al., 2006; HAUSCHILD; WÓJCIK, 2007; FITZGERALD, 2009; VANNI et al., 2009; PERRETEN et al., 2010; GÓMEZ-SANZ et al., 2011; LOEFFLER et al., 2011; VAN DUIJKEREN et al., 2011; MAY; KINYON; NOXON, 2012; CAIN, 2013; GUARDABASSI et al., 2013; WEDLEY et al., 2014; HAENNI et al., 2014).

No presente estudo o *S. pseudointermedius* foi isolado em sua maioria em amostras de pele, 54 (45,8%), e amostras de secreção otológica 22 (18,6%). Huerta et al. (2011), Na Córdoba-Espanha submeteram a um estudo 74 cães os quais foram divididos em três grupos, 1) 23 sadios, 2) 24 animais com pioderma, e 3) 24 cães com piodermite recorrente, isolando o *S. pseudointermedius* em 79% das amostras, obtendo eles uma frequência ainda maior de identificação deste agente do que o encontrado na presente pesquisa (71,30%). Vanni et al. (2009), num estudo feito na Itália determinaram que dos 194 isolados, provenientes de cães, 114 (58,7%) eram *S. pseudointermedius*, destes, a maioria foram obtidos de animais com piodermite e otite. Um resultado ainda maior foi o relatado por Rota et al. (2011), o qual num outro estudo feito também na Itália, em cadelas reprodutoras, demonstrou que dentre os SCP identificados, o *S. pseudointermedius* apresentou uma frequência de 100% para isolados de amostras de vagina, leite e filhotes mortos. Por outro lado pesquisadores no Canada analisaram 175 amostras provenientes de cães sadios,

dos quais isolaram 153 cepas de *S. pseudointermedius* (87,4%) de “swabs” da mucosa nasal, faríngea e retal (RUBIN; CHIRINO-TREJO, 2011). Também Kawakami et al. (2010), reportaram no Japão, uma percentagem de ocorrência de (89,5%) do *S. pseudointermedius* em cães acometidos por piodermite, comprovando mais uma vez a relevância desta espécie bacteriana como o principal agente associado a infecções da pele incluindo a piodermite. Retomando os trabalhos feitos no Brasil, foi realizado um estudo na Universidade Federal Fluminense por (LILENBAUM; ESTEVES; SOUZA, 1999), processando 150 amostras provenientes de saliva em gatos saudáveis, eles identificaram o *S. pseudointermedius* em 30 gatos, representando o (28,8%), das cepas obtidas. Demonstrando a importância da ocorrência das estirpes do *S. pseudointermedius*, na microflora oral de gatos, por conseguinte uma lesão ou ferida feita pela mordedura de um destes animais poderia ser uma fonte de infecção para os seres humanos.

Em referência com a frequência de ocorrência das estirpes de *Staphylococcus* Coagulase Negativos (SCN) (N=31), houve crescimento de 4 estirpes sendo: o *S. chromogenes* com 4 (12,9%) em relação aos SCN, e (3,48%) com relação ao total das amostras testadas e identificadas (N=115), o *S. epidermidis* com 19 (61,29%) em relação aos SCN, e (16,52%) com relação ao total das amostras, o *S. xylosus* com 7 (22,58%) em relação aos SCN, e (6,09%) em relação ao total das amostras, e finalmente o *S. schleiferi* subsp. *schleiferi* com 1 (3,23%) em relação aos SCN, e (0,87%) para o total das amostras identificadas (Tabela 6).

Historicamente os SCP têm sido considerados patógenos oportunistas, entretanto os SCN foram classificados como não patogênicos. Não obstante esta visão está mudando particularmente pela evidência crescente da participação de alguns membros dos SCN em infecções nosocomiais em seres humanos e animais (VENGUST et al., 2006; IRLINGER, 2008; PODKOWIK et al., 2013) Os SCN são encontrados reiteradamente na pele e membranas mucosas de mamíferos, e constituem uma das causas mais frequentes de infecções associadas principalmente com pacientes imunocomprometidos ou com a implantação de dispositivos médicos. O 70% das cepas que circulam no ambiente hospitalar humano são identificadas como *Staphylococcus epidermidis*. (KERN; PERRETEN, 2013). Apesar disso, são escassos os trabalhos que tratam do isolamento dos membros dos SCN em animais de estimação. Contudo estes agentes estão constantemente implicados na

apresentação de mastites bovina, caprina e ovina, dentre estes SCN os que são reportados com um índice elevado de ocorrência são: o *S. epidermidis*, *S. chromogenes* e o *S. xylosus* (THORBERG et al., 2006; NUNES et al., 2007; ONNI et al., 2011; SALABERRY, 2014). Mesmo assim a frequência de isolamento dos SCN principalmente o *S. epidermidis*, no presente trabalho, sugere um papel notável destes micro-organismos na etiologia de diversas infecções em pequenos animais.

Na presente pesquisa identificou-se o *S. epidermidis* em 17 (14,4%), amostras provenientes de pele e 2 (1,69%) amostras de secreção otológica. Dentre os SCN foi o microrganismo com a maior frequência de isolamento, este evento coincide com os dados reportados na literatura em humanos, na qual afirmasse que o *S. epidermidis*, é o membro mais comumente isolado do grupo dos SCN (VUONG; OTTO, 2002). Já na medicina veterinária, num estudo feito na Universidade de Louisiana nos Estados Unidos em cães com otite media encontrou-se o *S. epidermidis* entre os cinco agentes bacterianos isolados com maior frequência (COLOMBINI; MERCHANT; HOSGOOD, 2000), sendo nesta investigação a segunda espécie com maior apresentação de isolamento.

É importante apontar que contrario a estudos anteriores (MENDES, 2011), e conforme com (MAY; KINYON; NOXON, 2012), neste trabalho o *S. schleiferi*, não foi o agente mais isolado em amostras de pele e otite, dentre o grupo dos SCN.

6.2 Avaliação da susceptibilidade *in vitro* das estirpes de *staphylococcus* spp., isoladas frente a diferentes antimicrobianos

O impacto gerado pela resistência antibacteriana nas ultimas décadas pode ser identificado em todas as áreas de assistência medica em seres humanos e animais. Na medicina veterinária existem implicações econômicas e da saúde publica se os tratamentos tornarem-se ineficazes, principalmente porque acreditasse que o uso de antimicrobianos em animais pode ser um fator importante no desenvolvimento de microrganismos resistentes em seres humanos (UMBER; BENDER, 2009). Da mesma forma, na prática medica em animais de estimação é

determinante fazer uma prescrição de antimicrobianos responsável, a qual tem que fazer parte de uma estratégia unificada para minimizar infecções bacterianas multirresistentes (BATTERSBY, 2014; KROEMER et al., 2014). Torna se isto relevante em cães com piodermite e otite em especial, já que os isolados de *Staphylococcus* resistentes neste tipo de infecções são cada vez mais comuns (CAIN, 2013).

Para o geral das estirpes de *Staphylococcus spp* avaliadas nesta pesquisa obteve-se a maior taxa de resistência antimicrobiana para a eritromicina com (54,32%) em 81 amostras testadas, seguido por clindamicina com (40,79) em 76 amostras testadas, norfloxacin com (29,91%) em 117 amostras testadas, ciprofloxacina, com (28,07%) em 114 amostras testadas, o cloranfenicol com (25,00%) em 100 amostras, e a enrofloxacin com (23,73%) em 118 amostras. No concernente aos macrolídeos e as lincosaminas, a eritromicina apresentou um índice menor ao relatado por (MENDES, 2011), o qual reportou uma percentagem de resistência de (62,5%) a este antimicrobiano em cães que apresentavam piodermite, e de (63,9%) para clindamicina. Nos Estados Unidos (HAUSCHILD; WÓJCIK, 2007), mencionaram uma frequência de resistência de (41%) e (31%) para eritromicina e clindamicina respectivamente em cães com dermatite. Estes antimicrobianos são usados frequentemente como primeira opção junto com antimicrobianos do grupo das fluoroquinolonas (norfloxacin, ciprofloxacina e enrofloxacin), nos casos de piodermite, além disso, (MENDES, 2011), encontrou uma percentagem de resistência de (25%) para enrofloxacin, (26,4%) para a norfloxacin e (27,8%) para ciprofloxacina, sendo estes resultados muito próximos ao encontrado no presente trabalho. Dentre o grupo dos fenícois, o cloranfenicol mostrou na mesma pesquisa um resultado de resistência de (16,7%), resultado aproximado ao referido por (VANNI et al., 2009) o qual foi de (14,9%), os dois resultados foram menores ao encontrado neste trabalho. Contudo é importante mencionar que existem efeitos adversos relacionados com a administração parenteral de cloranfenicol, como supressão da medula óssea, a qual os gatos são mais susceptíveis, já em cães, os efeitos mais comuns são transtornos digestivos, inapetência e perda de peso (CAIN, 2013). A eritromicina é o medicamento mais usado nos casos de infecções estafilocócicas devido a sua boa absorção oral, e excelente penetração, sem embargo existem muitas referências que relacionam a apresentação de resistência

cruzada entre a eritromicina e a clindamicina, o qual limita o uso destes agentes no tratamento destas infecções (MAY, 2006; HUERTA et al., 2011). Regressando ao Trabalho feito Por (BARBOSA, 2009), Na Universidade Federal do Paraná em cães de abrigo, esta pesquisadora reportou um percentagem de resistência de (37,25%), para a eritromicina, sendo um resultado menor ao encontrado neste projeto. No trabalho de (HUERTA et al., 2011), a eritromicina e a clindamicina estiveram dentro os cinco agentes antimicrobianos com maior percentagem de resistência antimicrobiana, com (35,2%), e (28,6%) respectivamente, esta frequência de resistência foi similar dentre os grupos de animais 1) sadios, 2) com piodermite, e 3) com piodermite recorrente. Além disto, este pesquisador cita que a aquisição de resistência as fluoroquinolonas (norfloxacin, ciprofloxacina e enrofloxacin), tem sido descrita por inúmeros pesquisadores para o tratamento de cães com piodermite, sendo aconselhável realizar sempre um estudo de susceptibilidade *in vitro* aos diferentes antimicrobianos em animais com infecções como piodermite, otite e infecção urinária.

Dentre o grupo das penicilinas a oxacilina teve o maior índice de susceptibilidade, este antimicrobiano foi tomado como um marcador confiável para testar estirpes resistentes a meticilina (MRS), já que existem diversos reportes recentes os quais afirmam que cepas resistentes a meticilina são cada vez mais comuns em todo o mundo em animais de estimação, particularmente relacionados com infecções como piodermite, otite e infecções do trato urinário (CLARKE, 2006; WEESE et al., 2006; VAN DUIJKEREN et al., 2011; CAIN, 2013). Os MRS são cepas que requerem de muita atenção devido a sua capacidade de ser resistente a vários grupos de antimicrobianos, o qual faz que estas estirpes sejam implicadas em infecções nosocomiais graves, representando um alto risco para a saúde pública (CLARKE, 2006; EPSTEIN et al., 2009). A resistência apresentada por este agente foi de (14,04%) em 114 amostras testadas, e a susceptibilidade de (85,96%). Contudo foi o antimicrobiano que mostro um maior índice de efetividade *in vitro*, não obstante nenhuma das estirpes isoladas neste projeto foram testadas para a presença do gene *mecA*, sendo este o gene que confere resistência a meticilina, sendo considerada a detecção por PCR do gene *mecA* a prova “padrão ouro” para determinar a metilino resistência (SOLOAGA et al., 2004; VAN DUIJKEREN et al., 2011). Mas acredito como afirma (RUBIN; CHIRINO-TREJO, 2011), que a

sensibilidade para a detecção de resistência a meticilina testando a susceptibilidade a oxacilina confere um 97% de sensibilidade, o qual é suficiente para a presente investigação.

A cefalexina foi o segundo antimicrobiano em apresentar o índice de susceptibilidade mais alto com (84,75%) em 118 amostras testadas, seguido pela amoxicilina/ac clavulâmico com (83,90%) em 118 amostras. Dentre as cefalosporinas o cefadroxil teve o (82,35%) de sensibilidade em 102 amostras, e finalmente as tetracilinas representadas pela doxiciclina com (77,78%) em 117 amostras testadas. Estes achados são compatíveis com o sugerido por (VANNI et al., 2009; HUERTA et al., 2011), os quais citam que as cefalosporinas, e a amoxicilina/ac clavulâmico são boas opções para o tratamento da piodermite canina, sem embargo o uso destes agentes em piodermite crônica ou recorrente diminui sua efetividade, apresentando altas taxas de resistência. A cefalexina é um dos antimicrobianos mais utilizados em dermatologia veterinária, a resistência a ela tem sido pouco descrita, já para o caso das tetracilinas como a doxiciclina este agente não tem sido recomendado para o uso no tratamento de piodermite em cães (MENDES, 2011).

Para os SCP, os antimicrobianos que exibiram os maiores índices de resistência foram a eritromicina com (55,74%) em 61 amostras testadas, seguido por clindamicina com (40,35%) em 57 amostras, a norfloxacin com (34,94%) em 83 amostras, e finalmente a ciprofloxacina com (30,86%) em 81 amostras avaliadas. Resultados quase idênticos aos apresentados por todas as estirpes isoladas de *Staphylococcus* (SCP e SCN) neste estudo, sendo o esperável, já que se obteve uma maior frequência de SCP (N=84) com respeito aos SCN (N=31).

As frequências mais altas de susceptibilidade para o grupo dos SCP foram observadas para oxacilina com (85,00%) em 80 amostras testadas, seguida por cefalexina com (83,33%) em 84 amostras, Amoxicilina/ AC clavulâmico com (82,14%) em 84 amostras, cefadroxil com (80,82%) em 73 amostras, e finalmente doxiciclina com (75,90%) em 83 amostras testadas. Estes resultados são semelhantes com os encontrados na avaliação de susceptibilidade para todas as estirpes isoladas de *Staphylococcus* spp.

No pertinente a resistência apresentada pelas estirpes de SCN, a eritromicina mostrou o índice mais elevado de resistência com (52,64%) em 19 amostras testadas, seguida por clindamicina com (44,44%) em 18 amostras, cloranfenicol com (30,00%) em 20 amostras, ciprofloxacina com (23,33) em 30 amostras, e finalmente gentamicina e norfloxacina com (19,35%) em 31 amostras avaliadas respectivamente, indicando estes resultados que os SCN, estão entre os patógenos emergentes mais importantes em animais de estimação, e na atualidade estão apresentando níveis elevados de resistência aos antimicrobianos de uso comum em veterinária (MAY; KINYON; NOXON, 2012). Contudo e conforme ao citado por (VENGUST et al., 2006), existem poucas análises disponíveis que ressaltem a importância dos SCN em diversas infecções em medicina veterinária, ou de seu potencial zoonótico.

Dentro deste projeto, e de acordo com as diferentes percentagens de resistência apresentados pelas estirpes de *Staphylococcus* spp. Assim como para os SCP e SCN isolados, foram divididos os antimicrobianos testados em três grupos: 1) percentagem de resistência baixa (<20%), 2) percentagem de resistência média (20-30%), 3) percentagem de resistência alta (>30%). A proporção de resistência entre os diferentes grupos de antimicrobianos foi comprovada mediante o teste Qui-Quadrado para determinar se existia alguma diferença estatística. As análises foram feitas utilizando o programa Minitab 17 e considerando um nível de significância de 5%. Como resultado deste teste, foi determinado que existia diferença estatística da proporção de resistência entre os 3 os grupos de antimicrobianos ($p = 0,000$) avaliados juntamente, e por separado para as estirpes de *Staphylococcus* spp., e para os SCP e SCN estudados nesta investigação.

Alem disto, foi realizado o teste *U de Mann Whitney* para comparar se existia diferença significativa entre as medianas da pontuação dada aos diversos antimicrobianos de acordo com o índice apresentado de sensibilidade ou resistência (1 “sensível”; 2 “Intermédio”; 3 “resistente) entre os grupos de SCP e SCN ($p < 0,05$) mais não foi encontrada diferença significativa (Tabela 13).

6.3 Avaliação da susceptibilidade *in vitro* frente a diferentes antimicrobianos em relação a todas as estirpes de *Staphylococcus* spp. identificadas

Independentemente da baixa frequência de isolamento do *Staphylococcus aureus*, na presente pesquisa (duas amostras), foi testada a susceptibilidade *in vitro* aos diversos antimicrobianos, o agente que apresentou a maior frequência de resistência foi a eritromicina com (100%) em duas amostras testadas, os antimicrobianos amoxicilina/ac clavulânico, cefadroxil, cefalexina, clindamicina, cloranfenicol, doxiciclina, gentamicina, neomicina e oxacilina finalmente, apresentaram (50%) de resistência nas duas amostras avaliadas. Os antimicrobianos ciprofloxacina, enrofloxacin e norfloxacina tiveram (100%) de susceptibilidade nas duas amostras respectivamente (Tabela 14 e Gráfico 5). Contudo o tamanho da amostra era muito pequeno, sem embargo uma das estirpes isoladas exibiu resistência a oxacilina sugerindo que pode se tratar de uma cepa meticilino resistente (MRSA). Estudos nos Estados Unidos e no Reino Unido associam frequentemente a emergência de cepas de (MRSA) com infecções pós-operatórias e feridas feitas por mordedura de cães, além disto, essas estirpes mostram com regularidade resistência a outros agentes antimicrobianos como os pertencentes ao grupo dos macrolídeos, lincosamidas e fluoroquinolonas (CLARKE, 2006). Também é bem conhecido o potencial zoonótico desta espécie entre humanos e animais, sendo isto de importância para a saúde pública, sendo responsabilidade dos veterinários fornecerem aconselhamento adequado aos donos de animais infectados pelo (MRSA) (O'MAHONY et al., 2005; WEESE et al., 2006; WEESE; VAN DUIJKEREN, 2010), fato pelo qual sentimos a obrigação de testar as duas amostras identificadas deste agente na nossa pesquisa.

No referente ao *Staphylococcus epidermidis*, este agente foi isolado em 19 amostras, os índices mais elevados de resistência foram apresentados por eritromicina com (47,06%) em 17 amostras testadas, seguido por cefadroxil com (33,33%) em 18 amostras, e cloranfenicol com (26,32%) em 19 amostras.

Por outro lado os antimicrobianos com maiores valores de susceptibilidade foram: norfloxacina e enrofloxacin com (89,47%) em 19 amostras testadas, seguido

por ciprofloxacina com (88,89%) em 18 amostras, e finalmente os antimicrobianos oxacilina, cefalexina e amoxicilina/ac clavulanico com (84,21%) em 19 amostras respectivamente (Tabela 15 e Gráfica 6).

Neste caso a eritromicina novamente foi o antimicrobiano com a ação mais limitada *in vitro* apresentando um alto índice de resistência, é importante lembrar que a maioria das cepas de *S epidermidis* foram isoladas de amostras de pele, o qual indica que o este antimicrobiano provavelmente não possui uma efetividade alta neste tipo de infecções. Contrario ao reportado por (COLOMBINI; MERCHANT; HOSGOOD, 2000), a eritromicina e o cloranfenicol, não tiveram a mesma taxa de sucesso na atividade *in vitro* com as cepas de *S epidermides* na presente pesquisa. No trabalho feito em Louisiana por estas pesquisadoras, este agente bacteriano teve (100%) de susceptibilidade a estes antimicrobianos em cães com otite, por outro lado a enrofloxacin teve um alto índice de susceptibilidade concordando com os achados relatados por estas pesquisadoras. No trabalho feito por (MENDES, 2011) ele identificou resistência a três grupos de agentes para esta espécie, que foram os inibidores do ácido fólico com (60%) de resistência, seguido pelo grupo dos lincosamídeos com (40%), e (20%) a classe dos macrolídeos, apresentando este último um índice maior de resistência no presente projeto.

Já no caso do *Staphylococcus Xylosus*, este foi isolado em 7 amostras das totalidade das testadas, os maiores índices de resistência foram apresentados pelos antimicrobianos: sulfametoxazol trimetropin com (50,00%) em 6 amostras testadas, seguido por gentamicina, enrofloxacin e ciprofloxacina com (42,86%) em 7 amostras respectivamente.

Entre os antimicrobianos que apresentaram maior índice de susceptibilidade estiveram a oxacilina, doxiciclina, cefalexina, cefadroxil e amoxicilina/ac clavulanico com (85,71%) em 7 amostras testadas respectivamente, seguidas por norfloxacin e ceftriaxona com (71,43%) em 7 amostras testadas (Tabela 16 e Gráfico 7).

Como já foi citado neste trabalho os SCN na atualidade estão relacionados em processos infecciosos como otite em cães e mastite bovina, no caso dos humanos estão envolvidos em infecções nosocomiais principalmente. O aumento no número de infecções por SCN e sua crescente resistência à meticilina têm se tornado um obstáculo para o controle das infecções produzidas por estes agentes.

No trabalho feito por (MENDES, 2011), foi reportado que os microrganismos isolados nesse estudo tiveram a maior taxa de resistência ao antimicrobiano sulfametoxazol trimetropin, sendo 53 das 72 estirpes identificadas resistentes (73,6 %), sendo no presente trabalho reportada a resistência a este antimicrobiano exclusivamente pelo *Staphylococcus xylosus* com (50%), sendo que nesse estudo assim como no estudo feito por (BARBOSA, 2009), não foi reconhecido este agente bacteriano. Por outro lado (SOARES et al., 2008), identificaram o *Staphylococcus xylosus* como o membro mais prevalente dos SCN em amostras isoladas de cães (N=9), e bovinos (N=5), obtendo eles índices de resistência para Oxacilina de (52,2%) e de (15,6%) para gentamicina, contudo no presente trabalho a oxacilina foi o antimicrobiano com maior susceptibilidade mostrando (85,71%) e a gentamicina sendo o antimicrobiano depois do sulfametoxazol trimetropin com o índice de resistência mais elevado (42,86%), tendo as fluoroquinolonas (enrofloxacin e ciprofloxacina) o mesmo índice de resistência. É importante lembrar que neste estudo o *S. xylosus* foi isolado principalmente de amostras de urina. Estes achados concordam com (COHN et al., 2003), o qual refere um aumento crescente da resistência as fluoroquinolonas em cães acometidos por infecções do trato urinário, indicando que em infecções clínicas do trato urinário tratamento por meio destes agentes pode não ser o mais indicado.

O *Staphylococcus Chromogenes* teve uma baixa prevalência sendo isolado somente em 4 amostras, os antimicrobianos que apresentaram os maiores índices de resistência foram do grupo das fluoroquinolonas (ciprofloxacina e norfloxacina) com (25,00%) em 4 amostras testadas.

A enrofloxacin e a gentamicina apresentaram resistência intermediária com (25,00%) em 4 amostras testadas respectivamente.

Os antimicrobianos que mostraram maior índice de sensibilidade foram: cefadroxil, cefalexina, doxiciclina, e oxacilina com (100%) em 4 amostras e ceftriaxona com (100%) em 3 amostras testadas (Tabela 17 e Gráfica 8).

Neste caso assim como no caso da resistência apresentada as fluoroquinolonas pelo *S. xylosus*, vale a pena lembrar que o *S. chromogenes* foi isolado principalmente em amostras de urina, apresentando os níveis mais elevados de resistência a ciprofloxacina e norfloxacina (fluoroquinolonas), concordando

novamente com o exposto por (COHN et al., 2003).Torna se importante mencionar que devido a ampla patogenicidade apresentada pelos SCN, é fundamental fazer uma identificação precisa destes agentes bacterianos, não dando para o grupo inteiro a mesma relevância, sendo que alguns dos membros deste grupo são mais prevalentes, podendo a identificação e o estudo por separado destes ter implicações positivas para a investigação, diagnostico e tratamento das infecções causadas por SCN (PODKOWIC et al., 2013).

O *Staphylococcus pseudointermedius* foi identificado em 82 amostras, avaliou-se a susceptibilidade *in vitro* a diferentes antimicrobianos, os que apresentaram maior índice de resistência foram a eritromicina novamente com (54,25%) em 59 amostras testadas, seguida por clindamicina com (40,00%) em 55 amostras e finalmente a norfloxacin com (35,00%) em 80 amostras avaliadas.

Para esta estirpe os antimicrobianos que apresentaram maior índice de susceptibilidade foram: oxacilina com (85,90%) em 78 amostras, seguido por cefalexina com (84,15%) em 82 amostras, amoxicilina/ac clavulanico com (82,93%) em 82 amostras, cefadroxil com (81,69%) em 71 amostras, doxiciclina com (76,54%), em 81 amostras, e finalmente gentamicina com (75,61%) em 82 amostras avaliadas (Tabela 18 e Gráfica 9).

No trabalho feito por (RUBIN; CHIRINO-TREJO, 2011), encontraram susceptibilidade a (71%) do painel de antimicrobianos testados em amostras de cães saudios, achando baixos percentagens de resistência, entre as 153 cepas identificadas como *S. pseudointermedius*, somente 4 apresentaram resistência a clindamicina e uma a eritromicina, resultados bastante baixos quando comparados aos obtidos no presente estudo, mas deve lembrar-se que esses achados foram de amostras de cães saudáveis. Já na pesquisa de (MENDES, 2011), foi referida uma percentagem de resistência as lincosamideos e macrolideos de (64,7%), sendo estes mais elevados ao observado nesta pesquisa, no caso das fluoroquinolonas eles obtiveram (35,2%) de resistência, sendo o resultado muito próximo ao identificado neste projeto, e finalmente os aminoglicosideos apresentaram (29,4%) de resistência, resultado maior ao mencionado neste trabalho. Coincidindo com os reportes feitos por (BARBOSA, 2009), no presente trabalho, foi observada para as cefalosporinas uma susceptibilidade elevada, com percentagens de (84,15%) para

cefalexina e (81,69%) para cefadroxil, sendo citado por esta pesquisadora que em diversos estudos tem sido obtida uma susceptibilidade de aproximadamente (90%) para estes agentes, no caso da amoxicilina/ac clavulanico no mesmo projeto obtiveram (90,2%) de susceptibilidade, sendo este resultado similar a obtido neste trabalho, concordando com o sugerido por esta investigadora, a qual afirma que este antimicrobiano pode ser um agente de primeira escolha em casos de infecções bacterianas por *Staphylococcus* spp. Segundo (FUTAGAWA-SAITO; BA-THEIN; FUKUYASU, 2007), e como foi referido na presente pesquisa, as cepas isoladas em animais com infecções clínicas como otite e piodermite, parecem cada vez mais resistentes a diversos antimicrobianos, no trabalho feito por estes investigadores no Japão, foi encontrada (22,7%) de resistência a eritromicina, resultado bem menor ao encontrado neste projeto, mas nesse estudo foi um valor elevado quando comparado com estudos prévios nessa área geográfica, da mesma forma reportaram uma baixa frequência de resistência a norfloxacin, sendo 1 amostra resistente, contudo no presente estudo este antimicrobiano foi um dos que mostrou os mais altos índices de resistência; No mesmo trabalho, eles comentaram que isolados de animais com infecções clínicas geralmente são mais resistentes a eritromicina, mas nesse caso, assim como na presente pesquisa, não foi possível ter acesso a informação sobre tratamentos prévios com antimicrobianos para corroborar esta afirmação. Por outro lado (HARTMANN et al., 2005), relato que dos 222 isolados de *S. pseudointermedius* em cães saudáveis (125), e (97) cães com piodermite, o (100%) foram susceptíveis a oxacilina, norfloxacin e gentamicina entre outros, sendo estas estirpes mais susceptíveis a estes agentes do que o encontrado no presente trabalho. Eles também obtiveram resistência a eritromicina e clindamicina, mas em um grau menor a (10%) para cada antimicrobiano nos cães saudáveis, e já de (23%) para eritromicina e (22%) para a clindamicina nos cães com piodermite, sendo que no presente trabalho estes agentes foram os que apresentaram os maiores índices de resistência. Apesar de ter eles resultados menores de resistência ao encontrado no presente projeto, foi interessante ver a grande diferença entre os padrões de susceptibilidade a eritromicina e a clindamicina em cães saudáveis e com piodermite, segundo os autores, e em discrepância com o mencionado acima, estes resultados são opostos ao reportado em diversos artigos que afirmam que não existe diferença em quanto aos padrões de resistência encontrados em isolados de cães saudáveis e com piodermite, não entanto estas

alterações nos padrões de resistência têm sido reportadas em cães com piodermite que receberam tratamento prévio com antimicrobianos, mas na pesquisa feita por estes investigadores, não foi obtido o histórico de tratamentos dos animais para apoiar esta observação. Já no trabalho feito por (COLOMBINI; MERCHANT; HOSGOOD, 2000), foi citada uma percentagem de resistência de (27%) a eritromicina, de (19%) a clindamicina, de (5%) a oxacilina, e uma susceptibilidade a amoxicilina/ac clavulanico de (100%), tendo nesse trabalho uma alta susceptibilidade *in vitro* pelo *S. pseudointermedius* a estes agentes, concordando estes achados com a hipótese de que os percentagens de resistência tem aumentado nos últimos anos, como foi observado nos resultados do presente trabalho. Da mesma forma na França (HAENNI et al., 2014), determinaram a susceptibilidade antimicrobiana de 243 isolados *S. pseudointermedius*, provenientes de cães com infecções da pele, otite, infecções urinárias principalmente, obtendo entre os *S. pseudointermedius* sensíveis a metilicina (MSSP) uma percentagem de (38,1%) a eritromicina, sendo que nos *S. pseudointermedius* resistentes a metilicina (MRSP), obtiveram (97,6%) de resistência a este agente antimicrobiano, assim como a outros agentes não testados na presente pesquisa, obtendo eles índices alarmantes de resistência assim como foi reportado por (SASAKI et al., 2007), o qual obteve resistência por parte dos MRSP isolados de (100%) para eritromicina e clindamicina. Devido à alta prevalência demonstrada dos (MRSP), aos antibióticos B lactâmicos, fluoroquinolonas, macrolídeos, lincosamídeos, tetraciclina e aminoglicosídeos, é recomendado o uso do cloranfenicol como opção terapêutica (GÓMEZ-SANZ et al., 2011; NIENHOFF et al., 2011; HAENNI et al., 2014). Sem embargo na presente pesquisa, assim como foi referido por (SASAKI et al., 2007; PERRETEN et al., 2010), o cloranfenicol apresentou índices de resistência importantes. Contudo o uso deste antimicrobiano não é comum na França desde que o seu uso foi restrito a formulações tópicas. Em razão das opções limitadas de tratamento, é o potencial zoonótico das cepas de MRSP (FRANK et al., 2009; PERRETEN et al., 2010), é necessário ter novos recursos terapêuticos para tratar diversas infecções em animais de estimação. Ao parecer o ácido fusídico, é uma boa eleição para uso tópico, e terapias não antibióticas como antissépticos conhecidos como a clorhexidina podem ser usados em dermatologia. Além disto, é imprescindível detectar por meio da PCR o gene *mecA*, para ter um diagnóstico sensível das cepas resistentes a metilicina (multirresistentes), levando isto a ter um melhor

conhecimento da complexidade do problema da multirresistência na medicina veterinária e humana. Além disso, e de acordo com as recomendações feitas para a detecção de cepas MRSP, a oxacilina, amikacina, cloranfenicol e rifampicina, devem ser testados rotineiramente para ter uma guia de possibilidades de tratamento em casos de infecções por *Staphylococcus* em animais de estimação (DE LUCIA et al., 2011),

Com respeito do *Staphylococcus schleiferi*, este agente bacteriano foi isolado numa amostra somente, contudo foi avaliada também a susceptibilidade *in vitro* a diferentes antimicrobianos. Os que apresentaram o maior índice de resistência foram: clindamicina, cloranfenicol, doxiciclina, enrofloxacina, eritromicina e norfloxacina com (100%), obtendo um padrão de resistência semelhante à maioria das outras estirpes isoladas, contudo, o tamanho da amostra foi muito menor ao esperado quando comparado com outros estudos como o realizado por (MENDES, 2011).

6.4 Avaliação da susceptibilidade *in vitro* aos antimicrobianos testados em relação ao tecido

Avaliou-se também o perfil de susceptibilidade e resistência dos diferentes antimicrobianos usados neste projeto, em relação ao tecido de origem da estirpe isolada. Para as amostras de pele, os antimicrobianos mostraram índices de resistência e susceptibilidade similares aos obtidos nas diferentes estirpes de *Staphylococcus* isoladas neste trabalho.

Com respeito às amostras provenientes de secreção otológica, os antimicrobianos com o maior índice de resistência foram membros do grupo das fluoroquinolonas concordando isto com os reportes feitos por muitos pesquisadores os quais afirmam que é comum a aquisição de resistência bacteriana a estes agentes (CLARKE, 2006; HAUSCHILD; WÓJCIK, 2007; HUERTA et al., 2011; MENDES, 2011). Apesar disso, antimicrobianos do grupo dos beta-lactâmicos, tetraciclina, o cloranfenicol e aminoglicosídeos apresentaram bom índice de

susceptibilidade *in vitro* sugerindo que alguns destes agentes são efetivos em casos de otite causada por *Staphylococcus* spp.

Dentre as amostras provenientes de Urina, os antimicrobianos que apresentaram maior índice de resistência foram correspondentes aos resultados obtidos ao analisar os índices de resistência e susceptibilidade do *S. chromogenes* e o *S. xylosus*, sendo que estes agentes bacterianos foram isolados principalmente em amostras de urina.

Dentre as amostras recebidas foram obtidas além das mencionadas acima duas amostras de tecido vulvar, e uma amostra para cada um destes tecidos: fragmento de bexiga, fragmento torácico, secreção nasal, e secreção ocular, sendo neste caso muito pequena a amostra para gerar hipóteses validas.

Como foi mencionado acima, os tecidos recebidos para o isolamento das estirpes de *Staphylococcus* spp. Que exibiram o maior numero de amostras (pele, secreção de ouvido e urina), foi realizado o teste de *Kruskal Wallis* para comparar possíveis diferenças estatísticas significativas na avaliação dos antibiogramas ($p < 0,05$), mas não foi encontrada uma diferenca significativa.

Ademais foi realizado o teste de *Kruskal Wallis* para comparar diferenças estatísticas significativas na avaliação dos antibiogramas em relação à estirpe isolada, mais os resultados não foram significativos (Tabela 28).

No Brasil no âmbito da medicina hospitalar em humanos, as bactérias do gênero *Staphylococcus* tem exposto um elevado índice de resistência à metilina, consequentemente à oxacilina e as cefalosporinas, sendo similar ao acontecido em outros países (TAVARES, 2000). Contudo na medicina veterinária a falta de padronização sobre a metodologia da cultura e os testes de sensibilidade, fazem que a maioria das vezes seja complexo realizar comparações significativas entre os estudos realizados (MORGAN, 2008; DE LUCIA et al., 2011), Além disto, a história natural da colonização pelos *Staphylococcus* multirresistentes nas diferentes espécies animais é desconhecida. Ainda desconhecemos a verdadeira dimensão do problema, e mais estudos de vigilância devem ser feitos, contudo a boa pratica de higiene dentro das personas que convivem com animais, assim como na saúde humana e veterinária não devem ser subestimados, da mesma forma é essencial

fazer culturas em casos de feridas que não respondem aos tratamentos com antimicrobianos de primeira escolha, estas medidas permitiriam a detecção a tempo de cepas multirresistentes, e aumentaria as possibilidades de controle (MORGAN, 2008). Portanto não pode se concluir se os resultados obtidos neste trabalho refletem um aumento na frequência de cepas resistentes a maioria dos agentes antimicrobianos utilizados em medicina veterinária de animais de estimação, não obstante a partir do observado e discutido neste trabalho, pode se refletir que o uso indiscriminado de antimicrobianos pode beneficiar a seleção e propagação de estirpes resistentes.

6.5 Pesquisa de genes codificadores de adesinas e biofilme em estirpes de *staphylococcus* spp. isoladas em amostras clínicas de cães e gatos

Como foi mencionado, os *Staphylococcus* spp. Possuem algumas proteínas de superfície, conhecidas como adesinas, estas são pertencentes a família das *microbial surface components recognizing adhesive matrix molecules* (MSCRAMMs). Estas adesinas se aderem a moléculas como colágeno, fibronectina, fibrinogênio, laminina e elastina presentes na matriz extracelular do hospedeiro (SEO et al., 2008).

Das 118 amostras recebidas neste projeto e identificadas como pertencentes ao gênero *Staphylococcus*, obteve-se uma amostra positiva pelo PCR para os genes: codificador da proteína ligadora de colágeno (*Cna*) (0,87%), proteína ligadora de fibrinogênio (*Fib*) (0,87%), proteína A ligadora de fibronectina (*FnbA*) (0,847%), e finalmente para o gene codificador da Proteína B ligadora de fibronectina (*FnbB*) (0,847%). Já o gene que apresentou a maior frequência de identificação foi o gene codificador para a proteína ligadora de laminina (*Eno*), com (N=106) amostras positivas (89,83%). Em nenhuma das amostras foi detectado a presença dos genes da proteína associada a formação de biofilme (*Bap*) e o gene codificador para a proteína ligadora de elastina (*EbpS*), (Tabela 29 e Gráfica 19).

No trabalho feito por Salaberry (2014), pesquisando a frequência de genes codificadores de adesinas e formador de biofilme em cabras leiteiras com mastite subclínica, o gene *Eno* foi um dos mais detectados, juntamente com o *Bap*, sendo que neste projeto, assim como relatado por (SEO et al., 2008), não foi detectado este último gene. No trabalho feito por este pesquisador não foram encontrados além do gene mencionado, os genes *FnbA* e *FnbB*, em cepas isoladas de *Staphylococcus* spp., identificadas em cães, suínos e o ar. Contudo o gene *Eno* no presente projeto apresentou o índice mais elevado de frequência, superando o relatado por este investigador, o qual encontrou a maior frequência deste gene em isolados provenientes do ar (83%), e já em animais reportou uma percentagem de (56%) para o mesmo gene. Outro dos trabalhos dentro da área foi o feito por (ZUNIGA, 2012), em bovinos com mastite, neste concordando com os dados obtidos na Coreia não foi identificado o gene *FnbA*, sendo que todos os outros genes codificadores de adesinas e formador de biofilme foram reportados. No entanto (KUMAR et al., 2010), citaram entre 128 cepas de *S. aureus* isolado de mastites bovinas, uma prevalência de 100% para os genes *FnbA* e *Eno*. Da mesma maneira, também foi constatada a presença dos genes *Ebps* com (60,2%), *Fib* (59,4%), *FnbB* (21,9%), e finalmente *Cna* com (6,3%), tendo estes resultados índices mais elevados aos encontrados nesta pesquisa, mas vale a pena lembrar que esses genes foram isolados exclusivamente de cepas de *S. aureus*. No caso dos seres humanos, um estudo realizado por (TRISTAN et al., 2003) em estirpes isoladas de pacientes com infecções invasivas (endocardite, osteomielite/artrite), reportaram uma prevalência de 100% para o gene *Eno*, confirmando mais uma vez a elevada frequência de ocorrência deste gene em infecções causadas por *S. aureus* em seres humanos e animais, nestas circunstâncias, os outros genes da família das MSCRAMM foram detectados no caso do *Fib* em 80% das cepas isoladas, para o *EbpS* 58%, para o *FnbB* 43%, 36% para o gene *Cna*, e finalmente 28% para o gene *FnbA*. Por outro lado (VANCRAEYNEST; HERMANS; HAESBROUCK, 2004), investigou a presença dos genes codificadores de adesinas e formador de biofilme em 62 estirpes de *S. aureus* isoladas de coelhos, neste caso concordando com o reportado por (ARCIOLA et al., 2005; SEO et al., 2008). Não foi identificado o gene *Bap*, além disso todas as estirpes foram positivas para o gene *Eno*, e o gene *fib* novamente. No caso do gene *FnbA* foi isolado com uma frequência acima do 90% nesse estudo, em cepas de alta e baixa virulência do *S. aureus*. Para as cepas de baixa virulência

foram reportadas percentagens de ocorrência de 83% para o *FnbB*, 71% para o *EbpS*, e para o gene *Cna* se reportou uma ocorrência de 56%. No caso das cepas altamente virulentas estas percentagens mudaram para o *FnbB* e *EbpS* para 37% e 76% respectivamente, nas cepas de alta virulência não foi detectado o gene *Cna*, sendo imprevisto este resultado, já que seria esperável ter um maior índice de ocorrência destes genes em cepas virulentas. Por outro lado pode se assumir que no caso das infecções causadas pelo *S aureus* em coelhos a patogenicidade não esta relacionada com a formação de biofilme (VANCRAEYNEST; HERMANS; HAESBROUCK, 2004).

A percentagem de identificação dos genes codificadores de adesinas e formador de biofilme nos caninos foi: 1 amostra positiva para o gen *FnbB* (0,9%), 1 amostra positiva para o *Fib* (0,9%), 1 amostra positiva para o *Fnba* (0,9%) e finalmente o gen *Eno* com (91,9%) 102 amostras positivas para cães, sendo estes resultados comparáveis com o estudo feito por (SEO et al., 2008), já que é a única pesquisa conhecida na qual investigaram estes genes em cães. Nessa pesquisa, assim como no presente projeto não foi encontrado o gene *Bap*, sugerindo isto que o gene formador de biofilme não tem relação com cepas patogênicas isoladas em cães e coelhos, como foi reportado por (VANCRAEYNEST; HERMANS; HAESBROUCK, 2004). Além disto, no trabalho feito por (SEO et al., 2008), foi identificado o gene *Cna* com uma frequência de (8%), sendo que não foi identificado na presente pesquisa este gene em cães, esses investigadores não identificaram os genes *FnbA*, nem *FnbB*, sendo nesta pesquisa encontrados em uma amostra para cada gene.

Para os felinos a percentagem da detecção de genes codificadores de adesinas e formador de biofilme foi: (14,3%), 1 amostra positiva para o gene *Cna*, e (57,1%) com 4 amostras positivas para o gene *Eno*. Sendo este o primeiro reporte da ocorrência de genes codificadores de adesinas em esta espécie. Não foram identificados em felinos os genes *Fib*, *FnbA*, *FnbB*, *EbpS*, e finalmente o gene *Bap*, insinuando que estes genes não tem correlação com a apresentação de diversas infecções nesta espécie, contudo é necessário fazer mais experimentação para poder dilucidar os principais fatores de virulência envolvidos nos casos de adesão e colonização bacteriana em felinos.

A percentagem de detecção do gene *Eno* para as duas espécies foi: (89,8%), (106) amostras positivas (102 amostras para cães) e (4 amostras para felinos) (tabela 30), indicando isto que a presença deste gene favorece a adesão e invasão por estes microrganismos. O gene *Eno* tem sido reportado como uma proteína de superfície celular com afinidade pela laminina, desta forma, acreditasse que a expressão desta proteína poderia auxiliar a colonização bacteriana através da ligação a laminina presente na matriz extracelular (SALABERRY, 2014). Além disto, este gene tem sido detectado com alto índice de frequência em mastites causadas por *S aureus* (KUMAR et al., 2010).

Em relação aos genes codificadores de adesinas e formador de biofilme pesquisados nas diferentes estirpes de *Staphylococcus* spp., se encontraram: Para o *Staphylococcus pseudointermedius*, os genes: *Fnbb* em (0,85%) 1 amostra positiva, e o gene *Eno* em (65,3%) em 77 amostras, para um total de (66,1%) em 78 amostras para esta estirpe. Contudo pouco se conhece sobre os fatores envolvidos na aderência e colonização na pele e membranas mucosas em cães saudáveis e com diversas infecções, e na atualidade estes elementos não tem sido identificados (GEOGHEGAN et al., 2009), a partir dos poucos resultados obtidos neste trabalho é complicado fazer afirmações, contudo a ocorrência do gene *Eno* oferece uma provável associação entre a presença do mesmo em casos de infecção. No caso do *S. aureus*, como foi referido acima o tamanho da amostra foi muito baixa, contudo as duas amostras isoladas apresentaram os genes *Eno*, uma amostra foi positiva para o gene *FnbA*, e uma amostra foi positiva para o gene *Fib*, sendo baseados a maioria dos estudos feitos em relação aos genes codificadores de adesinas e formador de biofilme nesta espécie bacteriana, sem embargo tem sido pouco relatado a presença do gene *Bap* (KUMAR et al., 2010), sugerindo estes resultados que os SCP podem ter uma capacidade limitada para formar um biofilme (SALABERRY., 2014).

No caso dos SCN, o *S epidermidis* apresentou em 14 amostras o gene *Eno*, o *S xylosus* teve uma ocorrência em 6 amostras do mesmo gene, o *S chromogenes* em 4 amostras apresentou o mesmo gene, e finalmente o *S schleiferi* apresentou o gene *Eno* na única amostra isolada desta espécie. Neste caso existem relatos da identificação de genes codificadores de adesinas e formador de biofilme nos SCN, é

tem sido mencionado que dentre os *Staphylococcus* spp., ao parecer existe maior capacidade de formação de biofilme em este grupo (ZUNIGA, 2012).

Dentre os genes detectados nas diferentes amostras recebidas neste estudo foi possível determinar que alguns dos genes pesquisados foram expressados por diferentes cepas de *Staphylococcus* spp., independentemente do tecido que deu origem a cada estirpe isolada (Tabela 32 e Gráficos 22 e 23).

O processo de adesão bacteriana é caracterizado por envolver diversas variáveis incluindo a espécie bacteriana, e o *status* imune do hospedeiro, portanto todos estes elementos devem ser avaliados cuidadosamente. Contudo os diversos trabalhos feitos dentro de esta área, assim como os resultados obtidos neste projeto corroboram com a possibilidade de que as proteínas da família das MSCRAMM em animais estão intimamente associadas como fatores de virulência nas infecções causadas por *Staphylococcus* spp. Não obstante, o conhecimento atual que temos sobre o papel das proteínas de superfície como fatores de virulência ainda esta longe de ser concluído. Além disso, precisamos de estudos que abordem este tema de forma integral, estes devem ter um enfoque desde a biologia molecular, bioquímica, microbiologia e imunologia, para determinar a interação específica das adesinas com os mecanismos de defesa do hospedeiro, e a capacidade de evasão dos patógenos a estes mecanismos defensivos.

A importância das bactérias do gênero *Staphylococcus*, em especial o *S. aureus*, *S. pseudointermedius* e o *S. epidermidis* na medicina Humana e Veterinária, como agentes infecciosos, e com o problema crescente relacionado com a resistência antimicrobiana, e a necessidade de ter vacinas, medicamentos ou terapias alternativas eficazes para o controle destes agentes, preconizam o dever da comunidade científica em progredir em investigações dentro desta área. Isto permitira num futuro ter novas, e mais eficientes métodos para a abordagem, o controle e a diminuição do impacto das doenças infecciosas causadas por bactérias deste gênero.

7 CONCLUSOES

Nas condições do presente estudo, foram obtidas as seguintes conclusões:

- A maioria das amostras avaliadas foram recebidas de cães e gatos com infecções clínicas diversas, sendo as mais comuns, piodermite, otite, e infecção do trato urinário.
- A presença de micro-organismos está relacionada diretamente com infecções clínicas.
- No presente estudo os *Staphylococcus* coagulase-positivos foram isolados em maior frequência que os *Staphylococcus* coagulase-negativos, sendo em animais de estimação os *Staphylococcus* do grupo SCP os agentes mais associados a diversas infecções como a piodermite canina.
- O microrganismo mais frequentemente isolado em diversas infecções em cães e gatos foi o *Staphylococcus pseudointermedius*, concordando com o reportado em estudos prévios.
- Os antimicrobianos que exibiram os maiores índices de resistência *in vitro* as diferentes espécies de *Staphylococcus* spp., isolados foram eritromicina, clindamicina e norfloxacin.
- O antimicrobiano que apresentou o maior índice de susceptibilidade *in vitro* as diferentes espécies de *Staphylococcus* spp., isolados foi a oxacilina.
- O perfil de resistência e susceptibilidade aos antimicrobianos testados foi similar entre as espécies de *Staphylococcus* coagulase-positivo e coagulase-negativo.
- O gene que apresentou a maior ocorrência dentre as espécies isoladas de *Staphylococcus* spp., foi o gene *Eno*, este gene tem sido identificado como uma proteína de superfície celular com alta afinidade pela laminina. Dessa forma, a expressão desta proteína de superfície presumivelmente auxilia a colonização dos *Staphylococcus* spp., através da ligação à laminina presente na matriz extracelular, favorecendo a invasão e a disseminação do micro-

organismo. Além de este gene foram detectados os genes *Cna*, *FnbA*, *FnbB*, e *Fib*.

- Em nenhuma das amostras foram identificados os genes *Bap* e *ebpS*.
- Em caninos os genes identificados foram *Eno*, *FnbB* e *Fib*.
- Em felinos os genes identificados foram *Eno* e *Cna*.
- No *S. pseudointermedius* foram identificados os genes *Eno* e *FnbB*.
- No *S. aureus* foram identificados os genes *Eno*, *FnbA*, e *Fib*.
- Para o *S. epidermidis* e o *S. chromogenes* foi identificado o gene *Eno*.
- As associações de genes *Eno/Fib/FnbA*, e *Eno/FnbB*, foram identificadas em uma amostra respectivamente.

REFERENCIAS

ARCIOLA, C. R.; CAMPOCCIA, D.; GAMBERINI, S.; BALDASSARRI, L.; MONTANARO, L. Prevalence of *cna*, *fnbA* and *fnbB* adhesin genes among *Staphylococcus aureus* isolates from orthopedic infections associated to different types of implant. **FEMS Microbiology Letters**, v. 246, n. 1, p. 81–86, maio 2005.

BANNOEHR, J.; BEN ZAKOUR, N. L.; REGLINKI, M.; INGLIS, N. F.; PRABHAKARAN, S.; FOSSUM, E.; SMITH, D. G.; WILSON, G. J.; CARTWRIGHT, R. A.; HAAS, J.; HOOK, J.; VAN DER BROEK, A. H.; THODAY, K. L.; FITZGERALD, J. R. Genomic and surface proteomic analysis of the canine pathogen *Staphylococcus pseudintermedius* reveals proteins that mediate adherence to the extracellular matrix. **Infection and Immunity**, v. 79, n. 8, p. 3074–3086, ago. 2011.

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

BARBOSA, D. C. **Participação bacteriana nas dermatopatias piogênicas em cães de abrigo e padrões de sensibilidade do *Staphylococcus intermedius* aos antimicrobianos**. 2009. 76 p. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Universidade Federal do Paraná, Paraná, 2009.

BATTERSBY, I. Using antibiotics responsibly in companion animals. **In Practice**, v. 36, n. 3, p. 106–118, 6 mar. 2014.

BAUER, A. W.; KIRBY, W. M.; SHERRIS, J. C.; TURCK, M. Antibiotic susceptibility tests by standardized single disk method. **American Journal Clinical Pathology**, v. 45, p. 493-496, 1966

BOOM, R.; SOL, C. J. A.; SALIMANS, M. M. M.; JANSEN, C. L.; WERTHEIM-VAN DILLEN, P. M. E.; VAN DER NOORDAA, J. Rapid and Simple Method for Purification of Nucleic Acids. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 28, n. 3, p. 495-503, 1990.

BORDT, A. S. **The *staphylococcus pseudintermedius* adhesin *spsd* contains a central fibronectin- binding domain**. 2013. UT GSBS Dissertations and Theses (Open Access). Paper 412. Disponível em: <http://digitalcommons.library.tmc.edu/cgi/viewcontent.cgi?article=1451&context=utgsbs_dissertations>. Acesso em: 12 out. 2014.

CAIN, C. L. Antimicrobial resistance in staphylococci in small animals. **Veterinary Clinics of North America - Small Animal Practice**, v. 43, n. 1, p. 19c–40, jan. 2013.

CASTAGLIUOLO, I.; PICCININI, R.; BEGGIAO, E.; PALU, G.; MENGOLI, C.; DITADI, F.; VICENZONI, G.; ZECCONI, A. Mucosal genetic immunization against four adhesins protects against *Staphylococcus aureus*-induced mastitis in mice. **Vaccine**, v. 24, p. 4393–4402, 2006.

CHANCHAITHONG, P.; PRAPASARAKUL, N. Biochemical markers and protein pattern analysis for canine coagulase-positive staphylococci and their distribution on dog skin. **Journal of Microbiological Methods**, v. 86, n. 2, p. 175–81, ago. 2011.

CLARKE, C. R. Antimicrobial resistance. **The Veterinary clinics of North America: small animal practice**, v. 36, n. 5, p. 987–1001, set. 2006.

CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE. (CLSI). **Performance standards for antimicrobial disk and dilution susceptibility test for bacteria isolated from animal**: approved standard M31-A3. 3ed. Wayne, PA: CLSI, 2008, v. 28.

CLUTTERBUCK, A. L.; WOODS, E. J.; KNOTTENBELT, D. C.; CLEGG, P. D.; COCHRANE, C. A.; PERCIVAL, S. L. Biofilms and their relevance to veterinary medicine. **Veterinary Microbiology**, v. 121, n. 1-2, p. 1–17, 31 mar. 2007.

COHN, L. A.; GARY, A. T.; FALES, W. H.; MADSEN, R. W. Trends in fluoroquinolone resistance of bacteria isolated from canine urinary tracts. **Journal Veterinary Diagnostic Investigation**, v. 15, p. 338–343, 2003.

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

CUCARELLA, C.; TORMO, M. A.; UBEDA, C.; TROTONDA, M. P.; MONZON, M.; PERIS, C.; AMORENA, B.; LASA, I.; PENADES, J. R. Role of biofilm-associated protein bap in the pathogenesis of bovine *Staphylococcus aureus*. **Infection Immunity**, v. 72, n. 4, p. 2177-2185, Apr. 2004.

DE LUCIA, M.; MOODLEY, A.; LATRONICO, F.; GIORDANO, A.; CALDIN, M.; FONDATI, A.; GUADABASSI, L. Prevalence of canine methicillin resistant *Staphylococcus pseudintermedius* in a veterinary diagnostic laboratory in Italy. **Research in Veterinary Science**, v. 91, n. 3, p. 346–8, dez. 2011.

EPSTEIN, C. R.; YAM, W. C.; PEIRIS, J. S.; EPSTEIN, R. J. Methicillin-resistant commensal staphylococci in healthy dogs as a potential zoonotic reservoir for community-acquired antibiotic resistance. **Infection, Genetics and Evolution : Journal of Molecular Epidemiology and Evolutionary Genetics in Infectious Diseases**, v. 9, n. 2, p. 283–285, mar. 2009.

FERREIRA, W. A.; VASCONCELOS, W. S.; FERREIRA, C. M.; SILVA, M. F. P.; GOMES, J. S.; ALECRIM, M. G. C. Prevalência de *staphylococcus aureus* metilicina resistente (MRSA) em pacientes atendidos em ambulatório de dermatologia geral em Manaus-Amazonas. **Revista de Patologia Tropical**, [S.l.], v. 38, n. 2, p. 83-92, jul. 2009. doi:10.5216/rpt.v38i2.6605. Disponível em: <<http://www.revistas.ufg.br/index.php/iptsp/article/view/6605>>. Acesso em: 02 Jan. 2015.

FISCHETTI, V. A.; NOVICK, R. P.; FERRETI, J.J. 2. ed. **Gram-positive pathogens**. Washington: ASM Press, 2006.

FITZGERALD, J. R. The *Staphylococcus intermedius* group of bacterial pathogens: species re-classification, pathogenesis and the emergence of meticillin resistance. **Veterinary Dermatology**, v. 20, n. 5-6, p. 490–5, out. 2009.

FOSTER, T. J.; HÖÖK, M. Surface protein adhesins of *Staphylococcus aureus*. **Trends in Microbiology**, v. 6, n. 12, p. 484–8, dez. 1998.

FRANK, L. A.; KARINA, S. A.; KIRZEDER, E. M.; EBERLEIN, L. C.; BEMIS, D. A. Risk of colonization or gene transfer to owners of dogs with meticillin-resistant *Staphylococcus pseudintermedius*. **Veterinary dermatology**, v. 20, n. 5-6, p. 496–501, out. 2009.

FUTAGAWA-SAITO, K.; BA-THEIN, W.; FUKUYASU, T. High occurrence of multi-antimicrobial resistance in *Staphylococcus intermedius* isolates from healthy and diseased dogs and domesticated pigeons. **Research in veterinary science**, v. 83, n. 3, p. 336–9, dez. 2007.

GEOGHEGAN, J. A.; SMITH, E. J.; SPEZIALE, P.; FOSTER, T. J. *Staphylococcus pseudintermedius* expresses surface proteins that closely resemble those from *Staphylococcus aureus*. **Veterinary microbiology**, v. 138, n. 3-4, p. 345–52, 18 set. 2009.

GERLACH, R. G.; HENSEL, M. Protein secretion systems and adhesins: the molecular armory of Gram-negative pathogens. **International Journal of Medical Microbiology**, v. 297, n. 6, p. 401–15, out. 2007.

GÓMEZ-SANZ, E.; TORRES, C.; LOZANO, C.; SÁENZ, Y.; ZARAZAGA, M. Detection and characterization of methicillin-resistant *Staphylococcus pseudintermedius* in healthy dogs in La Rioja, Spain. **Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases**, v. 34, n. 5, p. 447–53, set. 2011.

GUARDABASSI, L.; LARSEN, J.; WEESE, J. S.; BUTAYE, P.; BATTISTI, A.; KLUYTMANS, A.; KLUTMANS, J.; LLOYDE, D. H.; SKOV, R. L. Public health impact and antimicrobial selection of meticillin-resistant staphylococci in animals. **Journal of Global Antimicrobial Resistance**, v. 1, n. 2, p. 55–62, jun. 2013.

GUARDABASSI, L.; LOEBER, M. .; JACOBSON, A. Transmission of multiple antimicrobial-resistant *Staphylococcus intermedius* between dogs affected by deep pyoderma and their owners. **Veterinary Microbiology**, v. 98, n. 1, p. 23–27, jan. 2004.

HAENNI, M.; MORAES, N. A. de; CHÂTRE, R.; MÉDAILLE, C.; MOODLEY, A. Characterisation of clinical canine meticillin-resistant and meticillin-susceptible *Staphylococcus pseudintermedius* in France. **Journal of Global Antimicrobial Resistance**, v. 2, n. 2, p. 119–123, jun. 2014.

HANSELMAN, B. A.; KRUTH, S.; WEESE, J. S. Methicillin-resistant staphylococcal colonization in dogs entering a veterinary teaching hospital. **Veterinary Microbiology**, v. 126, n. 1-3, p. 277–81, 1 jan. 2008.

HARTMANN, F. A.; WHITE, D. G.; WEST, S. E.; WALKER, R. D.; DEBOER, D. J. Molecular characterization of *Staphylococcus intermedius* carriage by healthy dogs and comparison of antimicrobial susceptibility patterns to isolates from dogs with pyoderma. **Veterinary Microbiology**, v. 108, n. 1-2, p. 119–31, 15 jun. 2005.

HARTMUT, H. N.; SCHUBERT, W. D.; HEINZ, D. W. Adhesins and invasins of pathogenic bacteria: a structural view. **Microbes Infection**, v. 6, n. 1, p. 101–112, Jan 2004.

HAUCK, C. R.; OHLSEN, K. Sticky connections: extracellular matrix protein recognition and integrin-mediated cellular invasion by *Staphylococcus aureus*. **Current Opinion in Microbiology**, v. 9, n. 1, p. 5–11, fev. 2006.

HAUSCHILD, T.; WÓJCIK, A. Species distribution and properties of staphylococci from canine dermatitis. **Research in Veterinary Science**, v. 82, n. 1, p. 1–6, fev. 2007.

HUERTA, B.; MALDONADO, A.; GINEL, P. J.; TARRADAS, C.; GÓMEZ-GASCÓN, L.; ASTORGA, R. J.; LUQUE, I. Risk factors associated with the antimicrobial resistance of staphylococci in canine pyoderma. **Veterinary Microbiology**, v. 150, n. 3-4, p. 302–8, 2 jun. 2011.

IRLINGER, F. Safety assessment of dairy microorganisms: coagulase-negative staphylococci. **International Journal of Food Microbiology**, v. 126, n. 3, p. 302–10, 1 set. 2008.

JOH, D.; WANN, E. R.; KREIKEMEYER, B.; SPEZIALE, P.; HOOK, M. Role of fibronectin-binding MSCRAMMs in bacterial adherence and entry into mammalian cells. **Matrix Biology : Journal of the International Society for Matrix Biology**, v. 18, n. 3, p. 211–223, jun. 1999.

KAWAKAMI, T.; SHIBATA, S.; MURAYAMA, N.; NAGATA, M.; NISHIFUJI, K.; IWASAKI, T.; FUKATA, T. Antimicrobial susceptibility and methicillin resistance in *Staphylococcus pseudintermedius* and *Staphylococcus schleiferi* subsp. *coagulans* isolated from dogs with pyoderma in Japan. **The Journal of Veterinary Medical Science / the Japanese Society of Veterinary Science**, v. 72, n. 12, p. 1615–1619, dez. 2010.

KERN, A.; PERRETEN, V. Clinical and molecular features of methicillin-resistant, coagulase-negative staphylococci of pets and horses. **Journal Antimicrobbial Chemotherapy**, v. 68, n. 6, p. 1256–1266, Jun. 2003. doi: 10.1093/jac/dkt020. Epub 2013 Feb 20.

KLINE, K. A ; FÄLKER, S.; DAHLBERG, S.; NORMARK, S.; HENRIQUES-NORMARK, B. Bacterial adhesins in host-microbe interactions. **Cell host & Microbe**, v. 5, n. 6, p. 580–592, 18 jun. 2009.

KOUIDHI, B.; ZMANTAR, T.; HENTATI, H.; BAKHROUF, A. Cell surface hydrophobicity, biofilm formation, adhesives properties and molecular detection of

adhesins genes in *Staphylococcus aureus* associated to dental caries. **Microbial Pathogenesis**, v. 49, n. 1-2, p. 14–22, 2010.

KROEMER, S.; EL GARCH, F.; GALLAND, D.; PETIT, J. L.; WOHRLE, F.; BOULOUIS, H. J. Antibiotic susceptibility of bacteria isolated from infections in cats and dogs throughout Europe (2002-2009). **Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases**, v. 37, n. 2, p. 97–108, mar. 2014.

KUMAR, R.; YADAV, B. R.; ANAND, S. K.; SINGH, R. S. Prevalence of adhesin and toxin genes among isolates of *Staphylococcus aureus* obtained from mastitic cattle. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 27, n. 3, p. 513–521, 20 jun. 2010.

LILENBAUM, W.; ESTEVES, A.L.; SOUZA, G. N. , Prevalence and antimicrobial susceptibility of staphylococci isolated from saliva of clinically normal cats. **Letters Applied Microbiology**, v. 28, p. 448-452, 1999.

LOEFFLER, A.; PFEIFFER, D. U.; LINDSAY, J. A.; SOARES MAGALHAES, R. J.; LLOYD, D. H. Prevalence of and risk factors for MRSA carriage in companion animals: a survey of dogs, cats and horses. **Epidemiology and Infection**, v. 139, n. 7, p. 1019–28, 1 jul. 2011.

MANGIERI JUNIOR, R. **Mastite subclínica em rebanhos ovinos e elaboração de tratamento homeopático para prevenção e controle destas doenças**. 2010. Tese (Doutorado em Epidemiologia Experimental e Aplicada às Zoonoses) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, University of São Paulo, São Paulo, 2010. Disponível em: <<http://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/10/10134/tde-24032011-100133/>>. Acesso em: 1 jan. 2015.

MAY, E. R. Bacterial skin diseases: current thoughts on pathogenesis and management. **The Veterinary clinics of North America: small animal practice**, v. 36, n. 1, p. 185–202, jan. 2006.

MAY, E. R.; KINYON, J. M.; NOXON, J. O. Nasal carriage of *Staphylococcus schleiferi* from healthy dogs and dogs with otitis, pyoderma or both. **Veterinary Microbiology**, v. 160, n. 3-4, p. 443–8, dez. 2012.

MCEWAN, N. A.; KALNA, G.; MELLOR, D. A comparison of adherence by four strains of *Staphylococcus intermedius* and *Staphylococcus hominis* to canine corneocytes collected from normal dogs and dogs suffering from atopic dermatitis. **Research in Veterinary Science**, v. 78, n. 3, p. 193–8, jun. 2005.

MENDES, W. R. S. **Resistencia in vitro aos antimicrobianos de isolados de *Staphylococcus spp.*, associados a dermatites caninas**. 2011. 95 p. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) - Universidade Federal Fluminense, Fluminense, 2011.

MOODLEY, A.; DAMBORG, P.; NIELSEN, S. S. Antimicrobial resistance in methicillin susceptible and methicillin resistant *Staphylococcus pseudintermedius* of

canine origin: Literature review from 1980 to 2013. **Veterinary Microbiology**, v. 16, n. 3-4, p. 337-341, 18 fev. 2014.

MORGAN, M. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and animals: zoonosis or humanosis? **The Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 62, n. 6, p. 1181–1187, dez. 2008.

MURRAY, P. R.; BARON, E.; PFALLER, M. A.; TENOVER, F. C.; YOLKEN, R. H. **Manual of clinical microbiology**. 7. ed. Washington: Asm Press, 1999. p. 262-282.

NCCLS. **Performance standards for antimicrobial disk susceptibility tests; approved standard — Eighth Edition**. NCCLS document M2-A8 [ISBN 1-56238-485-6]. Wayne, Pennsylvania: NCCLS, 2003.

NIENHOFF, U.; KADLEC, K.; CHABEMY, I. F.; VERSPOHL, J.; GERLACH, G. F.; KREIENBROCK, L.; SCHWARZ, S.; SIMON, D. Methicillin-resistant *Staphylococcus pseudintermedius* among dogs admitted to a small animal hospital. **Veterinary microbiology**, v. 150, n. 1-2, p. 191–7, 12 maio 2011.

NUNES, S. F.; BEXIGA, R.; CAVACO, L. M.; VILELA, C. L. Technical note: Antimicrobial susceptibility of Portuguese isolates of *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis* in subclinical bovine mastitis. **Journal of Dairy Science**, v. 90, n. 7, p. 3242–6, jul. 2007.

O'MAHONY, R.; ABBOTT, Y.; LEONARD, F. C.; MARKEY, B. K.; QUINN, P. J.; POLLOCK, P. J.; FANNING, S.; ROSSNEY, A. S. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) isolated from animals and veterinary personnel in Ireland. **Veterinary Microbiology**, v. 109, n. 3-4, p. 285–96, ago. 2005.

ONNI, T.; SANNA, G.; LARSEN, J.; TOLA, S. Antimicrobial susceptibilities and population structure of *Staphylococcus epidermidis* associated with ovine mastitis. **Veterinary Microbiology**, v. 148, n. 1, p. 45-50, 2011.

PAPICH, M. G. Antimicrobials, susceptibility testing, and minimum inhibitory concentrations (MIC) in veterinary infection treatment. **The Veterinary Clinics of North America: small animal practice**, v. 43, n. 5, p. 1079–89, set. 2013.

PERRETEN, V.; KADLEC, K.; SCHWARZ, S.; GRONLUND ANDERSSON, U.; FINN, M.; GREKO, C.; MOODLEY, A.; KANIA, S. A.; FRANK, L. A.; BEMIS, K. D. A.; FRANCO, A.; LURESCIA, M.; BATTISTI, A.; DUIM, B.; WAGENAAR, J. A.; VAN DEUIJKEREN, E.; WEESE, J. S.; FITZGERALD, J. R.; ROSSANO, A.; GUARDABASSI, L. Clonal spread of methicillin-resistant *Staphylococcus pseudintermedius* in Europe and North America: an international multicentre study. **The Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 65, n. 6, p. 1145–54, jun. 2010.

PETON, V.; LE LOIR, Y. *Staphylococcus aureus* in veterinary medicine. **Infection, Genetics and Evolution : Journal of Molecular Epidemiology and Evolutionary Genetics in Infectious Diseases**, v. 21, p. 602–15, jan. 2014.

PODKOWIK, M.; PARK, J. Y.; SEO, K. S.; BYSTRON, J.; BANIA, J. Enterotoxigenic potential of coagulase-negative staphylococci. **International Journal of Food Microbiology**, v. 163, n. 1, p. 34–40, 15 abr. 2013.

ROHDE, H.; FRANKENBERGER, S.; ZAHRINGER, U.; MACK, D. Structure, function and contribution of polysaccharide intercellular adhesin (PIA) to *Staphylococcus epidermidis* biofilm formation and pathogenesis of biomaterial-associated infections. **European Journal of Cell Biology**, v. 89, n. 1, p. 103–11, jan. 2010.

ROTA, A.; MILANI, C.; DRIGO, I.; CORRO, M. Isolation of methicillin-resistant *Staphylococcus pseudintermedius* from breeding dogs. **Theriogenology**, v. 75, n. 1, p. 115–21, 1 jan. 2011.

RUBIN, J. E.; CHIRINO-TREJO, M. Prevalence, sites of colonization, and antimicrobial resistance among *staphylococcus pseudintermedius* isolated from healthy dogs in saskatoon, Canada. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v. 23, n. 2, p. 351–354, 1 mar. 2011.

SALABERRY, S. R. S. **Fatores de virulência de *Staphylococcus* spp. e viabilidade celular na mastite subclínica de cabras**. 2014. 81 f. Tese (Doutorado em Ciências) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2014.

SASAKI, T.; KIKUCHI, K.; TANAKA, Y.; TAKAHASHI, N.; KAMATA, S.; HIRAMATSU, K. Methicillin-resistant *Staphylococcus pseudintermedius* in a veterinary teaching hospital. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 45, n. 4, p. 1118–25, abr. 2007.

SCHOENFELDER, S. M. K.; LANGE, C.; ECKART, M.; HENNING, S.; KOZYTSKA, S.; ZIEBUHR, W. Success through diversity - how *Staphylococcus epidermidis* establishes as a nosocomial pathogen. **International Journal of Medical Microbiology** : IJMM, v. 300, n. 6, p. 380–6, ago. 2010.

SEO, Y.-S.; LEE, D. Y.; RAYMAHJI, N.; KANG, M. L.; YOO, H. S. Biofilm-forming associated genotypic and phenotypic characteristics of *Staphylococcus* spp. isolated from animals and air. **Research in Veterinary Science**, v. 85, n. 3, p. 433–8, dez. 2008.

SIMÕES, M.; SIMÕES, L. C.; VIEIRA, M. J. A review of current and emergent biofilm control strategies. **LWT - Food Science and Technology**, v. 43, n. 4, p. 573–583, maio 2010.

SIMPSON, K. H.; BOWDEN, M. G.; PEACOCK, S. J.; ARYA, M.; HOOK, M.; ANVARI, B. Adherence of *Staphylococcus aureus* fibronectin binding protein A mutants: an investigation using optical tweezers. **Biomolecular Engineering**, v. 21, n. 3-5, p. 105–11, nov. 2004.

SOARES, L. D. C.; PEREIRA, I. A.; COELHO, S. M. O.; CUNHA, C. M. M. da; OLIVEIRA, D. F. B. de; MIRANDA, A. N.; SOUZA, M. M. S. de. Caracterização fenotípica da resistência a antimicrobianos e detecção do gene *mecA* em *Staphylococcus* spp. coagulase-negativos isolados de amostras animais e humanas. **Ciência Rural**, v. 38, n. 5, p. 1346–1350, 2008.

SOLOAGA, R.; CORSO, A.; GAGETTI, P.; FACCONI, D.; GALAS, M. Detección de metilino-resistencia en *Staphylococcus aureus*: Comparación de métodos convencionales y aglutinación con mrsa-Screen latex. **Revista Argentina Microbiología**, v. 36, n. 1, p. 36-40, Mar 2004. ISSN 0325-7541.

TAVARES, W. Bactérias gram-positivas problemas: resistência do estafilococo, do enterococo e do pneumococo aos antimicrobianos. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 33, n. 3, p. 281-301, maio-jun, 2000.

THOMPSON, M. F.; LISTER, A. L.; PLATELL, J. L.; TROTT, D. J. Canine bacterial urinary tract infection: New developments in old pathogens. **Veterinary Journal**, v. 190, p. 22-27, 2011.

THORBERG, B.-M.; KUHN, I.; AARESTRUP, F. M.; BRANDSTRON, B.; JONSSON, P.; DANIELSSON-THAM, M. L. Pheno- and genotyping of *Staphylococcus epidermidis* isolated from bovine milk and human skin. **Veterinary Microbiology**, v. 115, n. 1-3, p. 163–72, 15 jun. 2006.

TRISTAN, A.; LUI YINH; BES, M.; ETIENNE, J.; VANDENESCH, F.; LINA, G. Use of Multiplex PCR To Identify *Staphylococcus aureus* Adhesins Involved in Human Hematogenous Infections. **Journal Clinical Microbiology**, v. 41, n. 9, p. 4465-4467, Sep 2003.

UMBER, J. K.; BENDER, J. B. Pets and antimicrobial resistance. **The Veterinary clinics of North America: small animal practice**, v. 39, n. 2, p. 279–92, mar. 2009.

VAN DUIJKEREN, E.; CATRY, B.; GREKO, C.; MORENO, M. A.; POMBA, M. C.; PYORALA, S.; RUZAUSKAS, M.; SANDERS, P.; THRELFALL, E. J.; TORREN-EDO, J.; TORNEKE, K.; SCIENTIFICA ADVISORY GROUP ON ANTIMICROBIALS. Review on methicillin-resistant *Staphylococcus pseudintermedius*. **The Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 66, n. 12, p. 2705–14, dez. 2011.

VANCRAEYNEST, D.; HERMANS, K.; HAESEBROUCK, F. Genotypic and phenotypic screening of high and low virulence *Staphylococcus aureus* isolates from rabbits for biofilm formation and MSCRAMMs. **Veterinary Microbiology**, v. 103, n. 3-4, p. 241–7, 15 nov. 2004.

VANNI, M.; BELAS, A.; COUTO, I.; PERRETEEN, V.; POMBA, C. Antimicrobial susceptibility of *Staphylococcus intermedius* and *Staphylococcus schleiferi* isolated from dogs. **Research in Veterinary Science**, v. 87, n. 2, p. 192–5, out. 2009.

VENGUST, M.; ANDERSON, M. E.; ROUSSEAU, J. WEESE, J. S. Methicillin-resistant staphylococcal colonization in clinically normal dogs and horses in the community. **Lettrs Applied Microbiology**, v. 43, n. 6, p. 602-606, Dec. 2006.

VUONG, C.; OTTO, M. Staphylococcus epidermidis infections. **Microbes and Infection / Institut Pasteur**, v. 4, n. 4, p. 481–9, abr. 2002.

WEDLEY, A. L.; DAWSON, S.; MADDOX, T. W.; COYNE, K. P.; PINCHBECK, G. L.; CLEGG, P.; JAMROZY, D.; FIELDER, M. D.; DONOVAN, D.; NUTTALL, T.; WILLIAMS, N. J. Carriage of Staphylococcus species in the veterinary visiting dog population in mainland UK: molecular characterisation of resistance and virulence. **Veterinary Microbiology**, v. 170, n. 1-2, p. 81–8, 14 maio 2014.

WEESE, J. S.; DICK, H.; WILLEY, B. M.; MCGEER, A.; KREISWIRTH, B. N.; INNIS, B.; LOW, D. E. Suspected transmission of methicillin-resistant Staphylococcus aureus between domestic pets and humans in veterinary clinics and in the household. **Veterinary Microbiology**, v. 115, n. 1-3, p. 148–55, jun. 2006.

WEESE, J. S.; VAN DUIJKEREN, E. Methicillin-resistant Staphylococcus aureus and Staphylococcus pseudintermedius in veterinary medicine. **Veterinary Microbiology**, v. 140, n. 3-4, p. 418–29, 27 jan. 2010.

WEISS, S.; KADLEC, K.; FESSLER, A. T.; SCHWARZ, S. Identification and characterization of methicillin-resistant Staphylococcus aureus, Staphylococcus epidermidis, Staphylococcus haemolyticus and Staphylococcus pettenkoferi from a small animal clinic. **Veterinary Microbiology**, v. 167, n. 3-4, p. 680–5, 27 dez. 2013.

ZECCONI, A.; SCALI, F. Staphylococcus aureus virulence factors in evasion from innate immune defenses in human and animal diseases. **Immunology Letters**, v. 150, n. 1-2, p. 12–22, fev. 2013.

ZIEBUHR, W.; HENNIG, S.; ECKART M.; KRANZLER, H.; BATZILLA, C.; KOZITSKAYA, S. Nosocomial infections by Staphylococcus epidermidis: how a commensal bacterium turns into a pathogen. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 28, p. S14–20, ago. 2006. Supplement, 1.

ZUBEIR, I. E.; KANBAR, T.; ALBER, J.; LAMMLER, C.; AKINEDEN, O.; WEISS, R.; ZSCHOCK, M. Phenotypic and genotypic characteristics of methicillin/oxacillin-resistant Staphylococcus intermedius isolated from clinical specimens during routine veterinary microbiological examinations. **Veterinary Microbiology**, v. 121, n. 1-2, p. 170–6, 31 mar. 2007.

ZUNIGA, E. **Pesquisa de genes codificadores de adesinas em Staphylococcus spp. isolados de mastite bovina**. 2012. 96 p. Dissertação (Mestrado em Epidemiologia Experimental Aplicada às Zoonoses) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2012. Disponível em: <<http://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/10/10134/tde-27112013-131110/>>. Acesso em: 2015-01-01.