



UNIVERSIDADE FEDERAL DE  
CAMPINA GRANDE

---

CENTRO DE SAÚDE E TECNOLOGIA RURAL

CAMPUS DE PATOS – PB

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA VETERINÁRIA

RESISTÊNCIA À METICILINA EM ESTAFILOCOCOS COAGULASE POSITIVOS E  
NEGATIVOS CAUSADORES DE INFECÇÕES EM ANIMAIS DE COMPANHIA E  
ANIMAIS DE PRODUÇÃO

RODRIGO ANTÔNIO TORRES MATOS

PATOS – PB  
2014



UNIVERSIDADE FEDERAL DE  
CAMPINA GRANDE

---

CENTRO DE SAÚDE E TECNOLOGIA RURAL

CAMPUS DE PATOS – PB

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA VETERINÁRIA

RESISTÊNCIA À METICILINA EM ESTAFILOCOCOS COAGULASE POSITIVOS E  
NEGATIVOS CAUSADORES DE INFECÇÕES EM ANIMAIS DE COMPANHIA E  
ANIMAIS DE PRODUÇÃO

Dissertação apresentada à Universidade Federal  
de Campina Grande-UFCG em cumprimento do  
requisito necessário para obtenção do título de  
Mestre em Medicina Veterinária.

RODRIGO ANTÔNIO TORRES MATOS

Orientador: Prof. Dr. Felício Garino Junior

Co-orientador: Prof. Dr. Celso José Bruno de Oliveira

PATOS – PB  
2014

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA BIBLIOTECA DO CSRT DA UFCG

M433r      Matos, Rodrigo Antônio Torres.  
Resistência à metilina em estafilococos coagulase positivos e negativos causadores de infecções em animais de companhia e animais de produção / Rodrigo Antônio Torres Matos. – Patos, 2014.  
65f.

Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) – Universidade Federal de Campina Grande, Centro de Saúde e Tecnologia Rural, 2014.

“Orientação: Prof. Dr. Felício Garino Junior”  
“Coorientação: Prof. Dr. Celso José Bruno de Oliveira”

Referências.

1. *Staphylococcus* spp. 2. Saúde animal. 3. Gene *mecA*  
I. Título.

CDU 614.9: 616.9

RODRIGO ANTÔNIO TORRES MATOS

RESISTÊNCIA À METICILINA EM ESTAFILOCOCOS COAGULASE POSITIVOS E  
NEGATIVOS CAUSADORES DE INFECÇÕES EM ANIMAIS DE COMPANHIA E  
ANIMAIS DE PRODUÇÃO

Dissertação aprovada pela comissão examinadora em:

Comissão Examinadora:

---

Prof. Dr. Felício Garino Junior  
Unidade Acadêmica de Medicina Veterinária CSTR/UFCG

---

Prof. Dra. Sara Vilar Dantas Simões  
Unidade Acadêmica de Medicina Veterinária CSTR/UFCG

---

Prof. Dr. Mateus Matiuzzi da Costa  
Colegiado de Zootecnia UNIVASF

## AGRADECIMENTOS

A Deus, fonte inesgotável de amor e sabedoria, que me concedeu o dom da vida, saúde, inteligência necessárias à assimilação constante de novos conhecimentos.

Aos meus pais, Roberto e Telma, batalhadores incansáveis, pelo amor incondicional e por estarem sempre ao meu lado, orientando-me, apoiando as minhas decisões e torcendo pelo meu sucesso durante toda a minha trajetória estudantil.

Aos meus irmãos, Romildo e Roberta, que sempre foram meus constantes incentivadores.

Aos meus avós, Mário e Torres (in memoriam) e Zélia, pelos sábios conselhos e pelo apoio irrestrito durante a minha vida acadêmica.

Aos meus tios, Beto e Alice, Laura e Vanda que acreditaram no meu potencial e aguardavam essa vitória.

Aos meus amigos, Max, Bruno (Bua), Tiago (Galego), Carol, Rafael (Anjinho), Fernando (Vareta), Gustavo, Rudá, Juliano, George, João, Écio, Thiago, João Fernando, Lucas, pelas palavras de apoio e incentivo durante toda essa jornada.

Aos meus compadres, Júlio e Lara e a minha afilhada Tarsila, pela fé, confiança em mim depositadas e por serem meu sustentáculo nos momentos mais difíceis durante minha permanência em Patos. Vocês são a minha família de coração.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Felício Garino Junior, pela paciência, amizade e pelos ensinamentos valiosos. Nunca me esquecerei de você, grande mestre.

A todos os competentes professores do Programa de Pós-graduação em Medicina Veterinária da Universidade Federal de Campina Grande, especialmente à professora Sara, prof. Almir, prof. Sérgio e prof. Antônio Flávio, pelos conhecimentos adquiridos e sábias orientações.

Aos meus colegas de Laboratório, Altamir, Dani, Layze, Meire, Sílvia pelo apoio diário, companheirismo e pela amizade.

A todos os meus colegas do Programa de Pós-graduação em Medicina Veterinária da Universidade Federal de Campina Grande, pela troca de conhecimentos e pelo convívio fraterno e saudável.

Ao professor Celso, da Universidade Federal da Paraíba, pela imprescindível colaboração no tocante à etapa do projeto relativa à Biologia Molecular, permitindo-me livre acesso ao Laboratório de Produtos de Origem Animal e por ser um dos meus principais incentivadores.

Aos alunos do Programa de Pós-graduação em Zootecnia da Universidade Federal da Paraíba, Geovânia, Mauro, Silvana, Denis e a técnica de laboratório Juliana pela parceria, colaboração e conhecimentos adquiridos.

À amiga Candice, da Universidade Federal da Paraíba, pela amizade e parceria, por ter me ensinado a trabalhar com a Biologia Molecular, por ter acreditado na minha competência.

## RESUMO

Buscou-se com este trabalho revisar os principais estudos referentes à ocorrência e prevalência de *Staphylococcus aureus* resistentes à meticilina (MRSA) em animais de companhia e de produção e avaliar o perfil de resistência dos 114 *Staphylococcus* spp. isolados de infecções clínicas. O *Staphylococcus aureus* é um importante patógeno em medicina veterinária. *S. aureus* resistente à meticilina (MRSA) emergiu nas últimas décadas como patógeno nosocomial e como causador de infecções em medicina veterinária. Em animais, o MRSA tem sido isolado em várias espécies, principalmente de animais domésticos, sendo estes considerados como reservatório deste patógeno, além de servir de fonte de infecção para humanos. O MRSA em medicina veterinária teve um acréscimo significativo no número de pesquisas realizadas em vários países. A resistência à meticilina pode ocorrer tanto em *Staphylococcus* coagulase negativos quanto em *Staphylococcus* coagulase positivos. O fenômeno da resistência aos antimicrobianos apresentado por espécies de *Staphylococcus* spp. em animais tem sido considerado um problema crescente em medicina veterinária. Neste trabalho foram avaliados: o perfil de resistência através do método de difusão em disco, a produção de betalactamases e detecção do gene *mecA* através de PCR de 114 *Staphylococcus* spp. isolados de animais de produção e animais de companhia atendidos em Hospital Veterinário de Ensino no Brasil. Os maiores índices de resistência aos fármacos avaliados foram para penicilina (70,18%) e ampicilina (67,54%). No teste para detecção da enzima betalactamase foram verificados 60 (52,63%) dos *Staphylococcus* positivos. O gene *mecA* foi diagnosticado em 17 (14,91%) dos isolados avaliados, sendo dois de caninos, um de felino e 14 de bovinos. Os resultados permitiram concluir que a resistência para penicilina e ampicilina é alta nos *Staphylococcus* avaliados, e que a produção de betalactamase foi considerada o principal mecanismo de resistência apresentado por estes microrganismos. Apesar do gene *mecA* ter baixa ocorrência neste estudo, existe a necessidade de um monitoramento constante em estirpes isoladas de animais domésticos.

Palavras-chave: *Staphylococcus aureus* resistente à meticilina, *Staphylococcus* spp., animais domésticos, animais de companhia, animais de produção, gene *mecA*

## **ABSTRACT**

This paper aimed to review the main national and international studies on the occurrence and prevalence of Methicillin-resistant *S. aureus* (MRSA) in companion animals and in farm animals and to assess the resistance profile of 114 *Staphylococcus* isolated from clinical infections. The *Staphylococcus aureus* is an important pathogen in veterinary medicine. Methicillin-resistant *S. aureus* (MRSA) has emerged in recent decades as a nosocomial pathogen and as a cause of veterinary medicine infections. In animals, MRSA have been isolated in several species, mainly of domestic animals, which are considered as a reservoir of this pathogen, in addition to being a source of infection to humans. There has been a significant increase in the number of studies on MRSA in veterinary medicine in various countries. The methicillin resistance can occur in both negative coagulase *Staphylococcus* as for positive coagulase *Staphylococcus*. The phenomenon of antimicrobial resistance demonstrated by species of *Staphylococcus* spp. in animals is considered a major problem in veterinary medicine. The following assessments were made in the present study: resistance profile using the disc diffusion method, production of beta-lactamases and detection of *mecA* gene by PCR of 114 *Staphylococcus* spp. isolated from companion animals and farm animals treated at the veterinary teaching hospital in Brazil. The highest rates of resistance to the assessed drugs were as follows: penicillin (70.18%) and ampicillin (67.54%). In the test for detection of beta-lactamase enzyme 60 (52.63%) positive *Staphylococci* were detected. The *mecA* gene was diagnosed in 17 (14.91%) of the isolates, being two dogs, one cat and fourteen bovine. The results allowed concluding that resistance to penicillin and ampicillin is high in the assessed *Staphylococci*, and that the production of beta-lactamase was considered the main mechanism of resistance of these microorganisms. Despite the low occurrence of the *mecA* gene in this study, constant monitoring in strains isolated from domestic animals is needed.

**Keywords:** Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus* spp., domestic animals, companion animals, farm animals, *mecA* gene

## LISTA DE SÍMBOLOS, SIGLAS E ABREVIACÕES

**AC-** Ágar cromogênico

**ASO-** Ágar Screening com Oxacilina

**CIM-** Concentração Inibitória mínima

**CLSI-** Clinical and Laboratory Standards Institute

**CoNS-** *Staphylococcus* coagulase negativos

**CSTR-** Centro de Saúde e Tecnologia Rural

**DDO-** Disco difusão com oxacilina

**MRS-** *Staphylococcus* resistentes à metilina

**MRCoNS-** *Staphylococcus* coagulase negativos resistentes à metilina

**MRSA-** *Staphylococcus aureus* resistentes a metilina

**MS-** Meio seletivo para MRSA

**PCR-** Reação de Cadeia de Polimerase

**SCP-** *Staphylococcus* coagulase positivos

**SCN-** *Staphylococcus* coagulase negativos

**TAL-** Teste de Aglutinação em Látex

**UFCG-** Universidade Federal de Campina Grande

## LISTA DE TABELAS

### CAPITULO I

Tabela 1- Estudos de *Staphylococcus aureus* resistentes à meticilina realizados em animais de produção em diversos países.....31

Tabela 2: Estudos de *Staphylococcus aureus* resistentes à meticilina realizados em animais de companhia de diversos países.....34

Tabela 3- Estudos de *Staphylococcus aureus* resistentes à meticilina realizados em animais de companhia e animais de produção no Brasil.....36

### CAPITULO II

Tabela 1- Espécies de *Staphylococcus* spp. isolados de infecções em animais de companhia e animais de produção atendidos em Hospital Veterinário de Ensino no Brasil.....50

Tabela 2- Porcentagem de resistência aos antimicrobianos dos 114 *Staphylococcus* spp. isolados de infecções em animais de companhia e animais de produção atendidos em Hospital Veterinário de Ensino no Brasil.....51

Tabela 3- Resultados de testes fenotípicos e genotípicos dos 114 *Staphylococcus* spp. isolados de infecções em animais de companhia e animais de produção em Hospital Veterinário de Ensino no Brasil.....52

## SUMÁRIO

<b>INTRODUÇÃO GERAL</b> .....	11
<b>CAPÍTULO I - Revisão de literatura: MRSA em animais de produção e animais de companhia</b> .....	12
Resumo.....	13
Abstract.....	13
Introdução.....	14
Resistência aos antimicrobianos.....	14
MRSA em Animais domésticos.....	15
MRSA em animais de produção.....	16
MRSA em animais de companhia.....	19
MRSA isolados de animais no Brasil.....	20
Conclusão.....	21
Referências.....	22
<b>CAPÍTULO II – Resistência à metilina em estafilococos coagulase positivos e negativos causadores de infecções em animais de companhia e animais de produção</b> .....	37
Resumo.....	38
Abstract.....	39
Introdução.....	39
Material e Métodos.....	40
Resultados e Discussão.....	44
Conclusão.....	46
Referências.....	47
<b>CONCLUSÃO GERAL</b> .....	53
<b>ANEXOS</b> .....	54

## INTRODUÇÃO GERAL

A resistência à meticilina apresentada pelos *Staphylococcus* spp. tem sido pesquisada em todas as espécies e pouco relatada em caprinos e ovinos. Devido à importância desses agentes em infecções comunitárias e hospitalares, buscou-se nesta dissertação, a qual está apresentada em dois capítulos, revisar os principais estudos de *Staphylococcus aureus* resistentes à meticilina (MRSA) e avaliar a presença do gene *mecA* em *Staphylococcus* spp. isolados de animais.

O capítulo I consta de uma revisão de literatura contendo informações sobre a ocorrência e diagnóstico de *Staphylococcus aureus* meticilina resistente (MRSA) em animais de companhia e animais de produção. Foram abordados nesse capítulo informações dos estudos, realizados em vários países, em relação a prevalência e ocorrência do gene *mecA*.

No capítulo II estão apresentados os resultados de pesquisa referente aos *Staphylococcus* spp. isolados de animais atendidos pelo Hospital Veterinário da Universidade Federal de Campina Grande (UFCG). Neste trabalho, buscou-se caracterizar espécies de *Staphylococcus* resistentes à meticilina através de métodos de diagnóstico fenotípicos e genotípicos.

**CAPÍTULO I**  
**MRSA em animais de produção e animais de companhia**  
**-Revisão Bibliográfica-**

O presente trabalho está formatado nas normas da Revista Ciência Rural e será submetido para publicação

**MRSA em animais de produção e animais de companhia**  
**MRSA in farm animals and companion animals**

**-REVISÃO BIBLIOGRÁFICA-**

Rodrigo Antônio Torres Matos, Felício Garino Junior e Julio Cesar dos Santos Araujo

**RESUMO**

Buscou-se com este trabalho revisar na literatura internacional e nacional os principais estudos referentes à ocorrência e prevalência de MRSA em animais de companhia e de produção. O *Staphylococcus aureus* é um importante patógeno em medicina veterinária. *S. aureus* resistente à meticilina (MRSA) emergiu nas últimas décadas como patógeno nosocomial e como causador de infecções em medicina veterinária. Em animais, o MRSA tem sido isolados em várias espécies, principalmente de animais domésticos, sendo estes considerados como reservatório deste patógeno, além de servir como fonte de infecção para humanos. O MRSA em medicina veterinária teve um acréscimo significativo no número de pesquisas realizadas em vários países.

Palavras-chave: *Staphylococcus* resistente à meticilina, animais de companhia, animais de produção

**ABSTRACT**

This paper aimed to review the main national and international studies on the occurrence and prevalence of MRSA in companion animals and in farm animals. The *Staphylococcus aureus* is an important pathogen in veterinary medicine. Methicillin-resistant *S. aureus* (MRSA) has emerged in recent decades as a nosocomial pathogen and as a cause of veterinary medicine infections. In animals, MRSA have been isolated in several species, mainly of domestic animals, which are considered as a reservoir of this pathogen, in addition to being a source of infection to humans. There has been a significant increase in the number of studies on MRSA in veterinary medicine in various countries.

Keywords: Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*, companion animals, farm animals

## **INTRODUÇÃO**

Os micro-organismos do gênero *Staphylococcus* são encontrados na pele, glândulas da pele e membranas mucosas de mamíferos e aves. São encontrados também na cavidade oral, glândula mamária, trato genito-urinário, vias respiratórias superiores e trato gastrointestinal dos animais domésticos (KLOOS& BANNERMAN, 1999).

*Staphylococcus aureus* resistente à metilina (MRSA) é um importante patógeno humano e um agente emergente em medicina veterinária. Esse micro-organismo está presente em diversas espécies animais, incluindo cães, gatos, coelhos, cavalos, vacas, suínos, aves e animais exóticos, além de existir evidências de que os animais podem servir como fonte de infecção para humanos e alimentos de origem animal (WEESE,2010; KLUYTMANS , 2010).

O MRSA é um patógeno nosocomial responsável por infecções em humanos e animais. Na medicina humana, o MRSA emergiu nos hospitais de vários países na década 60, mas era considerado limitado, devido à baixa incidência da doença. Com o passar dos anos, esse agente causou um aumento na morbidade e mortalidade em hospitais e a partir da década de 90 adquiriu importância epidemiológica causando infecções em diversas comunidades (WEESE, 2010).

WEESE et al. (2006), afirmaram que o MRSA, devido ao crescente aumento de infecções ocasionadas por este micro-organismo em animais na área de medicina veterinária, tem tido um papel cada vez mais importante como causador de infecções e vem sendo considerado por muitos pesquisadores como " patógeno emergente". PANTOSTI (2012), afirma que MRSA tem sido diagnosticado como um agente etiológico de potencial zoonótico, sugerindo que animais de companhia e de produção podem servir como reservatórios do micro-organismo ocasionando infecções em humanos.

### **1) RESISTÊNCIA AOS ANTIMICROBIANOS**

A resistência apresentada pelos *Staphylococcus* aos beta-lactâmicos é ocasionada por dois mecanismos distintos, que possuem uma origem genética comum. O primeiro mecanismo se deve à produção da enzima betalactamase. O segundo está associado a

modificação do sítio de ação do beta-lactâmico, esse mecanismo de resistência é mediado por elementos genéticos móveis denominados *Staphylococcus* Cassete Cromossomo (SCCmec).

A enzima betalactamase é codificada por um gene chamado de *blaZ*, este gene produz uma penicilinase, sendo um dos principais mecanismos de resistência aos betalactâmicos, drogas frequentemente usadas para o tratamento de infecções em animais (LIVERMORE, 2000). Este gene tem sido identificado como causador da resistência à penicilina em *Staphylococcus* coagulase negativos, sugerindo que ele seja realmente o responsável pela resistência a esse antimicrobiano. Transferências dos genes de resistência entre *Staphylococcus* coagulase negativos e *Staphylococcus aureus* vêm sendo relatadas (OLSEN et al., 2006).

O segundo mecanismo de resistência apresentado pelos *Staphylococcus* spp. é devido a um cassete cromossômico (SCCmec). Este cassete cromossômico apresenta o gene *mecA* que codifica uma proteína de ligação à penicilina (PBP2a) com ampla afinidade para antibióticos beta-lactâmicos e, permitem que os *Staphylococcus* sejam resistentes a todos betalactâmicos, além de mostrarem resistência a macrolídeos, aminoglicosídeos, tetraciclina, mupirocina e cotrimoxazol (LIVERMORE, 2000; VAN DUIJKEREN et al., 2004). O gene *mecA* pode ser encontrado tanto em *Staphylococcus* coagulase positivos quanto em *Staphylococcus* coagulase negativos. Em medicina veterinária, a origem do gene é desconhecida, entretanto, em medicina humana existem evidências que demonstram que o gene *mecA* tenha sido originado do *Staphylococcus sciuri* (CoNS) com possível transferência para o *S. aureus* (CAIN, 2013).

A resistência à meticilina pode ocorrer em outras espécies de *Staphylococcus*, incluindo *intermedius* e *pseudintermedius*, que colonizam e infectam tanto animais de companhia, como outros animais (DOYLE et al., 2011). Os *Staphylococcus* coagulase negativos também podem apresentar essa resistência.

## **2) MRSA EM ANIMAIS DOMÉSTICOS**

De acordo com MORGAN (2008), o primeiro caso registrado de MRSA em Medicina Veterinária, foi descrito por Devriese, no ano de 1972 e ocorreu em vacas com mastite na Bélgica. Desde então esses micro-organismos foram encontrados em várias

outras espécies de animais domésticos como: cães, gatos, cavalos, ovinos, suínos, aves e animais exóticos (LEONARD et al., 2006;WALTHER et al., 2008). Os mesmos autores relatam que há evidências de que estirpes de *S. aureus* sensíveis à meticilina, tornaram-se resistentes a este antimicrobiano, pela aquisição, por transferência horizontal do elemento SCCmec, onde localiza-se o gene *mecA*, provavelmente originadas de cepas de *Staphylococcus coagulase* negativos.

Estudos epidemiológicos da prevalência de resistência à meticilina em todo o mundo são muito comuns em cepas isoladas de seres humanos, principalmente isoladas de hospitais e comunidades. Entretanto, em Medicina Veterinária, os estudos não são tão comuns, tendo sido observado um aumento significativo no número de pesquisas com este micro-organismo, principalmente em animais domésticos.

## **2.1) ANIMAIS DE PRODUÇÃO**

Em animais de produção, o MRSA tem um papel importante em relação às infecções em propriedades rurais, devido à possibilidade de disseminação do micro-organismo para o rebanho e da possibilidade de ocorrência de infecções por este patógeno (CUNY et al., 2010). Vários estudos têm sido desenvolvidos nas últimas décadas em equinos, bovinos, suínos, caprinos, ovinos e aves (Tabela 1). A transmissão de MRSA de animais para o homem, por contato direto ou via alimentos de origem animal também tem sido sugerida, sendo este considerado um risco a saúde pública. Outro fator importante em relação aos animais com infecções clínicas é a ocorrência de cepas carreadoras de múltipla resistência de difícil tratamento.

### **MRSA EM RUMINANTES**

O *Staphylococcus aureus* é uma causa significativa de mastite em vacas e pequenos ruminantes. No entanto, a prevalência de cepas resistentes à meticilina em vacas na Europa parece ser baixo, embora haja variação entre países. Cepas de MRSA associada a humanos foram detectadas em vacas com mastite na Hungria (JUHÁSZ-KASZANYITZKY et al. 2007) Trabalhos realizados na Turquia (TURUTOGLU et al. 2009; CIFTCI et al 2009; TURKYIMAZ et al. 2010), verificaram MRSA em três (16,67%), quatro (2,48%), e 16 (17,2%), respectivamente. VANDERHAEGHEN et al. (2010), na

Bélgica, avaliando 118 *S. aureus* isolados de mastite bovina, verificaram 11 (9,3%) estirpes carreando o gene *mecA*. Na Finlândia, GINDONIS et al. (2013), avaliando 135 *S. aureus* isolados de mastite bovina clínica e subclínica, sendo verificado em dois (1,7%) de MRSA. Recentemente na Holanda, VAN DUIJKEREN et al (2014), pesquisando amostras de *S. aureus* de pele de bovinos enviados para abate, diagnosticaram 16/411 (3,89%) MRSA.

### **MRSA EM AVES**

Existem poucos estudos de MRSA em aves. Em estudo com frangos de corte na Bélgica foi detectado MRSA em 10 (5,84%), de um total de isolados de 171 *S. aureus* (NEMATI et al. 2008). PERSOONS et al. (2009), encontraram oito (6,4%) animais portadores de MRSA em 125 frangos de corte avaliados. Na Holanda, MULDER et al. (2010) em pesquisa em abatedouros, isolaram 28/405 (7%) de MRSA de traquéia, obtidos imediatamente ao abate. Entretanto, na Alemanha, os estudos têm demonstrado alta prevalência de MRSA. RICHTER et al. (2012), trabalhando com duzentos perus, de 20 propriedades diferentes, verificaram MRSA em 143 (71,5%). FRIESE et al. (2013), em estudo com animais de 9 propriedades, obtiveram MRSA em 46/60 (76,7%) e 24/48 (50%) em perus e frangos, respectivamente.

### **MRSA EM EQUINOS**

MRSA foi descrito pela primeira vez em um equino com ferida cirúrgica em 1996 (HARTMANN et al, 1997). Posteriormente, SEGUIN et al. (1999), nos EUA isolaram cepas de *S. aureus* resistentes à meticilina de 11 equinos atendidos em um hospital veterinário. Nos EUA, MIDDLETON et al. (2005) estudaram 70 cepas de *S. aureus* isolados de 65 animais internados, 18 provenientes de amostras de equinos e quatro (22%) desses foram identificados como MRSA. BAPTISTE et al.(2005), no Reino Unido, detectaram a ocorrência de MRSA em 11(16%) equinos de 105 animais de propriedade e hospitalizados.

Entretanto, em pesquisa realizada por VENGUST et al. (2006) na Eslovênia, com 300 animais, não diagnosticaram presença de MRSA. Resultados negativos, também foram observados por BURTON et al. (2008) no Canadá.

VAN DEN EEDE et al. (2009), na Bélgica, encontraram 12 (10,9%) equinos portadores de MRSA de um total de 110 animais avaliados. Neste estudo, os autores detectaram o clone ST398 nas amostras analisadas e destacaram a importância desse agente como uma estirpe de potencial zoonótico. Na Austrália, AXON et al. (2011) diagnosticaram MRSA em 28 (7%) de 405 animais avaliados em uma unidade de terapia intensiva do hospital veterinário. Na Suécia, BERGSTROM et al. (2012), observaram seis casos de MRSA em um hospital veterinário. LONCARIC et al. (2014), na Áustria, verificou que todos os 78 *S. aureus* de equinos e um asinino previamente caracterizados como MRSA, pelo teste de susceptibilidade antimicrobiana e pelo método da cefalosporina cromogênica em disco, apresentaram o gene *mecA*.

### **MRSA EM SUÍNOS**

MRSA são comumente isolados da cavidade nasal de suínos, principalmente em animais de fazendas que apresentam alta densidade na população de animais (WEESE, 2010). HUIJSDENS et al. (2006), na Holanda, verificaram a ocorrência de MRSA em suínos, após surgimento de casos de infecções por este agente em humanos. Foram coletadas amostras do fazendeiro e sua família, bem como dos suínos. Dos 10 suínos avaliados, oito (80%) cepas foram consideradas MRSA. O fazendeiro e sua filha estavam colonizados por cepas de MRSA e o fazendeiro era suinocultor e tinha contato com os suínos infectados, demonstrando com isso, o potencial zoonótico desse agente.

No Canadá, KHANNA et al. (2007) diagnosticaram 71 (24,9%) suínos infectados com MRSA de um total de 285 animais provenientes de 20 propriedades rurais e observaram que destas fazendas, nove (45%) tinham animais colonizados por MRSA. SERGIO et al. (2007), em estudo desenvolvido em Cingapura, verificaram a ocorrência de um (1,72%) suíno infectado com MRSA em amostras de suabes nasais coletados de um total de 58 suínos. MEEMKEN et al. (2008), na Alemanha, verificaram a presença de MRSA em 85/678 (13%) de suínos oriundos de diversas propriedades. Na República Tcheca, com 283 suínos de fazendas de várias regiões desse país, verificaram a ocorrência de cinco (1,8%) cepas de MRSA. Todas elas apresentaram a sequência do clone ST398 (BARDON et al., 2012). Na China, PARK et al. (2013), em pesquisa com 900 suínos de 30 propriedades diferentes, com sinais clínicos de epidermite exudativa, diagnosticaram MRSA

em 19 (26,02%), dos 73 *S. aureus* que apresentaram resistência aos betalactâmicos, sendo a prevalência em animais de 2,11%. Existem diversos estudos em muitos países demonstrando a ocorrência de MRSA em animais de produção. Em animais de produção a prevalência de MRSA é maior quando compara com animais de companhia, principalmente em equinos e suínos. Nestas espécies costumam ocorrer infecções por clones de MRSA que possuem um elevado potencial zoonótico podendo servir de fonte de infecção para os humanos.

## 2.2) ANIMAIS DE COMPANHIA

O *Staphylococcus aureus* é um agente etiológico comumente isolado de infecções em cães e gatos. Entretanto, foram também diagnosticados em outras espécies de animais de companhia como coelhos e aves (Tabela 2). A prevalência de *S. aureus* na pele e mucosas dessas espécies é considerada baixa (DUQUETE et al., 2004). As infecções por MRSA em animais de companhia são predominantes na pele e tecidos moles, ocorrendo principalmente durante o período pós-cirúrgico (MORGAN, 2008). Segundo DOYLE et al. (2011), MRSA foi detectado pela primeira vez em animais de companhia na Nigéria, em 1972 por Oja. Posteriormente, ocorreu na Inglaterra, em um gato em uma unidade de reabilitação geriátrica, que aparentemente foi infectado por um residente servindo este como um reservatório para outros residentes. Foram também relatados na década de 1990 por CEFALAI et al. (1994) e HARTMANN et al. (1997), no Reino Unido e nos Estados Unidos, respectivamente. Em estudo realizado por VAN DUIJKEREN et al. (2004), de 102 *Staphylococcus aureus*, encontraram dois MRSA (1,96%), sendo as duas amostras de cães (2/23), sendo que o mesmo não foi diagnosticado em gatos (0/28).

BAPTISTE et al. (2005), no Reino Unido, detectaram a ocorrência de três (5,45%) MRSA em cães de um total de 55 animais pesquisados e nenhum gato positivo de 50 micro-organismos avaliados. LOEFFLER et al. (2005), no Reino Unido, detectaram a presença do gene *mecA* em quatro cães de um total de 45 (8,88%) e não encontraram nenhuma amostra positiva em gatos de um total de 12 animais avaliados. Nos EUA, MIDDLETON et al. (2005), estudaram 38 cepas de *S. aureus* (36 caninos e dois felinos), provenientes de sete hospitais veterinários de ensino e verificaram que a ocorrência de MRSA foi em 4 cães e 1 gato (13,16%). O'MAHONY et al. (2005), em pesquisa

realizada na Irlanda, reportaram a ocorrência de MRSA em 14 cães, um coelho e um gato atendidos no hospital veterinário.

VITALE & GROSS (2006), nos Estados Unidos, relataram um caso de um gato com infecção por MRSA, sendo que seu proprietário reportou que tinha tido abscessos na pele e pneumonia três meses antes, embora não tenha sido feito o exame microbiológico. Então esses autores sugerem que esse patógeno tenha sido transmitido para o animal pelo contato com o proprietário, demonstrando com isso o caráter zoonótico do agente.

SING et al. (2008), nos Estados Unidos, relataram um caso de uma mulher infectada pelo MRSA, que tinha abscessos recorrentes. A mesma estava em contato com sua família assintomática e com três gatos, sendo um destes portador de MRSA. Nesse estudo os autores evidenciaram que foi possível a recuperação da mulher após o tratamento do gato, revelando evidências a respeito da transmissão de entre animais e humanos. NIENHOFF et al. (2009), reportaram três cães de MRSA positivos de um total de 803 cães e 117 gatos admitidos na clínica de pequenos animais na universidade de medicina veterinária de Hannover, Alemanha. Segundo MURPHY et al. (2009), em um estudo realizado em Hospitais Veterinários de Ontario, Canadá, não foi detectada a presença de MRSA em animais de companhia (188 cães e 39 gatos). MOUNEY et al. (2013), no Canadá, não verificaram MRSA em isolados de conjuntiva de cães saudáveis. Entretanto, em estudo realizado por Loncaric (2014), na Áustria, com apenas 5 *S. aureus* de cães resistentes à meticilina, apresentaram o gene *mecA*. Em Portugal, COUTO et al. (2011), verificaram a ocorrência de MRSA de 0,7% e 1,4% em cães e gatos saudáveis, respectivamente, de um total de 146 cães e 141 gatos. A ocorrência de MRSA em animais saudáveis e com infecções clínicas tem aumentado muito em animais de companhia, acometendo principalmente cães e em menor frequência gatos. A prevalência de MRSA em animais de com infecções clínicas é baixa e em animais saudáveis não ultrapassa de 3%.

### **3) MRSA ISOLADOS DE ANIMAIS NO BRASIL**

No Brasil, existem poucos estudos sobre MRSA em medicina veterinária. Os estudos existentes estão apresentados na tabela abaixo (Tabela 3). O primeiro estudo foi realizado por LILENBAUM et al. (1998), no Estado do Rio de Janeiro, com amostras coletadas de pele de 148 gatos clinicamente saudáveis, sendo observado a presença de três

(2,02%) MRSA de um total 14 *S.aureus* através de testes fenotípicos. COELHO et al. (2009), em pesquisa realizada no Estado do Rio de Janeiro, com amostras de leite de 98 vacas com mastite clínica e subclínica, detectaram a ocorrência de MRSA em cinco (5,10%) animais. QUITOCO et al. 2013, em pesquisa realizada no Rio de Janeiro, avaliando 130 animais de companhia, verificaram a presença de MRSA em 0,76% das amostras, sendo o gene *mecA* detectado em apenas um gato 1/60 (1,7%), sendo que para as amostras dos 70 cães avaliados não houve a detecção do gene *mecA*.

AQUINO et al. (2012), em um estudo desenvolvido no Estado de São Paulo, com 161 amostras (36 bovinos leiteiros, 26 bovinos de corte, 19 ovinos, 21 equinos, 23 suínos, 23 caprinos), não observaram estirpes MRSA. Na região Nordeste, FRANÇA et al. (2012), não detectaram a presença do gene *mecA* nos 34 *S. aureus* isolados de pequenos ruminantes (171 caprinos e 30 ovinos) com mastite subclínica. O mesmo resultado negativo, foi observado por DALL AGNOL et al. (2013), em trabalho desenvolvido no Estado de Santa Catarina, com 36 *Staphylococcus spp.* isolados de mastite ovina, sendo três destes *S. aureus*. No Brasil, a maioria dos estudos estão relacionados à ocorrência de MRSA em animais de produção, principalmente em isolados de leite de processos mastíticos bovinos, caprinos e ovinos, sendo necessários mais estudos com equinos e suínos.

## CONCLUSÃO

O aumento de estudos referentes ao MRSA em animais, demonstra a atual importância desse micro-organismo em medicina veterinária. Observa-se que em animais de companhia sadios a prevalência é baixa. Porém estudos demonstram que em amostras clínicas há uma ocorrência maior, sendo mais comum em cães. Em gatos a ocorrência de MRSA pode ser considerado rara, apresentando-se em menor número em relação aos cães.

Em bovinos, o MRSA tem sido diagnosticados, principalmente em amostras de leite provenientes de casos de mastite, que pode, conseqüentemente, ser veiculado pelos produtos lácteos. Os equinos e suínos são os que apresentam os maiores índices de isolamento de MRSA, principalmente em animais dessas espécies que são hospitalizados. Pesquisas no Brasil devem ser incentivadas e intensificadas com o objetivo de compreender melhor o status de MRSA em animais, além de implementar a vigilância da resistência em estirpes em medicina veterinária.

O MRSA, como agente potencialmente zoonótico, apresenta grande relevância. Entretanto, em Medicina Veterinária não se dá a devida importância ao problema de infecções em animais de produção provenientes de propriedades rurais, tal fato está relacionado à morbidade e mortalidade em animais, gerando prejuízos econômicos.

## REFERÊNCIAS

AQUINO, G. V. et al. Prevalence of Methicillin-Resistant **Staphylococci** on a Farm: Staff can Harbour MRS When Animals Do Not. **Zoonoses and Public Health**, v. 59, p. 1-3, 2012. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21824366>>. Acesso em: 22 jan. 2014. doi: 10.1111/j.1863-2378.2011.01413.x

AXON J.E. et al. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in a population of horses in Australia. **Australian Veterinary Journal**, v. 89, n. 6, p. 221-225, 2011. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21595643>>. Acesso em: 02 fev. 2014. doi: 10.1111/j.1751-0813.2011.00711.x.

BAPTISTE, K. E. et al. Methicillin-resistant **Staphylococci** in Companion Animals. **Emerging Infectious Diseases**, v. 11, n. 12, p. 1942-1944, 2005. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3367626/>>. Acesso: 02 fev. 2014. doi: 10.3201/eid1112.050241.

BARDONĚ, J. et al. Occurrence and characteristic of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* on pig farms in the Czech Republic. **Acta Veterinaria BRNO**, v.81, p. 219-223, 2012. Disponível em: < <http://actavet.vfu.cz/pdf/201281030219.pdf>> doi:10.2754/avb201281030219.

BERGSTROM, K. et al. Infection prevention and control interventions in the first outbreak of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infections in an equine hospital in Sweden. **Acta Veterinaria Scandinavica** 2012. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3325856/>>. Acesso em: 03 fev. 2014. doi: 10.1186/1751-0147-54-14.

BURTON, S. et al. *Staphylococcus aureus* colonization in healthy horses in Atlantic Canada. **Canadian Veterinarian Journal**, 49(8), p. 797-799, 2008. Disponível em: <

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2465786/>>. Acesso em: 04 fev. 2014. PMID:PMC2465786.

CEFAL, C.; ASHURST, S, et al. Human carriage of methicillin-resis-tant *Staphylococcus aureus* linked with pet dog. **Lancet**, v. 344, p. 539–540, 1994

CIFTCI, A. et al. Detection of Methicillin Resistance and slime factor production of *Staphylococcus aureus* in bovine mastitis. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 40, p.254-261, 2009. Disponível em: <[http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1517-83822009000200009](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1517-83822009000200009)>.

Acesso em: 04 fev. 2014. doi: 10.1590/S1517-83822009000200009.

COELHO, S.M.O. et al. Fatores de virulência e resistência antimicrobiana em *Staphylococcus aureus* isolados de mastite bovina no Rio de Janeiro. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v.29, n.5, 2009. Disponível em: <[http://www.scielo.br/scielo.php?pid=S0100-736X2009000500002&script=sci\\_arttext](http://www.scielo.br/scielo.php?pid=S0100-736X2009000500002&script=sci_arttext)>.

Acesso em: 05 fev. 2014. doi: 10.1590/S0100-736X2009000500002.

COUTO, N. et al. Prevalence of methicillin-resistant **staphylococci** among dogs and cats at a veterinary teaching hospital in Portugal. **Veterinary Record**, v. 169, 72a, 2011. Disponível em: <<http://veterinaryrecord.bmj.com/content/169/3/72.1.extract>>. Acesso em: 05 fev. 2014. doi: 10.1136/vr.c6948

CUNY, C. et al. Emergence of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) in different animal species. **International Journal of Medical Microbiology**, v. 300, p. 109–117, 2010. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20005777>>. Acesso em: 05 fev. 2014. doi: 10.1016/j.ijmm.2009.11.002.

DALL AGNOL, A. M. et al. Caracterização fenotípica e molecular de isolados de *Staphylococcus spp.* obtidos de leite de ovelhas do Município de Chapecó-SC. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 34, n. 1, p. 311-322, 2013. Disponível em: <<http://www.uel.br/revistas/uel/index.php/semaagrarias/article/view/11516/pdf>>. Acesso em: 15 jan. 2014. doi: 10.5433/1679-0359.2013v34n1p311

DOYLE, M. E. et al. White Paper on Sources of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) and Other Methicillin-Resistant Staphylococci: Implications for Our Food Supply?. **Food Research Institute**, p. 1-25, 2011

DUQUETTE, R. A. AND NUTTALL T. J. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in dogs and cats: an emerging problem? **Journal of Small Animal Practice**, v.45, p. 591-597, 2004. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15600269>>. Acesso em: 06 fev. 2014.

FRIESE, A. et al. Occurrence of Livestock-Associated Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* in Turkey and Broiler Barns and Contamination of Air and Soil Surfaces in Their Vicinity. **Applied and Environmental Microbiology**, v.79, n.8, p.2759-2766, 2013. Disponível em: < <http://aem.asm.org/content/79/8/2759.full>>. Acesso em: 06 fev. 2014. doi: 10.1128/AEM.03939-12.

GINDONIS, V. et al. Occurrence and characterization of methicillin-resistant staphylococci from bovine mastitis milk samples in Finland. **Acta Veterinaria Scandinavica**, 55(1): 61, 2013. Disponível em: < <http://www.actavetscand.com/content/pdf/1751-0147-55-61.pdf>>. Acesso em: 12 fev. 2014. doi: 10.1186/1751-0147-55-61.

HARTMANN, F.A. et al. Isolation of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* from a postoperative wound infection in a horse. **Journal American Veterinary Medicine Association**, v. 211, p.590–592, 1997.

HUIJSDENS, X.W. et al. Community-acquired MRSA and pig-farming. **Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials**, 5:26, p. 1-4, 2006. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1654169/>>. Acesso em: 06 fev. 2014. doi: 10.1186/1476-0711-5-26.

JUHÁSZ-KASZANYITZKY, É. et al. MRSA transmission between cows and humans. **Emerging Infectious Diseases**, v, 13, p. 630–632, 2007. Disponível em: < [http://wwwnc.cdc.gov/eid/article/13/4/06-0833\\_article.htm](http://wwwnc.cdc.gov/eid/article/13/4/06-0833_article.htm)>. Acesso em: 07 fev. 2014.

KHANNA, T. et al. Methicillin resistant *Staphylococcus aureus* colonization in pigs and pig farmers. **Veterinary Microbiology**, v. 3851, p. 1-6, 2007. Disponível em: <http://mrsa->

[net.nl/files/de/file-eg-ant-124-0-Khanna.pdf](http://net.nl/files/de/file-eg-ant-124-0-Khanna.pdf)>. Acesso em: 07 fev. 2014. doi:10.1016/j.vetmic.2007.10.006.

KLOOS, W.E., BANNERMAN, T.L. In: MURRAY, P.R.; BARON, E.J.; PFALLER, M.A.; TENOVER, F.C.; YOLKEN, R.H. *Staphylococcus and Micrococcus. Manual of Clinical Microbiology*, Washington: American Society for Microbiology, 1999, 7ed.

KLUYTMANS J. A. J. W. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in food products: cause for concern or case for complacency? **Clinical Microbiology and Infection**, v.16, n.1, p. 11-15, 2010. Disponível em: < <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1469-0691.2009.03110.x/full>>. Acesso em: 07 fev. 2014. doi: 10.1111/j.1469-0691.2009.03110.x.

LEONARD, F.C.; MARKEY, B.K. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in animals: A review, **The Veterinary Journal**, v.175, p.27-36, 2008

LILENBAUM, W. et al. Prevalence and antimicrobial susceptibility of **staphylococci** isolated from the skin surface of clinically normal cats. **Letters in Applied Microbiology**, v. 27, p. 224-228, 1998. Disponível em: < <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1046/j.1472-765X.1998.00406.x/pdf>>. Acesso em: 07 fev. 2014. doi: 10.1046/j.1472-765X.1998.00406.x.

LIVERMORE, D. M. Antibiotic resistance in *staphylococci*. **International Journal of Antimicrobial Agents**, 16 (S1), p. 3-10, 2000. Disponível em: < <http://download.journals.elsevierhealth.com/pdfs/journals/09248579/PIIS0924857900002995.pdf>>. Acesso em: 26 jan. 2014. doi: 0924-8579/00/\$ - \$20.

LOEFFLER, A. et al. Prevalence of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* among staff and pets in a small animal referral hospital in the UK. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, 56, p. 692-697, 2005. Disponível em: < <http://jac.oxfordjournals.org/content/56/4/692.long>>. Acesso em: 08 fev. 2014. doi: 10.1093/jac/dki312.

LONCARIC I. et al. Identification and characterization of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) from Austrian companion animals and horses. **Veterinary Microbiology**, v. 168, p. 381-387, 2014. Disponível em:

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24332703>. Acesso em: 08 fev. 2014. doi: 10.1016/j.vetmic.2013.11.022.

MEEMKEN, D. et al. Occurrence of MRSA in pigs and in humans involved in pig production--preliminary results of a study in the northwest of Germany. **Deutsche Tierärztliche Wochenschrift**, v. 115, p.132-139, 2008.

MIDDLETON, J. R. et al. Surveillance of *Staphylococcus aureus* in Veterinary Teaching Hospitals. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 43, p. 2916-2919, 2005. Disponível em: < <http://jcm.asm.org/content/43/6/2916>> doi:10.1128/JCM.43.6.2916-2919.2005.

MORGAN, M. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and animals: zoonosis or humanosis. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 62, p.1181-1187, 2008. Disponível em: <<http://jac.oxfordjournals.org/content/62/6/1181.full.pdf+html>>. Acesso em: 08 fev. 2014. doi: 10.1093/jac/dkn405

MOONEY, M. C. et al. Prevalence of methicillin-resistant *Staphylococcus spp.* in the conjunctival sac of healthy dogs. **Veterinary Ophthalmology**, p. 1-4, 2013. Disponível em: < <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/vop.12130/full>>. Acesso em: 08 fev. 2014. doi: 10.1111/vop.12130.

MULDERS, M.N. et al. Prevalence of livestock-associated MRSA in broiler flocks and risk factors for slaughterhouse personnel in the Netherlands. **Epidemiology Infection**, 138, p. 743-755, 2010. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20109255>>. Acesso em: 10 fev. 2014. doi: 10.1017/S0950268810000075.

MURPHY, C. et al. Occurrence of antimicrobial resistant bacteria in healthy dogs and cats presented to private veterinary hospitals in southern Ontario: A preliminary study. **Canadian Veterinary Journal**, v. 50. p.1047-1053. 2009. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2748285/>>. Acesso em: 09 fev. 2014. PMID: PMC2748285.

NEMATI, M. et al. Antimicrobial resistance of old and recent *Staphylococcus aureus* isolates from poultry: first detection of livestock-associated methicillin-resistant strain ST398. **Antimicrobial Agents Chemotherapy**. v.52, p. 3817-3819, 2008. Disponível em:

< <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2565892/>>. Acesso em: 10 fev. 2014. doi: 10.1128/AAC.00613-08.

NIENHOFF, U. et al. Transmission of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains between humans and dogs: two case reports. **Journal Antimicrobial Chemotherapy**, v. 64, p. 660–662, 2009. Disponível em: < <http://jac.oxfordjournals.org/content/64/3/660.full>>. Acesso em: 10 fev. 2014. doi: 10.1093/jac/dkp243.

OLSEN, J. E. et al. Diversity and Evolution of *blaZ* from *Staphylococcus aureus* and coagulase-negative *staphylococci*. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 57, n. 3, p. 450-460, 2006. Disponível em:< <http://jac.oxfordjournals.org/content/57/3/450.long>>. Acesso em: 06 fev. 2014. doi: 10.1093/jac/dki492.

O'MAHONY, R. et al. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) isolated from animals and veterinary personnel in Ireland. **Veterinary Microbiology**, v. 109, n. 3-4, p. 285-296, 2005. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0378113505002075>>. Acesso em: 10 fev. 2014. doi: 10.1016/j.vetmic.2005.06.003.

PANTOSTI, A. Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Associated with Animals and Its Relevance to Human Health. **Front Microbiology**, v.3, n. 127, 2012. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3321498/>>. Acesso em: 10 fev. 2014. doi: 10.3389/fmicb.2012.00127.

PARK J. et al. An investigation of resistance to  $\beta$ -lactam antimicrobials among *staphylococci* isolated from pigs with exudative epidermitis. **BMC Veterinary Research**, 9:211, 2013. Disponível em: < <http://www.biomedcentral.com/1746-6148/9/211>>. Acesso em: 11 fev. 2014. doi: 10.1186/1746-6148-9-211.

PERSOONS, D. et al. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in poultry. **Emerging Infectious Diseases**, v. 15, p. 452–453, 2009. Disponível em: < [http://wwwnc.cdc.gov/eid/article/15/3/08-0696\\_article.htm](http://wwwnc.cdc.gov/eid/article/15/3/08-0696_article.htm)>. Acesso em: 11 fev. 2014. doi: 10.3201/eid1503.080696.

QUITOCO, I. M. Z. et al. First report in South America of companion animal colonization by the USA1100 clone of community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (ST30) and by the European clone of methicillin-resistant *Staphylococcus pseudintermedius* (ST71). **BMC Research Notes**. 6:336, p. 1-7, 2013. Disponível em: < <http://www.biomedcentral.com/1756-0500/6/336>>. Acesso em: 11 fev. 2014. doi: 10.1186/1756-0500-6-336.

RICHTER A. et al. Prevalence of types of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in turkey flocks and personnel attending the animals. **Epidemiology Infection**, 140, 2223–2232, 2012. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3487481/>>. Acesso em: 11 fev. 2014. doi: 0.1017/S095026881200009X.

SEGUIN, J. C. et al. Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Outbreak in a Veterinary Teaching Hospital: Potential Human-to-Animal Transmission. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 37, n. 5, p. 1459-1463, 1999. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC84801/>>. Acesso em: 11 fev. 2014.

SERGIO, D. M. B. et al. Investigation of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in pigs used for research. **Journal of Medical Microbiology**, v. 56, p. 1107–1109, 2007. Disponível em:< <http://jmm.sgmjournals.org/content/56/8/1107.long>> Acesso em: 02 fev. 2014. doi: 10.1099/jmm.0.47283-0

SING, A. et al. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in a family and its pet cat. **New England Journal Medicine**, v 358, p. 1200–1201, 2008. Disponível em: < <http://www.nejm.org/doi/pdf/10.1056/NEJMc0706805>>. Acesso em: 11 fev. 2014. doi: 10.1056/NEJMc0706805.

TURKYILMAZ, S. et al. Molecular Epidemiology and Antimicrobial Resistance Mechanisms of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Isolated from Bovine Milk. **Zoonoses and Public Health**, v. 57, p. 197-203, 2010. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19912611>>. Acesso em: 11 fev. 2014. doi: 10.1111/j.1863-2378.2009.01257.x

TURUTOGLU H. et al. Methicillin and aminoglycoside resistance in *Staphylococcus aureus* isolates from bovine mastitis and sequence analysis of their *mecA* genes.

**Veterinary Research Communication**, v. 33, p. 945–956, 2009. Disponível em: <http://link.springer.com/article/10.1007/s11259-009-9313-5> . Acesso em: 03. Fev. 2014. doi: 10.1007/s11259-009-9313-5.

VAN DEN EEDE, A. et al. High occurrence of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* ST398 in equine nasal samples. **Veterinary Microbiology**, v. 133 , p. 138–144, 2009. Disponível em: [http://www.fp7pilgrim.eu/fileadmin/pilgrim/Articles/2009/Equine\\_MR\\_SA\\_ST398\\_Marc\\_Struelens\\_2009-03-10.pdf](http://www.fp7pilgrim.eu/fileadmin/pilgrim/Articles/2009/Equine_MR_SA_ST398_Marc_Struelens_2009-03-10.pdf)>. Acesso em: 11 fev. 2014. doi: 10.1016/j.vetmic.2008.06.021.

VANDERHAEGHEN W. et al. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) ST398 associated with clinical and subclinical mastitis in Belgian cows. **Veterinary Microbiology**. v. 144, p. 166–171, 2010. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19685276>>. Acesso em: 11 fev. 2014. doi : 10.1007/s11259-009-9313-5.

VAN DUIJKEREN, E. et al. Methicillin-resistant *staphylococci* isolated from animals. **Veterinary Microbiology**, v.103, p.91-97. 2004. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15381271>>. Acesso em: 11 fev. 2014. PMID:15381271

VAN DUIJKEREN, E. P. D. et al. Prevalence of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* carrying *mecA* or *mecC* in dairy cattle. **Veterinary Microbiology**, 2014 (In press)

VENGUST, M. et al. Methicillin-resistant *staphylococcal* colonization in clinically normal dogs and horses in the community. **Letters in Applied Microbiology**, v. 43, n. 6, p. 602-606, 2006. Disponível em: < <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1472-765X.2006.02018.x/full>>. Acesso em: 11 fev. 2014. doi: 10.1111/j.1472-765X.2006.02018.x.

VITALE, C.B.; GROSS, T.L. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in cat and owner. **Emerging Infectious Diseases**, v. 12: p.1998–2000, 2006. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3291366/>>. Acesso em: 12 fev. 2014. doi: 10.3201/eid1212.060725.

WALTHER B., et al. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) isolated from small and exotic animals at a university hospital during routine microbiological examinations. **Veterinary Microbiology**, v.127, p.171-178, 2008. Disponível em:< <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17804179>> Acesso em: 02 fev. 2014. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.vetmic.2007.07.018>.

WEESE, J.S. et al. Suspected transmission of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* between domestic pets and humans in veterinary clinics and in the household. **Veterinary Microbiology**, v.115, p. 148–155, 2006. Disponível em: < <http://208.43.255.104/~thebella/wp-content/uploads/Weese-MRSA-transmission-between-vets-pets-2006.pdf>>. Acesso em: 08 fev. 2014. doi:<http://dx.doi.org/10.1016/j.vetmic.2006.01.004>.

WEESE, J.S. Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* in Animals. **ILAR Journal**, v. 51, n.3, p. 233-244, 2010. Disponível em:< <http://ilarjournal.oxfordjournals.org/content/51/3/233.long>> Acesso em: 06 fev. 2014. doi: 10.1093/ilar.51.3.233.

WEESE, J.S.; VAN DUIJKEREN, E. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus pseudintermedius* in veterinary medicine, Review, **Veterinary Microbiology**, v. 51, n. 3, p. 233-244, 2010. Disponível em:< <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19246166>>. Acesso em: 04 fev. 2014. doi: 10.1016/j.vetmic.2009.01.039.

**Tabela 1- Estudos de MRSA realizados em animais de produção**

Animais de Produção						
Autores	Ano	Número Amostral	Nº de MRSA	(%)	Método de diagnóstico	País
Seguin et al.	1999	11 equinos	11	100%	CIM	Estados Unidos
					PCR	
Baptiste et al.	2005	105 equinos	11	10,47%	PCR	Reino Unido
Middleton et al.	2005	7 bovinos	0	0%	CIM	Estados Unidos
		18 equinos	4	22,22%	PCR	
O'Mahony et al.	2005	8 equinos	0	0%	PCR	Irlanda
Huijsdens et al.	2006	10 suínos	8	80%	ASO	Holanda
					PCR	
Walther et al.	2006	1 vaca	1	1 caso	PCR	Suíça
Vengust et al.	2006	300 equinos	0	0%	ASO	Eslovênia
					TAL	
Juhász-Kaszanyitzky et al.	2007	595 amostras de leite bovino	27	4,53%	PCR	Hungria
Khanna et al.	2007	285 suínos	71	24,9%	AC	Canadá
					TAL	
Sergio et al.	2007	58 suínos	1	1,72%	ASO	Cingapura
					PCR	
Burton et al.	2008	497 equinos sadios	0	0%	MS	Atlantic
					ASO	Canadá
					TAL	
Ieemken et al.	2008	678 suínos	85	13%	PCR	Alemanha
Nemati et al.	2008	171 frangos	10	5,84%	PCR	Bélgica
Ciftci et al.	2009	161 bovinos	4	2,48%	DDO	Turquia

Persoons et al.	2009	125 frangos de corte	8	6,4%	PCR	Bélgica
Van den Eede et al.	2009	110 equinos	12	10,9%	PCR	Bélgica
Turutoglu et al	2009	18 <i>S. aureus</i> (MRSA) mastite bovina	3	16,67%	Teste fenotípico	Turquia
Mulders et al.	2010	405 aves	28	6,9%	PCR	Holanda
Turkyilmaz et al.	2010	93 <i>S. aureus</i>	16	17,2%	DDO	Turquia
Vanderhaeghen et al	2010	118 <i>S. aureus</i> (mastite)	11	9,3%	CIM	Belgica
Axon et al.	2011	405 equinos	28	7%	PCR	Austrália
Park et al	2013	900 suínos	19	2,11%	PCR	China
Gindonis et al.	2013	135 <i>S. aureus</i> (mastite bovina)	2	1,7%	PCR	Finlândia
Bergstrom et al.	2011	6 equinos	6	6 casos	Testes fenotípicos	Suécia
Bardoň et al.	2012	283 suínos	5	1,8%	PCR	República Tcheca
Richter et al	2012	200 Perus	143	71,5%	CIM	Alemanha
Friese	2013	60 Perus	46	76,7%	PCR	Alemanha
		48 frangos	24	50%	TAL	
Loncaric et al.	2014	78 equinos	78	100%	PCR	Austria
		1 asinino	1	100%	PCR	
Van Duijkeren	2014	411bovinos (suabe de pele)	16	3,9%	PCR	Holanda

**AC- Ágar cromogênico ASO- Ágar Screening com Oxacilina DDO- Disco difusão com oxacilina CIM-  
Concentração inibitória mínima MS- Meio seletivo para MRSA TAL- Teste de Aglutinação em Látex  
PCR- Reação de Cadeia de Polimerase**

**Tabela 2: Estudos de MRSA realizados em animais de companhia**

Animais de companhia

Autores	Ano	Nº Amostral	Nº de MRSA	(%)	Métodos de diagnóstico	País
Cefai et al.	1994	1 cão	1	1 caso	PCR	Reino Unido
Manian	2003	1 cão	1	1 caso	PCR	Estados Unidos
Van Duijkeren et al.	2004	150 cães 89 gatos	2 0	1,33% 0%	ASO CIM PCR	Holanda
Baptiste et al.	2005	55 cães 50 gatos	3 0	5,45% 0%	PCR	Reino Unido
Loeffler et al.	2005	45 cães 12 gatos	4 0	8,88% 0%	ASO PCR	Reino Unido
Middleton et al.	2005	2 aves 36 cães 2 gatos	0 4 1	0% 11,11% 50%	CIM PCR	Estados Unidos
O`Mahony et al.	2005	14 cães 1 coelho 1 gato	14 1 1	100% 100% 0%	PCR	Irlanda
Vengust et al.	2006	200 cães	0	0%	ASO TAL	Eslovênia
Vitale et al.	2006	1 gato	1	1 caso	TAL PCR	Estados Unidos
Weese et al.	2006	4 cães 3 gatos	3 0	75% 0%	ASO TAL PCR	Canadá

Sing et al.	2008	3 gatos	1	33,33%	PCR	Estados Unidos
Murphy et al.	2009	188 cães	0	0%	ASO	Canadá
		39 gatos	0	0%		
Nienhoff et al.	2009	803 cães	3	0,37%	PCR	Alemanha
		117 gatos	0	0%		
Couto et al.	2012	146 cães	1	0,7%	PCR	Portugal
		141 gatos	2	1,4%		
Mouney et al.	2013	123 cães	2	1,6%	PCR	Canadá

---

AC- Ágar cromogênico ASO- Ágar Screening com Oxacilina DDO- Disco difusão com oxacilina CIM- Concentração inibitória mínima MS- Meio seletivo para MRSA TAL- Teste de Aglutinação em Látex PCR- Reação de Cadeia de Polimerase

**Tabela 3- Estudos de MRSA realizados em animais de companhia e animais de produção no Brasil**

Autores	Ano	Nº Amostrado	Nº de MRSA	(%)	Métodos de diagnóstico	Estado
Lilenbaum et al.	1998	148 gatos	3	2,02%	ASO	Rio de Janeiro
Coelho et al.	2009	98 vacas	5	5,10%	ASO PCR	Rio de Janeiro
Aquino et al.	2012	32 bovinos leiteiros	0	0%	ASO PCR	São Paulo
		26 bovinos de corte	0	0%		
		23 caprinos	0	0%		
		21 equinos	0	0%		
		19 ovinos	0	0%		
		23 suínos	0	0%		
França et al.	2012	171 caprinos	0	0%	PCR	Bahia
		30 ovinos	0			Pernambuco
DallAgnol et al.	2013	36 isolados	0	0%	PCR	Santa Catarina
Quitoco et al.	2013	70 cães	0	0%	PCR	Rio de Janeiro
		60 gatos	1	1,7%		

AC- Ágar cromogênico ASO- Ágar Screening com Oxacilina DDO- Disco difusão com oxacilina CIM- Concentração inibitória mínima MS- Meio seletivo para MRSA TAL- Teste de Aglutinação em Látex PCR- Reação de Cadeia de Polimerase

## **CAPÍTULO II**

**Resistência à meticilina de estafilococos coagulase positivos e negativos  
causadores de infecções em animais de companhia e animais de produção**

**-Artigo-**

O presente trabalho foi formatado de acordo com as normas da revista Ciência Rural e  
submetido para publicação

## **Resistência à meticilina de estafilococos coagulase positivos e negativos causadores de infecções em animais de companhia e animais de produção**

### **Methicillin resistance in coagulase positive and negative staphylococci causing infections in companion and farm species**

Rodrigo Antônio Torres Matos, Felício Garino Junior, Layze Cilmar, Danielle Aluska N. Pessoa, Meire Maria dos Santos Mâcedo, Silvia Souza Aquino, Candice Léon e Celso José Bruno de Oliveira

#### **RESUMO**

Objetivou-se com este trabalho avaliar a resistência aos antimicrobianos, produção de betalactamases e ocorrência de MRSA e MRCoNS em 114 *Staphylococcus* spp. isolados de animais de companhia e animais de produção atendidos em Hospital Veterinário de Ensino no Brasil. O fenômeno de resistência antimicrobiana apresentado por espécies de *Staphylococcus* spp. em animais tem sido considerada um problema crescente em medicina veterinária. O perfil de resistência foi avaliado através do método de difusão em disco, produção de betalactamases e detecção do gene *mecA* através de PCR. Os maiores índices de resistência aos fármacos avaliados foram para penicilina (70,18%) e ampicilina (67,54%). No teste para detecção da enzima betalactamase foram verificados 60 (52,63%) dos *Staphylococcus* positivos. O gene *mecA* foi diagnosticado em 17 (14,91%) dos isolados avaliados, sendo dois em caninos, um em felino e 14 em bovinos. Os resultados permitiram concluir que a resistência para penicilina e ampicilina é alta nos *Staphylococcus* avaliados, e que a produção de betalactamase foi considerada o principal mecanismo de resistência apresentado por estes microrganismos. Apesar do gene *mecA* ter baixa ocorrência neste estudo, existe a necessidade de um monitoramento constante em estirpes isoladas de animais domésticos.

Palavras-chave: *Staphylococcus*, resistência, animais domésticos, gene *mecA*

## ABSTRACT

The present study was aimed to assess the resistance to antimicrobials, production of beta-lactamases and occurrence of MRSA and MRCoNS in isolates from companion animals and farm animals. The antimicrobial resistance demonstrated by species of *Staphylococcus spp.* in animals is considered a major problem in veterinary medicine. The following assessments were made in the present study: resistance profile using the disc diffusion method, production of beta-lactamases and detection of *mecA* gene by PCR of 114 *Staphylococcus spp.* isolated from companion animals and farm animals treated at the veterinary teaching hospital in Brazil. The highest rates of resistance to the assessed drugs were as follows: penicillin (70.18%) and ampicillin (67.54%). In the test for detection of beta-lactamase enzyme 60 (52.63%) positive *Staphylococci* were detected. The *mecA* gene was diagnosed in 17 (14.91%) of the assessed isolates, two dogs, one cat and fourteen bovine. The results allowed concluding that resistance to penicillin and ampicillin is high in the assessed *Staphylococci*, and that the production of beta-lactamase was considered the main mechanism of resistance of these microorganisms. Despite the low occurrence of the *mecA* gene in this study, constant monitoring in strains isolated from domestic animals is needed.

Keywords: *Staphylococcus*, resistance, domestic animals, *mecA* gene

## INTRODUÇÃO

Bactérias do gênero *Staphylococcus* são importantes agentes etiológicos de relevância em Medicina Veterinária, sendo os mais importantes clinicamente os *Staphylococcus aureus*, *intermedius* e *pseudointermedius*. Além destes, existem os *Staphylococcus* coagulase-negativos que vêm ganhando cada vez mais importância em infecções clínicas. Um fator importante nas bactérias deste gênero é a capacidade de se tornarem resistentes à meticilina, através da presença do gene *mecA*, que faz com que estes micro-organismos se tornem resistentes às penicilinas, cefalosporinas e carbapenéns (WEESE 2010; VAN DUIJKEREN, 2010).

As betalactamases, são consideradas um dos principais mecanismos de resistência aos betalactâmicos, drogas frequentemente usadas para o tratamento de infecções em animais. Estas enzimas agem no anel betalactâmico, provocando a hidrólise e inativação do

antibiótico. As betalactamases são freqüentemente encontradas em isolamentos clínicos do gênero *Staphylococcus* (LIVERMORE, 2000). Outro mecanismo é o que confere resistência à meticilina e pode ser encontrado tanto em *Staphylococcus* coagulase-positivos quanto *Staphylococcus* coagulase-negativos.

Os *Staphylococcus aureus* resistentes à meticilina (MRSA) infectam uma variedade de animais domésticos e exóticos (DOYLE et al., 2011). Esses micro-organismos são isolados de diversas infecções como, pioderma, otites, doenças respiratórias, cistites, prostatites e septicemia. Estudos demonstram a ocorrência desse agente em cães e gatos saudáveis e citam o mesmo como patógeno emergente de equinos e animais de fazenda. Pesquisas relatam que alguns clones de MRSA, isolados de cães, cavalos e suínos possuem potencial zoonótico. Além do MRSA, existem os MRCoNS (*Staphylococcus* coagulase negativos resistentes à meticilina) que também tem sido isolados de infecções em animais (WEESE & VAN DUIJKEREN, 2010; CAIN, 2013).

No Brasil existem poucos estudos a respeito de MRSA e MRCoNS como causadores de infecções em animais de companhia e animais de produção, objetivou-se com este trabalho avaliar a resistência aos antimicrobianos, produção de betalactamases e ocorrência de MRSA e MRCoNS de isolados de animais de companhia e animais de produção.

## MATERIAIS E MÉTODOS

### Amostras

Foram utilizados neste trabalho *Staphylococcus* que estavam congelados em tubos contendo caldo BHI e glicerol pertencentes ao banco de micro-organismos do Laboratório de Microbiologia do Hospital Veterinário da UFCG-CSTR-Campus de Patos. Os 114 *Staphylococcus* spp. isolados foram de animais de companhia, cães (n=17), gatos (n=6) provenientes de urina, secreções de ouvido, secreções oculares e feridas cutâneas e animais de produção, vacas com mastite clínica e subclínica (n=46), cabras com mastite clínica e subclínica (n=17) e ovelhas com mastite subclínica (n=28).

Os micro-organismos foram semeados em Ágar sangue ovino desfibrinado a 5%, Ágar nutriente e incubadas a 37 °C por 24 horas. Após esse período, os isolados foram

submetidos a identificação através de testes bioquímicos: teste da coagulase em tubo realizado com plasma de coelho liofilizado, oxidase, hidrólise de esculina, redução de nitrato, teste de resistência a polimixina, produção de uréase, Voges-Proskauer (produção de acetoína) e fermentação de carboidratos, xilose, trealose, maltose, sacarose d-mannose, d-mannitol e raffinose (KLOOS E BANNERMAN, 1999). Para controle dos testes foi utilizado o *Staphylococcus aureus* ATCC 25923.

### **Avaliação da Susceptibilidade “in vitro” aos Antimicrobianos**

O teste de susceptibilidade aos antimicrobianos foi realizado de acordo com o método de Kirby-Bauer descrito pelo manual do Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI, 2007). Foram utilizados discos impregnados com os seguintes agentes antimicrobianos: ampicilina 30 mcg, cefalexina 30 mcg, cefalotina 30 mcg, cefoxitina 30 mcg, gentamicina 10 mcg, neomicina 10mcg, norfloxacinina 10 mcg, oxacilina 1 mcg, penicilina 10 UI tetraciclina 30 mcg. A interpretação dos resultados foi realizada através da leitura dos halos de inibição (CLSI, 2007).

Os valores dos halos de cefoxitina e oxacilina foram utilizados para observação da resistência a meticilina. As culturas foram classificadas como sensíveis, quando apresentaram halos de inibição  $\geq 13$  mm para o disco de oxacilina e  $\geq 22$  mm para o disco de cefoxitina. Quando apresentaram halos inferiores foram classificadas como resistentes. Para o teste de controle de qualidade foi utilizada a cepa de *Staphylococcus aureus* ATCC 25923.

### **Screening teste com oxacilina**

Para avaliar a resistência a oxacilina e/ ou meticilina, as amostras foram semeadas em Agar Muller-Hinton suplementado com 4% NaCl e 6µg/ml de oxacilina para a realização do teste. As bactérias foram semeadas no meio e as placas foram incubadas por 24h horas a 37 °C. As amostras foram consideradas positivas quando apresentaram crescimento em placa.

### **Agar cromogênico para identificação dos *Staphylococcus aureus* resistentes à meticilina (MRSA)**

Para avaliar a resistência à meticilina, as bactérias isoladas foram submetidas ao cultivo em Agar cromogênico MRSA, contendo substratos cromogênicos e cefoxitina (BBL CHROMagar MRSA- biomériux). As culturas foram incubadas a 37 °C por 24 h. Após esse período, era realizada a leitura das placas para observação do resultado.

A detecção das cepas MRSA foi dada pela hidrólise do substrato cromogênico, que resultou no crescimento de colônias com coloração malva, no caso de amostras negativas, eram observadas colônias com coloração verde. Foi utilizada como controle a cepa de *Staphylococcus aureus* ATCC 25923.

### **Teste de Produção de betalactamases**

Os *Staphylococcus* foram testados para a produção de betalactamase através do método da cefalosporinacromogênica em disco (Cefnase®, BD- Becton, Dickinson and Company, Maryland, USA), que apresenta uma mudança da cor branca para a vermelha quando o anel betalactâmico é hidrolisado. As colônias foram removidas utilizando-se alça de platina, tendo sido aplicadas sobre a superfície do disco de cefinase e observadas por um período de uma hora. O desenvolvimento da cor vermelha foi considerado como reação positiva, indicando produção de betalactamase. Para o controle positivo, foi utilizado *Staphylococcus aureus* ATCC 29213.

### **Extração do DNA genômico**

A extração do DNA genômico dos isolados de *Staphylococcus spp.* foi realizada por fenol:clorofórmio:álcool isoamílico (25:24:1), descrito por Fritsch *et al.* (1989), com modificações. Culturas bacterianas (1,4 mL) crescidas em caldo infusão de cérebro e coração (BHI) (Acumedia®, USA) foram centrifugadas a 14.000 rpm durante 15 minutos a 4° C, onde o sobrenadante foi descartado e ao pellet obtido foram adicionados 500 µL de tampão TE 10:1 (10 mM de Tris-HCl, pH 8, 1 mM de EDTA), 10 µL de lisozima (10 mg/mL) (USB Corporation, USA) e 10 µL de proteinase K (5 mg/mL) (BioLabs®, USA), para lise da parede celular. A solução foi homogeneizada em vórtex e incubada a 60° C *overnight*.

Em seguida, foram adicionados 100 µL de tampão STE (2,5% SDS, 10mM Tris-HCl, pH 8, 0,25M EDTA) com incubação a 60° C por 15 minutos, para solubilização dos lípidios. A solução foi mantida em repouso a temperatura ambiente e em gelo durante 5 minutos (cada). Adicionou-se 130 µL de Acetato de amônio (7,5 M) (Amresco<sup>®</sup>, USA), com incubação em gelo por 15 minutos, neutralizando a reação.

Sequencialmente, a solução foi centrifugada em rotação supracitada por 5 minutos, com sobrenadante (± 700µL) transferido para novo tubo (1,5 mL) e a este adicionado volume igual de fenol:clorofórmio:álcoolisoamílico (Sigma-Aldrich, USA), sendo novamente centrifugado por 5 minutos. O fenol:clorofórmio precipita as proteínas, revelando-as na interface entre as fases formadas, orgânica e aquosa.

O sobrenadante ou fase aquosa (onde se encontra os ácidos nucleicos) (±400 µL) foi transferido para um novo tubo (1,5 mL, livre de RNase e DNase) e a este adicionado 420 µL de Etanol absoluto gelado (Amresco<sup>®</sup>, USA), com incubação a -20° C por 24 horas para que ocorresse precipitação do DNA extraído.

Após 24 horas, o tubo foi centrifugado em mesma rotação citada por 15 minutos, e o sobrenadante descartado. O pellet (translúcido) foi seco em temperatura ambiente por 30 minutos e ressuspensionado com 30 µL de água (destilada, deionizada e autoclavada), com incubação a -20° C por 24 horas. Por fim, o DNA genômico extraído foi avaliado qualitativa e quantitativamente por espectrofotometria, através do uso de biofotômetro (Biophotometer Plus, Eppendorf<sup>®</sup>, Alemanha).

Admitiram-se limites de quantidades de DNA acima de 300 ng/µL e absorbâncias (A<sub>260/280</sub>) entre 1,7 a 1,9. Para realização das análises moleculares seguintes foi realizada uma padronização de DNA para 50 ng/µL em 40 µL de água (destilada, deionizada e autoclavada).

### **Detecção do gene *mecA***

Foi realizado uniplex utilizando os oligonucleotídeos, *mecA1*: (5'- GTA GAA ATG ACT GAA CGT CCG ATA A-3') e *mecA2*: (5'-CCA ATT CCA CAT TGT TTC GGT CTA A-3') para detectar a presença do gene *mecA* seguindo o protocolo descrito por JONAS et al. (1999), com modificações. Para a mistura da PCR utilizou-se 25 µL de reação, contendo *Taq* DNA polimerase (1U), MgCl<sub>2</sub>(2mM), tampão *taq* (1x), dNTPs (200 µM de

cada), 0,8 µM de cada iniciador e 100 ng do DNA molde. A amplificação do DNA foi realizada em termociclador (TPersonalThermocycler, Biometra®, Alemanha) de acordo com o protocolo descrito por ADALETI et al. (2008), com modificações: desnaturação inicial a 94°C por 5 minutos, seguida por 30 ciclos de amplificação (desnaturação a 94°C por 30 segundos, anelamento a 50°C por 30 segundos e extensão a 72°C por 30 segundos), e extensão final a 72°C por 10 minutos. Os produtos de amplificação foram separados em gel de agarose a 2% corado com o GelRed (Biotium, USA). O produto amplificado foi avaliado quanto à presença ou ausência de bandas, contendo o número de pares de base indicado na tabela anterior. Utilizou-se como controle positivo a cepa St. 0008 *Staphylococcus aureus* SCC *mecA* + -tipo IV.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Na tabela 1, estão demonstrados os resultados da identificação das 114 espécies de *Staphylococcus* avaliados. Foram identificados 74 SCP (64,91%) e 40 SCN (35,09%).

Em relação ao perfil de resistência aos antimicrobianos, observa-se que as drogas que apresentaram maior percentual de resistência foram a ampicilina e penicilina em todas as espécies estudadas (Tabela 2). Os menores percentuais de resistência foram para as cefalosporinas. Apresentaram múltipla resistência a dois ou mais antibióticos 82 *Staphylococcus* spp. (71,93%).

SOARES et al. (2012), em pesquisa com vacas com mastite no Estado do Rio de Janeiro, observaram um percentual de resistência elevado para os antimicrobianos ampicilina (79%) e penicilina (79%) e um menor percentual para os antimicrobianos cefalotina (7%), gentamicina (15%) e oxacilina (29%), concordando com os dados encontrados neste trabalho.

DALL AGNOL et al. (2013), em um estudo realizado com ovelhas de Santa Catarina, verificaram que os *Staphylococcus* spp. isolados de leite desses animais apresentaram menor sensibilidade a ampicilina e a penicilina, corroborando com os resultados observados nesse estudo. Esses resultados apontam para a existência de mecanismos de resistência presentes nos *Staphylococcus* spp. avaliados nos trabalhos acima, demonstrando o fenômeno de múltipla resistência nos *Staphylococcus* estudados. O uso freqüente destes compostos, muitas vezes em dosagens inadequadas, provavelmente foi um

dos fatores responsáveis pela aquisição de resistência. Com relação a produção de betalactamases verificou-se maior ocorrência para isolados de bovinos 67,39% (31/46), caprinos 58,82% (10/17), cães 64,71% (11/17) e gatos 50% (3/6). Foi considerada baixa a ocorrência em ovinos 17,86% (5/28).

Vários estudos tem demonstrado a alta prevalência de betalactamases em *Staphylococcus* spp. isolados de animais. CORRENTE et al. (2003), na Itália, com *Staphylococcus* isolados de mastite subclínica em ovelhas, verificaram a produção de betalactamase nas 24 estirpes isoladas. GANIÈRE et al. (2005) em trabalho desenvolvido na França com 50 *Staphylococcus intermedius* isolados de piodermatite canino, verificaram que 62% desses microrganismos eram resistentes a penicilina e produziam betalactamases, corroborando com os dados obtidos neste estudo.

No Brasil, estudos com *Staphylococcus* produtores de betalactamases em medicina veterinária, tem sido reportados, principalmente em isolados de mastite. BRITO et al. (2001), 41,96%, GARINO JR et al. (2009) 73,81%. Estes estudos demonstram que a ocorrência de *Staphylococcus* produtores de betalactamases é elevada em animais de produção e animais de companhia, contribuindo para o aumento da resistência aos betalactâmicos, como ampicilina e penicilina. Estes trabalhos demonstram que a produção de betalactamases é um dos principais mecanismos de resistência apresentado por estes microrganismos. Devido à alta incidência de estirpes produtoras de betalactamases, recomenda-se o uso de antimicrobianos associados com inibidores de betalactamases para o controle de infecções causadas por estes micro-organismos

Nos testes fenotípicos para avaliação da resistência à meticilina, observou-se que dentre os micro-organismos avaliados foram 77,19% positivos (88/114) no screening teste com oxacilina e 64,03% positivos (73/114) no ágar cromogênico dos microrganismos avaliados. Destes 73 positivos nos ágar cromogênico, 26,03% (19/73) foram de animais de companhia e 73,97% (54/73) de animais de produção. O gene *mecA* foi observado em 14,91% (17/114) isolados de cães, gatos, cabras, ovelhas e vacas. Em relação a pesquisa do gene *mecA*, no presente estudo foi observado um total de 17, sendo 14 em bovinos com mastite clínica e subclínica, 2 em cães e 1 em gato com infecções clínicas (Tabela 3). Da mesma forma, PRIBULL et al. (2011), verificaram a ocorrência 30 *Staphylococcus aureus* isolados de mastite bovina em que 21 (70%) apresentaram o gene *mecA* e destes todos

apresentaram múltipla resistência, demonstrando que o gene nesses casos foi o principal mecanismo de resistência observado, conferindo múltipla resistência aos isolados. Já em trabalho realizado por COELHO et al. (2009), com amostras de leite de 98 vacas com mastite clínica e subclínica, detectaram a ocorrência de MRSA em cinco (5,10%) animais.

AQUINO et al. (2012), em um estudo desenvolvido no Estado de São Paulo, com 161 amostras (36 bovinos leiteiros, 26 bovinos de corte, 19 ovinos, 21 equinos, 23 suínos, 23 caprinos), não observaram estirpes MRSA. Na região Nordeste, FRANÇA et al. (2012), não verificaram a presença do gene *mecA* nos 34 *S. aureus* isolados de pequenos ruminantes (171 caprinos e 30 ovinos) com mastite subclínica. O mesmo resultado negativo, foi observado por DALL AGNOL et al. (2013), em trabalho desenvolvido no Estado de Santa Catarina, com 36 *Staphylococcus spp.* isolados de mastite ovina, sendo três destes *S. aureus*. Apesar de ser uma realidade a identificação de gene *mecA* em amostras clínicas de animais, observou-se ausência deste em estudos realizados no estado de São Paulo (AQUINO et al. (2012) e Santa Catarina (DALL AGNOL et al. (2013), demonstrando que a resistência à meticilina não está disseminada entre os rebanhos estudados.

QUITOCO et al. (2013), avaliando 130 animais de companhia, verificaram a presença de MRSA em 0,76% das amostras, sendo o gene *mecA* detectado em apenas um gato (1/60 1,7%), sendo que para as amostras dos 70 cães avaliados não houve a detecção do gene *mecA*. Estes resultados concordam com diversos estudos que afirmam que a prevalência em animais de companhia é baixa e que na maioria das vezes a resistência aos antimicrobianos se dá pela produção de enzimas betalactamases produzidas por esses microrganismos.

## CONCLUSÃO

A resistência aos antimicrobianos está amplamente difundida entre os *Staphylococcus spp.* Um dos principais mecanismos de resistência destes micro-organismos é a produção de enzimas betalactamases que conferem resistência aos betalactâmicos, principalmente à penicilina. Outro mecanismo importante em bactérias do gênero *Staphylococcus* é o gene *mecA*, que codifica uma proteína ligadora de penicilina (PLP) responsável por conferir múltipla resistência a estes micro-organismos. Deve ser realizado

o monitoramento e vigilância dos animais através de testes fenotípicos e moleculares, verificando a ocorrência em animais de cepas resistentes à meticilina.

## REFERÊNCIAS

ADALETI, R. et al. Comparison of polymerase chain reaction and conventional methods in detecting methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. **Journal of Infection in developing countries**, v.2, p. 46-50, 2008. Disponível em: < <http://www.jidc.org/index.php/journal/article/viewFile/321/181> > Acesso em: 02 fev. 2014.

AQUINO, G. V. et al. Prevalence of Methicillin-Resistant *Staphylococci* on a Farm: Staff can Harbour MRS When Animals Do Not. **Zoonoses and Public Health**, v. 59, p. 1-3, 2012. Acesso em: 06 de jan. de 2014. doi: 10.1111/j.1863-2378.2011.01413.x. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21824366> >. Acesso em: 22 jan. 2014. doi: 10.1111/j.1863-2378.2011.01413.x.

BRITO, M.A.V.P. et al. Concentração mínima inibitória de dez antimicrobianos para amostras de *Staphylococcus aureus* isoladas de infecção intramamária bovina. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.53, n.5, p.531-537, 2001. Disponível em: < [http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0102-09352001000500003](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0102-09352001000500003) >. Acesso em: 20 de jan. 2014. doi: 10.1590/S0102-09352001000500003.

CAIN, C. L. Antimicrobial Resistance in *Staphylococci* in Small Animals. **Veterinary Clinical Small Animals**, v. 43, p. 19-40, 2013. Acesso em: 26 de jan. 2014. doi: 10.1016/j.cvsm.2012.09.003. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23182322> >. Acesso em: 28 jan. 2014. doi: 10.1016/j.cvsm.2012.09.003.

CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE/ NCCLS. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing. **Document M 100-S15 PA: NCCLS**, 2005

COELHO, S.M.O. et al. Fatores de virulência e resistência antimicrobiana em *Staphylococcus aureus* isolados de mastite bovina no Rio de Janeiro. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v.29, n.5, 2009. Disponível em: <

[http://www.scielo.br/scielo.php?pid=S0100-736X2009000500002&script=sci\\_arttext](http://www.scielo.br/scielo.php?pid=S0100-736X2009000500002&script=sci_arttext)>.

Acesso em: 10 de jan, 2014. doi: 10.1590/S0100-736X2009000500002.

CORRENTE, M. et al. Methicillin resistance in *staphylococci* isolated from subclinical mastitis in sheep. **Microbiology News.**, 26(1):39-45, 2003.

DALL AGNOL, A. M. et al. Caracterização fenotípica e molecular de isolados de *Staphylococcus spp.* obtidos de leite de ovelhas do Município de Chapecó-SC. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 34, n. 1, p. 311-322, 2013. Disponível em: <<http://www.uel.br/revistas/uel/index.php/sema/grarias/article/view/11516/pdf>>. Acesso em: 15 jan. 2014. doi: 10.5433/1679-0359.2013v34n1p311.

DOYLE, M. E. et al. White Paper on Sources of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) and Other Methicillin-Resistant Staphylococci: Implications for Our Food Supply?. **Food Research Institute**, p. 1-25, 2011.

FRANÇA, C.A. et al. Antimicrobial resistance of *Staphylococcus spp.* from small ruminant mastitis in Brazil. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 32, p.747-753, 2012. Disponível em: <[http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0100-736X2012000800012](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-736X2012000800012)>. Acesso em: 22 jan. 2014. doi:dx.doi.org/10.1590/S0100-736X2012000800012.

GANIÈRE, J.P. et al. Antimicrobial drug susceptibility of *Staphylococcus intermedius* clinical isolates from canine pyoderma. **Journal Veterinary Medicine Brazilian Infectious Diseases Veterinary Public Health**. 52(1):25-31. 2005. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15702997>>. Acesso em: 21 jan. 2014. doi: 10.1111/j.1439-0450.2004.00816.x.

GARINO JUNIOR F. et al. Susceptibilidade a antimicrobianos e produção de betalactamase em amostras de *Staphylococcus* isolados de mastite caprina no Semi-árido Paraibano. **Arquivos do Instituto Biológico**, v.78, n.1, p.103-107. 2011. Disponível em: <[http://www.biologico.sp.gov.br/docs/arq/v78\\_1/garino.pdf](http://www.biologico.sp.gov.br/docs/arq/v78_1/garino.pdf)>. Acesso em: 23 jan. 2014.

JONAS, D. et al. Evaluation of the *mecA*, *femB* duplex polymerase chain reaction for detection of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. **European Journal Clinical Microbiology Infection Disease**, v. 18, p. 643-647,1999. Disponível em: <

<http://link.springer.com/article/10.1007/s100960050365> > Acesso em: 28 jan. 2014. doi: 10.1007/s100960050365.

LIVERMORE, D. M. Antibiotic resistance in *staphylococci*. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v.16, p.3-10, 2000. Disponível em: <<http://download.journals.elsevierhealth.com/pdfs/journals/09248579/PIIS0924857900002995.pdf>>. Acesso em: 26 jan. 2014. doi: 0924-8579/00/\$ - \$20.

PRIBUL, B. R. et al. Resistência bacteriana e ação das bacteriocinas de *Lactobacillus spp* em *Staphylococcus aureus* isolados de mastite bovina. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.63, n.3, p.744-748, 2011. Disponível em: <[http://www.scielo.br/scielo.php?pid=S0102-09352011000300029&script=sci\\_arttext](http://www.scielo.br/scielo.php?pid=S0102-09352011000300029&script=sci_arttext)>. Acesso em: 28 jan. 2014. doi: 10.1590/S0102-09352011000300029.

QUITOCO, I. M. Z. et al. First report in South America of companion animal colonization by the USA1100 clone of community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (ST30) and by the European clone of methicillin-resistant *Staphylococcus pseudintermedius* (ST71). **BMC Research Notes**. 6:336, p. 1-7, 2013. Disponível em: <<http://www.biomedcentral.com/1756-0500/6/336>>. Acesso em: 11 fev. 2014. doi: 10.1186/1756-0500-6-336.

SOARES, L. C. et al. Antimicrobial resistance and detection of *mecA* and *blaZ* genes in coagulase-negative *Staphylococcus* isolated from bovine mastitis. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v.32, n 8, p.692-696, 2012. Disponível em: <[http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0100736X2012000800002&lng=es&nrm=iso&tlng=es](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100736X2012000800002&lng=es&nrm=iso&tlng=es)>. Acesso em: 12 fev. 2014. doi:dx.doi.org/10.1590/S0100-736X2012000800002.

WEESE, J. S.; VAN DUIJKEREN, E. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus pseudointermedius* in veterinary medicine. **Veterinary Microbiology**, v. 140, n. 3, p. 418-429, 2010. Disponível em:<<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19246166>>. Acesso em: 04 fev. 2014. doi: 10.1016/j.vetmic.2009.01.039.

Tabela 1- Espécies de *Staphylococcus* isolados de animais de companhia e animais de produção atendidos em Hospital Veterinário de Ensino no Brasil

<i>Staphylococcus</i>	Cães (n=17)	Gatos (n=6)	Cabras (n=17)	Ovelhas (n=28)	Vacas (n=46)	Total	%
SCP							
<i>S. aureus</i>	17	5		5	30	57	50,00
<i>S. hycus</i>				1	7	8	7,02
<i>S. intermedius</i>					4	4	3,51
<i>S. lutrae</i>			1		3	4	3,51
<i>S. scheleiferisubsp. Coagulans</i>				1		1	0,88
SCN						0	0,00
<i>S. caprae</i>			3			3	2,63
<i>S. chromogenes</i>			2	4		6	5,26
<i>S. epidermidis</i>				7		7	6,14
<i>S. hominissubsp. Hominis</i>			3		1	4	3,51
<i>S. lugdunensis</i>			2			2	1,75
<i>S. psifermentans</i>					1	1	0,88
<i>S. saccharolyticus</i>			1			1	0,88
<i>S. saprophyticus</i>				3		3	2,63
<i>S. saprophyticusbovis</i>				6		6	5,26
<i>S. scheleiferi</i>						0	0,00
<i>S. simulans</i>		1	4			5	4,39
<i>S. xylosus</i>			1			1	0,88
<i>S. warneri</i>				1		1	0,88
<b>Total</b>	<b>17</b>	<b>6</b>	<b>17</b>	<b>28</b>	<b>46</b>	<b>114</b>	<b>100</b>

Tabela 2- Porcentagem de resistência aos antimicrobianos, dos 114 *Staphylococcus spp.* isolados de animais de companhia e animais de produção atendidos em Hospital Veterinário de Ensino no Brasil

Animais	AMP	CFL	CFE	CFO	CTX	GEN	NEO	NOR	OXA	PEN	TET
Cães	58,82	5,88	5,88	0	15,88	5,88	5,88	11,76	23,53	58,82	52,94
Cabras	58,82	0	5,88	23,53	0	0	5,88	0	17,65	64,71	29,41
Gatos	33,33	0	0	0	0	16,67	0	0	16,67	50,00	0
Ovelhas	67,86	0	14,29	50,00	0	14,29	35,71	3,57	17,86	78,57	0
Vacas	78,26	0	0	13,04	0	4,35	8,70	10,87	6,52	71,74	4,35
Total (%)	67,54	0,88	5,26	21,05	0,88	7,02	14,04	7,02	18,42	70,18	14,04

Tabela 3- Resultados dos testes utilizados para verificar resistência à meticilina em *Staphylococcus* isolados de animais de companhia e animais de produção atendidos em Hospital Veterinário de Ensino no Brasil

Animais	Screentest (%)	CROMagar (%)	<i>mecA</i> (%)
Cães	35,29	82,35	11,76
Cabras	94,12	29,41	0
Gatos	66,67	83,33	16,67
Ovelhas	82,14	25,00	0
Vacas	84,78	91,30	30,43
Total R (%)	77,19	64,03	14,91

## CONCLUSÃO GERAL

Após a avaliação de diversos trabalhos observa-se que a resistência encontrada nos *Staphylococcus* spp. tem sido cada vez mais frequente em animais domésticos. Os animais de companhia apresentam uma alta prevalência de cepas produtoras de betalactamases, porém a ocorrência do gene *mecA* não é comum nessas espécies, principalmente se os micro-organismos são isolados de animais saudáveis. Já os animais de produção, bovinos, caprinos e ovinos apresentam alta prevalência de cepas produtoras de betalactamases e em bovinos a presença do gene *mecA* nessas espécies tem sido detectada com maior frequência quando comparados com a detecção em pequenos animais.

Esses micro-organismos são um problema em propriedades e em ambientes hospitalares em medicina veterinária e possuem um elevado potencial zoonótico, podendo infectar humanos. É muito comum a transmissão de clones de MRSA entre animais e humanos, o que torna esse patógeno um importante agente etiológico de infecções nessas espécies.

Devido a essas características de resistência desses micro-organismos e a capacidade de serem veiculados por contato direto ou através de produtos de origem animal, se faz necessário a implementação de monitoramento dessas cepas multirresistentes através de métodos de diagnóstico fenotípicos e moleculares para auxiliar no controle de infecções por este patógeno.

## **ANEXOS**

**ANEXO 1-** NORMA 01/2011 da Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária do Centro de Saúde e Tecnologia Rural da Universidade Federal de Campina Grande.

**ANEXO 2-** Instruções para publicação na Revista Ciência Rural

**CENTRO DE SAÚDE E TECNOLOGIA RURAL CAMPUS DE PATOS  
COLEGIADO DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO  
EM MEDICINA VETERINÁRIA**

**NORMA Nº 01/2013**

Altera a NORMA Nº 01/11 de 03 de junho de 2011 e acrescenta novos critérios para a elaboração e defesa de Dissertação/Tese do Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária do Centro de Saúde e Tecnologia Rural da UFCG.

O Colegiado do Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária, no uso de suas atribuições, de conformidade com a legislação em vigor, e nos termos da Resolução Nº 13/02 do CONSEPE e do seu Regulamento.

**RESOLVE:**

**Art. 1º** Decide modificar a redação do § 1º do art. 2º da norma 01/2009 e estabelece que o aluno deve apresentar, antes da defesa, o comprovante de submissão dos trabalhos da Dissertação e Tese às revistas Qualis A1, A2, B1 e B2 da CAPES.

§ 1º - O corpo da Dissertação será constituído por capítulos, pelo menos dois, e poderão ser da seguinte forma:

I - uma revisão da literatura e um trabalho já enviado a uma revista científica Qualis citadas no Caput do artigo;

II - dois trabalhos enviados à revista Qualis citadas no Caput do artigo.

§ 2º - O corpo da Tese poderá ser constituído por:

I - três trabalhos submetidos a revistas científicas Qualis citadas no Caput do artigo;

II - dois trabalhos submetidos a revistas científicas Qualis citadas no Caput do artigo e uma revisão da literatura.

§ 3º Os demais itens relacionados com a elaboração da Dissertação/Tese deverão seguir as normas no Anexo 1.

**Art. 2º** A qualificação do doutorado deverá ser feita em um prazo de 30 (trinta) meses após o ingresso do doutorando no Programa.

**Art. 3º** A presente Norma entra em vigor a partir da data de sua publicação.

Patos, 09 de julho de 2013.

Prof. Dr. Sérgio Santos de Azevedo  
Coordenador do PPGMV

## Anexo 1

### NORMAS PARA ELABORAÇÃO DE DISSERTAÇÃO/TESE

O corpo da Dissertação/Tese será constituído por capítulos, como segue:

- Dissertação: revisão da literatura (Capítulo 1); um trabalho (Capítulo 2) já submetido a uma revista científica Qualis A1, A2, B1 ou B2 da CAPES.

- Tese: revisão da literatura (Capítulo 1); dois trabalhos (Capítulos 2 e 3) já submetidos a revistas científicas Qualis A1, A2, B1 ou B2 da CAPES.

Ao invés da revisão de literatura, o aluno poderá apresentar outro artigo científico, na mesma linha de pesquisa. A Dissertação constará, dessa forma, de dois artigos científicos, e a Tese constará de três artigos científicos, um título que abranja os artigos, uma introdução e conclusões relacionadas aos dois artigos.

Os capítulos referentes aos artigos científicos serão redigidos seguindo as normas da(s) revista(s) para a(s) qual(is) será(ão) enviado(s).

Caso a revisão de literatura seja enviada para publicação, a mesma deverá ser redigida seguindo as normas da revista.

Em todos os casos, no final da Dissertação/Tese devem ser incluídas, como anexo, as normas da(s) revista(s) para as quais os trabalhos serão enviados.

Na versão final não deve constar o anexo da cópia do trabalho em inglês a ser publicado na revista.

A Dissertação/Tese deverá possuir um resumo e um *abstract* com as respectivas palavras-chave/*key words*, contemplando os capítulos.

Para a formação da Dissertação/Tese, será utilizada a folha A4, fonte Times New Roman, tamanho 12 e espaçamento entre linhas 1,5. Os artigos científicos devem seguir as normas das revistas para as quais foram enviados, com exceção do estilo e tamanho da fonte (Times New Roman; 12) e espaçamento entre linhas (1,5).

Tanto na apresentação quanto nos diferentes capítulos e conclusões, nos exemplares para a defesa da Dissertação/Tese deve ser incluída, à esquerda da folha, a numeração das linhas, exceto na versão final.

~~As páginas deverão ser numeradas a partir da **Introdução**, sendo consideradas, para efeito de numeração, as páginas anteriores, com exceção da **Capa**.~~

A Dissertação/Tese deverá ser composta pelas seguintes partes:

- Capa
- Contracapa (com a ficha catalográfica no verso)
- Ficha de avaliação
- Dedicatória/agradecimentos (opcionais)
- Resumo e palavras-chave
- *Abstract* e *key words*
- Sumário
- Lista de tabelas e quadros
- Lista de figuras
- Lista de abreviaturas e siglas
- Introdução com referências
- Capítulos (dois para Dissertação; três para Tese)
- Conclusões
- Anexos

Um volume da Dissertação/Tese deverá ser entregue à coordenação 45 dias antes da defesa para ser encaminhado a um revisor para avaliação se o mesmo está apto à defesa.

Seis exemplares da Dissertação e 10 exemplares da Tese devem ser entregues à coordenação, no mínimo 30 dias antes da defesa, juntamente com o formulário de solicitação de banca examinadora e respectivos minicurrículos dos membros, bem como os comprovantes de submissão dos trabalhos.

Após a defesa deverá ser entregue na coordenação do programa 5 (cinco) exemplares da Dissertação e 7 (sete) exemplares da Tese, com pelo menos 2 (dois) em capa dura, no prazo máximo previsto no regimento (30 dias após a defesa). Obrigatoriamente deverá constar a ficha catalográfica.

Entregar uma cópia em CD da Dissertação/Tese em um único arquivo pdf e em um único arquivo do Word. Os arquivos deverão ser idênticos à versão impressa. Não será aceito a Dissertação/Tese que esteja fragmentada em vários arquivos separados.

Patos, 09 de julho de 2013.

Prof. Dr. Sérgio Santos de Azevedo  
Coordenador do PPGMV



[Português](#) | [English](#)

[Página inicial](#) [Artigos publicados](#) [Assinatura](#) [Indexação](#) [Consultores](#)

[Fale conosco](#) [Normas](#) [Sobre nós](#) [Submissão online](#) [Taxas](#)

## Normas para publicação

**1. CIÊNCIA RURAL** - Revista Científica do Centro de Ciências Rurais da Universidade Federal de Santa Maria publica artigos científicos, revisões bibliográficas e notas referentes à área de Ciências Agrárias, que deverão ser destinados com exclusividade.

**2. Os artigos científicos, revisões e notas** devem ser encaminhados via [eletrônica](#) e editados em idioma Português ou Inglês. Todas as linhas deverão ser numeradas e paginadas no lado inferior direito. O trabalho deverá ser digitado em tamanho A4 210 x 297mm com, no máximo, 25 linhas por página em espaço duplo, com margens superior, inferior, esquerda e direita em 2,5cm, fonte Times New Roman e tamanho 12. **O máximo de páginas será 15 para artigo científico, 20 para revisão bibliográfica e 8 para nota, incluindo tabelas, gráficos e figuras.** Figuras, gráficos e tabelas devem ser disponibilizados ao final do texto e individualmente por página, sendo que **não poderão ultrapassar as margens e nem estar com apresentação paisagem.**

**3. O artigo científico** (Modelo [.doc](#), [.pdf](#)) **deverá conter os seguintes tópicos:** Título (Português e Inglês); Resumo; Palavras-chave; Abstract; Key words; Introdução com Revisão de Literatura; Material e Métodos; Resultados e Discussão; Conclusão e Referências; Agradecimento(s) e Apresentação; Fontes de Aquisição; Informe Verbal; Comitê de Ética e Biossegurança devem aparecer antes das referências. **Pesquisa envolvendo seres humanos e animais obrigatoriamente devem apresentar parecer de aprovação de um comitê de ética institucional já na submissão.** Alternativamente pode ser enviado um dos modelos ao lado ([Declaração Modelo Humano](#), [Declaração Modelo Animal](#)).

**4. A revisão bibliográfica** (Modelo [.doc](#), [.pdf](#)) **deverá conter os seguintes tópicos:** Título (Português e Inglês); Resumo; Palavras-chave; Abstract; Key words; Introdução; Desenvolvimento; Conclusão; e Referências. Agradecimento(s) e Apresentação; Fontes de Aquisição e Informe Verbal; Comitê de Ética e Biossegurança devem aparecer antes das referências. **Pesquisa envolvendo seres humanos e animais**

**obrigatoriamente devem apresentar parecer de aprovação de um comitê de ética institucional já na submissão.** Alternativamente pode ser enviado um dos modelos ao lado ([Declaração Modelo Humano](#), [Declaração Modelo Animal](#)).

**5. A nota (Modelo [.doc](#), [.pdf](#)) deverá conter os seguintes tópicos:** Título (Português e Inglês); Resumo; Palavras-chave; Abstract; Key words; Texto (sem subdivisão, porém com introdução; metodologia; resultados e discussão e conclusão; podendo conter tabelas ou figuras); Referências. Agradecimento(s) e Apresentação; Fontes de Aquisição e Informe Verbal; Comitê de Ética e Biossegurança devem aparecer antes das referências. **Pesquisa envolvendo seres humanos e animais obrigatoriamente devem apresentar parecer de aprovação de um comitê de ética institucional já na submissão.**

Alternativamente pode ser enviado um dos modelos ao lado ([Declaração Modelo Humano](#), [Declaração Modelo Animal](#)).

**6.** Não serão fornecidas separatas. Os artigos encontram-se disponíveis no formato pdf no endereço eletrônico da revista [www.scielo.br/cr](http://www.scielo.br/cr).

**7.** Descrever o título em português e inglês (caso o artigo seja em português) - inglês e português (caso o artigo seja em inglês). Somente a primeira letra do título do artigo deve ser maiúscula exceto no caso de nomes próprios. Evitar abreviaturas e nomes científicos no título. O nome científico só deve ser empregado quando estritamente necessário. Esses devem aparecer nas palavras-chave, resumo e demais seções quando necessários.

**8.** As citações dos autores, no texto, deverão ser feitas com letras maiúsculas seguidas do ano de publicação, conforme exemplos: Esses resultados estão de acordo com os reportados por MILLER & KIPLINGER (1966) e LEE et al. (1996), como uma má formação congênita (MOULTON, 1978).

**9.** As Referências deverão ser efetuadas no estilo ABNT (NBR 6023/2000) conforme normas próprias da revista.

**9.1.** Citação de livro:

JENNINGS, P.B. **The practice of large animal surgery**. Philadelphia : Saunders, 1985. 2v.

TOKARNIA, C.H. et al. (Mais de dois autores) **Plantas tóxicas da Amazônia a bovinos e outros herbívoros**. Manaus : INPA, 1979. 95p.

**9.2.** Capítulo de livro com autoria:

GORBAMAN, A. A comparative pathology of thyroid. In: HAZARD, J.B.; SMITH, D.E. **The thyroid**. Baltimore : Williams & Wilkins, 1964. Cap.2, p.32-48.

**9.3.** Capítulo de livro sem autoria:

COCHRAN, W.C. The estimation of sample size. In: \_\_\_\_\_. **Sampling techniques**. 3.ed. New York : John Willey, 1977. Cap.4, p.72-90.

TURNER, A.S.; McLWRAITH, C.W. Fluidoterapia. In: \_\_\_\_\_. **Técnicas cirúrgicas em animais de grande porte**. São Paulo : Roca, 1985. p.29-40.

**9.4.** Artigo completo:

O autor deverá acrescentar a url para o artigo referenciado e o número de identificação DOI (Digital Object Identifiers), conforme exemplos abaixo:

MEWIS, I.; ULRICHS, CH. Action of amorphous diatomaceous earth against different stages of the stored product pests *Tribolium confusum* (Coleoptera: Tenebrionidae), *Tenebrio molitor* (Coleoptera: Tenebrionidae), *Sitophilus granarius* (Coleoptera: Curculionidae) and *Plodia interpunctella* (Lepidoptera: Pyralidae). **Journal of Stored Product Research**, Amsterdam (Cidade opcional), v.37, p.153-164, 2001. Disponível em: <[http://dx.doi.org/10.1016/S0022-474X\(00\)00016-3](http://dx.doi.org/10.1016/S0022-474X(00)00016-3)>. Acesso em: 20 nov. 2008. doi: 10.1016/S0022-474X(00)00016-3.

PINTO JUNIOR, A.R. et al (Mais de 2 autores). Resposta de *Sitophilus oryzae* (L.), *Cryptolestes ferrugineus* (Stephens) e *Oryzaephilus surinamensis* (L.) a diferentes concentrações de terra de diatomea em trigo armazenado a granel. **Ciência Rural**, Santa Maria (Cidade opcional), v. 38, n. 8, p.2103-2108, nov. 2008. Disponível em: <[http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0103-84782008000800002&lng=pt&nrm=iso](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0103-84782008000800002&lng=pt&nrm=iso)>. Acesso em: 25 nov. 2008. doi: 10.1590/S0103-84782008000800002.

#### 9.5. Resumos:

RIZZARDI, M.A.; MILGIORANÇA, M.E. Avaliação de cultivares do ensaio nacional de girassol, Passo Fundo, RS, 1991/92. In: JORNADA DE PESQUISA DA UFSM, 1., 1992, Santa Maria, RS. **Anais...** Santa Maria : Pró-reitoria de Pós-graduação e Pesquisa, 1992. V.1. 420p. p.236.

#### 9.6. Tese, dissertação:

COSTA, J.M.B. **Estudo comparativo de algumas características digestivas entre bovinos (Charolês) e bubalinos (Jafarabad)**. 1986. 132f. Monografia/Dissertação/Tese (Especialização/ Mestrado/Doutorado em Zootecnia) - Curso de Pós-graduação em Zootecnia, Universidade Federal de Santa Maria.

#### 9.7. Boletim:

ROGIK, F.A. **Indústria da lactose**. São Paulo : Departamento de Produção Animal, 1942. 20p. (Boletim Técnico, 20).

#### 9.8. Informação verbal:

Identificada no próprio texto logo após a informação, através da expressão entre parênteses. Exemplo: ... são achados descritos por Vieira (1991 - Informe verbal). Ao final do texto, antes das Referências Bibliográficas, citar o endereço completo do autor (incluir E-mail), e/ou local, evento, data e tipo de apresentação na qual foi emitida a informação.

#### 9.9. Documentos eletrônicos:

MATERA, J.M. **Afecções cirúrgicas da coluna vertebral: análise sobre as possibilidades do tratamento cirúrgico**. São Paulo : Departamento de Cirurgia, FMVZ-USP, 1997. 1 CD.

GRIFON, D.M. Arthroscopic diagnosis of elbow displasia. In: WORLD SMALL ANIMAL VETERINARY CONGRESS, 31., 2006, Prague, Czech Republic. **Proceedings...** Prague: WSAVA, 2006. p.630-636. Acessado em 12 fev. 2007. Online. Disponível em:

<http://www.ivis.org/proceedings/wsava/2006/lecture22/Griffon1.pdf?LA=1>

UFRGS. **Transgênicos**. Zero Hora Digital, Porto Alegre, 23 mar. 2000. Especiais. Acessado em 23 mar. 2000. Online. Disponível em: <http://www.zh.com.br/especial/index.htm>

ONGPHIPHADHANAKUL, B. Prevention of postmenopausal bone loss by low and conventional doses of calcitriol or conjugated equine estrogen. **Maturitas**, (Ireland), v.34, n. 2, p.179-184, Feb 15, 2000. Obtido via base de dados MEDLINE. 1994-2000. Acessado em 23 mar. 2000. Online. Disponível em: <http://www.Medscape.com/server-java/MedlineSearchForm>

MARCHIONATTI, A.; PIPPI, N.L. Análise comparativa entre duas técnicas de recuperação de úlcera de córnea não infectada em nível de estroma médio. In: SEMINARIO LATINOAMERICANO DE CIRURGIA VETERINÁRIA, 3., 1997, Corrientes, Argentina. **Anais...** Corrientes : Facultad de Ciencias Veterinarias - UNNE, 1997. Disquete. 1 disquete de 31/2. Para uso em PC.

**10.** Desenhos, gráficos e fotografias serão denominados figuras e terão o número de ordem em algarismos arábicos. A revista não usa a denominação quadro. As figuras devem ser disponibilizadas individualmente por página. Os desenhos figuras e gráficos (com largura de no máximo 16cm) devem ser feitos em editor gráfico sempre em qualidade máxima com pelo menos 300 dpi em extensão .tiff. As tabelas devem conter a palavra tabela, seguida do número de ordem em algarismo arábico e não devem exceder uma lauda.

**11.** Os conceitos e afirmações contidos nos artigos serão de inteira responsabilidade do(s) autor(es).

**12.** Será obrigatório o cadastro de todos autores nos metadados de submissão. O artigo não tramitará enquanto o referido item não for atendido. Excepcionalmente, mediante consulta prévia para a Comissão Editorial outro expediente poderá ser utilizado.

**13.** Lista de verificação (Checklist [.doc](#), [.pdf](#)).

**14.** Os artigos serão publicados em ordem de aprovação.

**15.** Os artigos não aprovados serão arquivados havendo, no entanto, o encaminhamento de uma justificativa pelo indeferimento.

**16.** Em caso de dúvida, consultar artigos de fascículos já publicados antes de dirigir-se à Comissão Editorial.



Ministério da  
Ciência e Tecnologia

Ministério  
da Educação



Ciência Rural

Universidade Federal de Santa Maria - Centro de Ciências Rurais

Prédio 42, Sala 3104 97105-900 - Santa Maria, RS, Brasil

E-mail: [cienciarural@mail.ufsm.br](mailto:cienciarural@mail.ufsm.br)

Fone/Fax: (55) 32208698

Fax: (55) 32208695