

**ISOLAMENTO DE ESTAFILOCOCOS RESISTENTES A METICILINA E
PERFIL DE SUSCETIBILIDADE A ANTIMICROBIANOS DE CEPAS
ISOLADAS EM UM HOSPITAL VETERINÁRIO DE ENSINO NO BRASIL**

R.P. Maluta¹; A.E. Stella¹; A.C. Oliveira¹; E.C. Rigobelo²; M.V.F. Lemos¹; F.A. Avila¹

1. Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agropecuária, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, SP, Brasil

2. Unidade Experimental de Dracena, Universidade Estadual Paulista, Dracena, SP, Brasil

Apoio Financeiro: FAPESP, CNPq e CAPES

Resumo

O objetivo desse trabalho foi isolar estafilococos resistentes a meticilina (MRS) de humanos e cães e verificar os seus respectivos perfis de suscetibilidade a diversos antimicrobianos em um hospital veterinário de ensino no Brasil. Foram analisados espécimes de 50 pessoas e de 50 cães para isolamento de estafilococos que foram identificados através de características morfológicas, reações bioquímicas e resistência a antimicrobianos. Foi verificado o perfil de suscetibilidade a oxacilina, penicilina, ciprofloxacina, gentamicina, clindamicina, eritromicina, sulfametoxazol+trimetoprim e vancomicina. Não foram isolados *Staphylococcus aureus* resistentes a meticilina (MRSA) e *Staphylococcus intermedius* resistentes a meticilina (MRSI). Foram isoladas duas cepas de estafilococos coagulase-negativas resistentes a meticilina (MRCoNS) de cães (4%) e 18 cepas de MRCoNS de seres humanos (36%). Todas as cepas de estafilococos isoladas foram sensíveis a vancomicina. O isolamento de MRCoNS merece atenção devido à hipótese que estes podem transferir o gene *mecA* para estafilococos coagulase-positivos. A ausência de MRSA cepas resistentes a vancomicina é importante por ser este um antibiótico que pode ser usado como alternativa extrema. Programas de vigilância de MRS devem ser estimulados em unidades de saúde veterinárias.

Palavras-chave: cães, pessoal veterinário, nosocomial, resistência a meticilina, resistência a antimicrobianos, MRSA, *Staphylococcus*.

Introdução

Os estafilococos resistentes a meticilina (MRS) são importantes patógenos nosocomiais principalmente os resistentes a vários outros antimicrobianos. A proteína que se liga à penicilina (PBP2a) codificada pelo gene *MecA* é a responsável pela resistência a meticilina (Niemeyer *et al.* 1996; Chambers 1997; Gortel *et al.* 1999; NCCLS 2003a).

As cepas de *Staphylococcus aureus* resistentes a meticilina (MRSA) são há várias décadas estudadas em unidades de saúde para seres humanos e há alguns anos tem sido isoladas a partir de unidades veterinárias em diversos países do mundo como o Canadá (Weese *et al.* 2004, 2006); EUA (Seguin *et al.* 1999; Middleton *et al.* 2005); Irlanda (O'Mahony *et al.* 2005); Inglaterra (Baptiste *et al.* 2005, Loeffler *et al.* 2005) e Áustria (Cuny *et al.* 2006). Em um estudo realizado com cães e equinos saudáveis da comunidade na Eslovênia foram isolados estafilococos coagulase-negativos resistentes a meticilina (MRCoNS) e *Staphylococcus intermedius* resistentes a meticilina (MRSI) (Vengust *et al.* 2006). Na Dinamarca foram isoladas cepas de MRCoNS de cães e equinos (Bagcigil *et al.* 2007).

É provável a transmissão de estafilococos resistentes a meticilina entre os animais e o homem (Seguin *et al.* 1999; Manian 2003; van Duijkeren *et al.* 2004a; Baptiste *et al.* 2005; Weese *et al.* 2006). Durante um congresso veterinário, nos EUA, foram isoladas cepas de MRSA do pessoal veterinário de diversos países (Hanselman *et al.* 2006). Na Holanda foi demonstrado que os veterinários apresentam alto risco de se tornarem portadores de MRSA (Wulf *et al.* 2006). Todos esses fatos mostram que a

infecção por MRSA pode se tornar uma doença ocupacional como já foi sugerido anteriormente (Hanselman *et al.* 2006).

Embora *Staph. intermedius* seja classicamente a principal espécie de estafilococo coagulase-positiva isolado de cães, estudos recentes relatam cepas de *Staph. aureus* (particularmente MRSA) em cães (van Duijkeren *et al.* 2004b; Baptiste *et al.* 2005; O'Mahony *et al.* 2005; Weese *et al.* 2006).

Cada vez mais a presença de MRSA se torna comum em comunidades humanas e parece que isso se reflete nos também nos animais, com isso, pode-se aumentar as chances de acontecerem doenças tanto em animais quanto em seres humanos e dificultar o controle desse patógeno. (Weese *et al.* 2006). Os cães podem atuar como reservatórios de MRSA e apresentar um risco para a saúde animal e para a saúde pública (Baptiste *et al.* 2005; Weese *et al.* 2006).

As quinolonas e cefalosporinas são amplamente utilizadas tanto em medicina humana quanto em medicina veterinária, entretanto cepas de MRS são muitas vezes resistentes a estes e a outros antimicrobianos dificultando o tratamento das infecções causadas por esses microrganismos, a vancomicina é muitas vezes a última opção para combater essas infecções.

A ausência de estudos relacionados à prevalência de MRS em unidades veterinárias da América do Sul torna relevante o presente trabalho com o objetivo de isolar estafilococos resistentes a metilina e verificar os seus respectivos perfis de suscetibilidade a diversos antimicrobianos, notadamente a vancomicina.

Material e métodos

População estudada

Foram analisados 50 cães e 50 pessoas (estudantes, funcionários e veterinários) somente no setor de pequenos animais de um único hospital veterinário de ensino na cidade de Jaboticabal, Estado de São Paulo, Brasil. Essa amostragem representa aproximadamente 95% e 90% da população de cães e pessoas respectivamente nesse hospital. As amostras foram colhidas em um único dia em Janeiro de 2007. Esse estudo foi autorizado pela comissão de ética e bem-estar animal da Universidade Estadual Paulista.

Coleta das amostras

Foram colhidos um suabe das narinas (introduzindo dentro das narinas) e um suabe das mãos (passando na palma da mão e entre os dedos) de cada pessoa; e um suabe das narinas (introduzindo nas narinas) e um suabe na pele da região perineal (passando na pele e nos pêlos) de cada cão (Vengust *et al.* 2006). Os suabes foram depositados em tubos com caldo BHI (Oxoid) contendo 6% de NaCl (utilizado como meio de enriquecimento) e processados.

Isolamento e identificação

Os tubos contendo caldo de enriquecimento com os suabes foram incubados aerobicamente a 35°C por 48 horas e em seguida o seu conteúdo foi semeado em Ágar Staphylococcus Medium 110 (Difco) aerobicamente a 35°C por 48h. Foram colhidas três colônias suspeitas de cada placa e identificadas através da coloração de Gram; teste de resistência a furazolidona, bacitracina e polimixina B (Disco-Difusão); fermentação do manitol, maltose e trealose; produção de catalase, DNAse, acetoína e coagulase em tubo e em lâmina (KONEMAN *et al.* 1997) Os estafilococos coagulase-positivos foram diferenciados em *Staph. aureus*; *Staph. intermedius* e *Staphylococcus schleiferi* subsp. *coagulans*. Os estafilococos coagulase-negativos foram diferenciados em *Staphylococcus epidermidis* e outros estafilococos coagulase-negativos (HOLT *et al.* 1994; KLOOS and BANNERMAN 1999). Cepas de estafilococos diferentes isoladas do mesmo portador (homem ou cão) foram diferenciadas em função de suas características bioquímicas e seu perfil de resistência a diversos antimicrobianos.

Sensibilidade a antimicrobianos

Todas as cepas de estafilococos isoladas e identificadas foram submetidas a teste de sensibilidade frente aos seguintes antimicrobianos utilizando um método de disco-difusão em Ágar Muller-Hinton (Oxoid): penicilina (10UI), oxacilina (1µg), ciprofloxacina (5µg), gentamicina (10µg), clindamicina (2µg), eritromicina (15µg),

sulfametoxazol+trimetoprim (25µg) e vancomicina (30µg) (NCCLS 2003b). Adicionalmente foi realizado um teste de Concentração Inibitória Mínima (CIM) utilizando o método de macrodiluição em caldo para confirmar a resistência a vancomicina em todas as cepas (NCCLS 2003a). Os diâmetros dos halos de inibição e o resultado do teste de CIM foram comparados com o guia (CLSI 2005). Foi utilizada uma reação de PCR para detecção de um fragmento do gene *MecA* para confirmar a resistência a meticilina em todas as cepas (Gortel *et al.* 1999).

Resultados

Foram encontradas 20 cepas de estafilococos que apresentaram a presença do gene *MecA* por PCR, todos coagulase-negativos (MRCoNS), estas foram encontrados nas amostras de 2/50 cães (4%) e 18/50 seres humanos (36%). Não foram isoladas cepas de MRSA e MRSI. Não foi isolada cepa alguma de *Staph. schleiferi* subsp. *coagulans*. Não foram isoladas cepas de *Staph. intermedius* em humanos e de *Staph. aureus* em cães. Nenhuma cepa de MRS foi considerada resistente à vancomicina utilizando-se a CIM. A tabela 1 um demonstra o perfil de suscetibilidade e a identificação das espécies das cepas de MRS isoladas de cães e pessoas

Tabela 1 Classificação e determinação da suscetibilidade das 20 cepas de estafilococos resistentes a meticilina *†

Nº	Espécie	Fonte	Local	ERI	CLI	GEN	CIP	SUT	PEN	VAN
1	<i>S. epidermidis</i>	Cão	Pele	R	S	R	S	R	R	S
2	<i>S. simulans</i>	Cão	Pele	I	R	S	S	S	R	S
3	<i>S. epidermidis</i>	Humano	Narina	R	R	R	R	R	R	S
4	<i>S. epidermidis</i>	Humano	Narina	R	R	R	R	S	R	S
5	<i>S. epidermidis</i>	Humano	Narina	R	R	R	I	S	R	S
6	<i>S. epidermidis</i>	Humano	Narina	I	I	R	R	R	R	S
7	<i>S. epidermidis</i>	Humano	Narina	R	R	I	R	S	R	S
8	<i>S. epidermidis</i>	Humano	Narina	R	I	S	R	S	R	S
9	<i>S. epidermidis</i>	Humano	Narina	R	I	R	S	S	R	S
10	<i>S. epidermidis</i>	Humano	Narina	R	I	R	S	S	R	S
11	<i>S. epidermidis</i>	Humano	Narina	R	I	R	I	S	R	S
12	<i>S. epidermidis</i>	Humano	Narina	R	I	S	R	S	R	S
13	<i>S. epidermidis</i>	Humano	Narina	R	S	S	S	S	R	S
14	<i>S. epidermidis</i>	Humano	Narina	R	I	S	S	S	R	S
15	<i>S. epidermidis</i>	Humano	Narina	I	I	S	S	S	R	S
16	<i>S. epidermidis</i>	Humano	Narina	I	I	I	S	S	R	S
17	<i>S. epidermidis</i>	Humano	Narina	I	I	S	S	S	R	S
18	<i>S. epidermidis</i>	Humano	Pele	R	I	I	I	S	R	S
19	<i>S. epidermidis</i>	Humano	Pele	R	I	S	S	R	R	S
20	<i>S. epidermidis</i>	Humano	Pele	I	S	S	S	S	R	S

* Eritromicina (ERI), Clindamicina (CLI), Gentamicina (GEN), Ciprofloxacina (CIP), Sulfametoxazol + Trimetoprim (SUT), Penicilina (PEN) e Vancomicina (VAN)

† R - resistente, I - intermediário, S – susceptível

Discussão

O fato de não ter sido encontradas cepas de MRSA em humanos e cães nesse hospital veterinário é importante, entretanto, mais estudos devem ser feitos em outros hospitais veterinários no Brasil para se ter mais dados sobre prevalência de MRS para serem comparados com dados de outros países. Um dos motivos para se justificar a ausência

de MRSA em cães pode ser o fato de que nos diferentes estudos que isolaram MRSA de cães as cepas foram isoladas a partir de espécimes clínicos (Gortel *et al.* 1999; van Duijkeren *et al.* 2004b) enquanto nesse estudo as cepas foram isoladas a partir de animais sem infecções estafilocócicas. Na Eslovênia não foram encontradas cepas de MRSA a partir de cães saudáveis (Vengust *et al.* 2006) e em dois estudos considerando somente os cães que visitaram hospitais veterinários (não espécimes clínicos), não foi encontrado MRSA (Baptiste *et al.* 2005, Bacgicil *et al.*, 2007). Esses fatos mostram que talvez seja mais fácil isolar MRSA de espécimes clínicos do que de regiões colonizáveis (pele e narina) nos cães.

O percentual de isolamento de MRCoNS dos cães nesse estudo (4%) foi semelhante ao percentual de isolamento de MRS em espécimes clínicos de diversos animais (3,2%) (van Duijkeren *et al.* 2004b), semelhante ao percentual de MRCoNS encontrado em cães de um hospital veterinário na Inglaterra (6%) (Baptiste *et al.* 2005) mas diferente do percentual de MRCoNS isolado de cães saudáveis na Eslovênia (11,5%) (Vengust *et al.* 2006) e cães atendidos em um hospital veterinário na Dinamarca (13%) (Bacgicil *et al.* 2007). Em eqüinos existe a hipótese de que MRCoNS poderiam competir melhor com estafilococos coagulase-negativas sensíveis a meticilina fora do ambiente no qual antimicrobianos estão presentes e assim aumentarem a sua prevalência (Baptiste *et al.* 2005) mas em cães isso não parece acontecer pois os mesmos autores encontraram uma prevalência pouco menor de MRCoNS (5%) nos cães da comunidade em relação aos cães que visitam hospitais.

A ausência de dados sobre a prevalência de MRCoNS em portadores humanos em hospitais veterinários dificulta a comparação do nível de prevalência encontrado nesse estudo. Entretanto, em hospitais humanos essa prevalência varia muito o que

pode também acontecer em hospitais veterinários. A frequência de isolamento nesse estudo dos humanos (36%) comparada a dos cães (4%) sugere que a colonização humana é mais fácil em relação à canina, além disso o fato das espécies de MRCoNS isoladas serem diferentes sugere que não houve transmissão das cepas entre humanos e cães e vice-versa.

A ausência de cepas resistentes a vancomicina foi semelhante a estudos anteriores realizados com cães (Gortel *et al.* 1999) e vários animais (van Duijkeren *et al.* 2004b) o que é extremamente importante pois a vancomicina é uma droga de referência para o combate a infecções causadas por MRSA (Weese 2005).

Depois da vancomicina (0%) a droga que apresentou menor nível de resistência entre todos MRS foi o sulfametoxazol+trimetoprim (20%) resultado menor do que o encontrado em outro estudo realizado somente com isolados de cães (39%) (Gortel *et al.* 1999). Esta associação de quimioterápicos tem sido usada no tratamento de infecção por MRSA resistentes a vancomicina o que torna importante a vigilância nos níveis de resistência desses antimicrobianos (Weese 2005).

O nível de suscetibilidade dos MRS nesse estudo frente a ciprofloxacina (55%) foi semelhante ao do trabalho realizado somente com isolados de cães (57%) (Gortel *et al.* 1999) e embora não demonstre aumento no perfil de resistência causa preocupação pois as quinolonas tem sido largamente utilizadas na prática veterinária e a diminuição na sua eficiência pode comprometer o tratamento das doenças de origem bacteriana, além disso juntamente com as cefalosporinas (também muito utilizadas) poderiam auxiliar a seleção e o conseqüente aparecimento de MRSA (Loeffler *et al.* 2005).

A ausência de cepas de MRCoNS sensíveis à eritromicina nesse estudo difere do nível de resistência à eritromicina a partir do estudo de MRS somente com cães

(78%) (Gortel *et al.* 1999) e do estudo com várias espécies de MRCoNS isolados de cães e equinos (0-50%) (Bagcigil *et al.* 2007). É um dado intrigante pois nesse hospital o uso de macrolídeos não é amplo, portanto essas cepas poderiam ter origem extra-hospitalar.

O fato de terem sido encontradas cepas de MRCoNS multirresistentes não é surpresa uma vez que esse fato já foi documentado em amostras provenientes de animais (van Duijkeren *et al.* 2004b), o que leva a pensar que o uso de vários antimicrobianos auxilie a seleção de MRCoNS multirresistentes. Uma vez que os estafilococos coagulase-negativos são os agentes etiológicos mais comuns implicados em infecções nosocomiais associadas ao uso de catéteres venosos centrais em hospitais humanos (Casey *et al.* 2006) a hipotética transmissão de MRCoNS multiresistentes dos cães para o homem poderia ser perigosa.

É possível que as cepas de MRCoNS tenham sido originadas no próprio hospital (através de pressão seletiva) ou trazidas até o hospital oriundas da comunidade ou de hospitais humanos. Estudos realizados demonstram que algumas cepas de MRSA isoladas de cães e humanos, em unidades veterinárias, são geneticamente parecidas com aquela cepa epidêmica EMRSA-15 isolada de humano predominante no Reino Unido (Baptiste *et al.* 2005; O'Mahony *et al.* 2005) ou geneticamente diversas sugerindo que tenham sido adquiridas a partir da comunidade (Middleton *et al.* 2005). Outrossim, não é sabido se o mesmo pode ser afirmado para MRCoNS embora isso seja importante, pois hipoteticamente as cepas de CoNS, portadoras do gene *MecA*, poderiam transmitir essa característica para cepas comensais de *Staph. aureus* (Chambers 1997, Vengust *et al.* 2006).

Programas de vigilância de agentes causadores de infecções nosocomiais já existem a muitos anos em hospitais humanos e devem ser estimulado em hospitais veterinários, pois a emergência de cepas multirresistentes nesse ambiente ocasiona um provável perigo à saúde pública e a saúde animal.

Agradecimentos

Nós gostaríamos de agradecer a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (Capes) pela bolsa de estudos fornecida e o Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo suporte financeiro a esse trabalho.

Referências

Baptiste, K.E., Williams, K., Willams, N.J., Wattret, A., Clegg, P.D., Dawson, S., Corkill, J.E., O'Neill, T. *et al.* (2005) Methicillin-resistant staphylococci in companion animals. *Emerg Infect Dis* **11**, 1942-1944.

Bagcigil, F.A., Moodley, A., Baptiste, K.E., Jensen, V.F. and Guardabassi, L. (2007) Occurrence, species distribution, antimicrobial resistance and clonality methicillin- and erythromycin-resistant staphylococci in the nasal cavity of domestic animals. *Vet Microbiol* **121**, 307-315.

Casey, A.L., Worthington, T., Caddick, J.M., Hilton, A.C., Lambert, P.A. and Elliott, T.S.J. (2006) RAPD for the typing of coagulase-negative staphylococci implicated in catheter-related bloodstream infection. *J Infect* **52**, 282-289.

Chambers, H.F. (1997) Methicillin resistance in staphylococci: molecular and biochemical basis and clinical implications. *Clin Microbiol Rev* **10**, 781-791.

Clinical and Laboratory Standards Institute/NCCLS. (2005). *Performance standards for antimicrobial susceptibility testing*. Document M100-S15. Wayne PA: NCCLS.

Cuny, C., Kuemmerle, J., Stanek, C., Willey, B., Strommenger, B. and Witte, W. (2006) Emergence of MRSA infections in horses in a veterinary hospital: strain characterisation and comparison with MRSA from humans. *Euro Surveill* **11**, 44-47.

van Duijkeren, E., Wolfhagen, M.J., Box, A.T., Heck, M.E., Wannet, W.J. and Fluit, A.C. (2004a) Human-to-dog transmission of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Emerg Infect Dis* **10**, 2235-2237.

van Duijkeren, E., Box, A.T., Heck, M.E., Wannet, W.J. and Fluit, A.C. (2004b) Methicillin-resistant staphylococci isolated from animals. *Vet Microbiol* **103**, 91-97.

Gortel, K., Campbell, K.L., Kakoma, I., Whitem, T., Schaeffer, D.J. and Weisiger, R.M. (1999) Methicillin resistance among staphylococci isolated from dogs. *Am J Vet Res* **60**, 1526-1530.

Middleton, J.R., Fales, W.H., Luby, C.D., Oaks, J.L., Sanchez, S., Kinyon, J.M., Wu, C.C., Maddox, C.W. *et al.* (2005) Surveillance of *Staphylococcus aureus* in veterinary teaching hospitals. *J Clin Microbiol* **43**, 2916-2919.

National Committee for Clinical Laboratory Standards. (2003a). *Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically. Approved standards. Document M7-A6.* Wayne, PA: NCCLS.

National Committee for Clinical Laboratory Standards. (2003b). *Performance standards for antimicrobial disk susceptibility tests. Approved standards. Document M2-A8.* Wayne, PA: NCCLS.

Niemeyer D.M., Pucci, M.J., Thanassi, J.A., Sharma, V.K., Archer, V.L. (1996) Role of *mecA* transcriptional regulation in the phenotypic expression of methicillin resistance in *Staphylococcus aureus*. *J Bacteriol* **18**, 5464-5471.

O'Mahony, R., Abbott, Y., Leonard, F.C., Markey, B.K., Quinn, P.J., Pollock, P.J., Fanning, S. and Rossney, A.S. (2005) Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) isolated from animals and veterinary personnel in Ireland. *Vet Microbiol* **109**, 285-296.

Seguin, J.C., Walker, R.D.; Caron, J.P.; Kloos, W.E.; George, C.G., Hollis, R.J., Jones, R.N. and Pfaller, M.A. (1999) Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Outbreak in a

Veterinary Teaching Hospital: Potential Human-to-Animal Transmission. *J Clin Microbiol* **37**, 1459-1463.

Vengust, M., Anderson, M.E., Rousseau, J. and Weese, J.S. (2006) Methicillin-Resistant staphylococcal colonization in clinically normal dogs and horses in the community. (2006) *Lett Appl Microbiol* **43**, 602-606.

Weese, J.S., DaCosta, T., Button, L., Goth, K., Ethier, M. and Boehnke, K. (2004) Isolation of Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* from the environment in a veterinary teaching hospital *J Vet Intern Med* **18**, 468-470.

Weese, J.S. (2005) Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: An emerging pathogen in small animals *J Am Anim Hosp Assoc* **41**, 150-157.

Weese, J.S., Dick, H., Willey, B.M, McGeer, A., Kreiswirth, B.N., Innis, B. and Low, D.E. (2006) Suspected transmission of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* between domestic pets and humans in veterinary clinics and in the household. *Vet Microbiol* **115**, 148-155.

Wulf, M., van Nes, A., Eikelenboom-Boskamp, A., de Vries, J., Melchers, W., Klaassen, C. and Voss, A. (2006) Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in veterinary doctors and students, the Netherlands. *Emerg Infect Dis* **12**, 1939-1941.