

ISOLAMENTO, CARACTERIZAÇÃO E DINÂMICA DE COLONIZAÇÃO DE *Staphylococcus* spp. EM CÃES INTERNADOS NA UNIDADE DE TERAPIA INTENSIVA DO HOSPITAL VETERINÁRIO DA UFMG

Ana Carolina Coelho Costa^{1*}, Amanda Oliveira Paraguassu², Jordana Almeida Santana³, Patrícia Maria Coletto Freitas⁴, Rafael Garlito Clark Xavier⁵, Ranielle Stephanie Toledo Santana⁶, Rodrigo Otávio Silveira Silva⁴.

¹Discente no Curso de Medicina Veterinária – Universidade Federal de Minas Gerais – UFMG – Belo Horizonte/MG – Brasil – *Contato: carolcoelhoacc568123@gmail.com

²Mestranda em Ciência animal – Universidade Federal de Minas Gerais – UFMG – Belo Horizonte/MG – Brasil

³Mestre em Ciência Animal – Universidade Federal de Minas Gerais – UFMG – Belo Horizonte/MG – Brasil

⁴Docente do Curso de Medicina Veterinária – Universidade Federal de Minas Gerais – UFMG – Belo Horizonte/MG – Brasil

⁵Doutorando em Ciência Animal – Universidade Federal de Minas Gerais – UFMG – Belo Horizonte/MG – Brasil

⁶Residente de Clínica Cirúrgica de Pequenos animais – Universidade Federal de Minas Gerais – UFMG – Belo Horizonte/MG – Brasil

INTRODUÇÃO

Estafilococos, principalmente estafilococos resistentes à meticilina (MRS), são agentes bacterianos importantes no que tange a resistência microbiana, pois possuem ampla capacidade de adquirir e transmitir determinantes de resistência. Nesse sentido, a Unidade de Terapia intensiva (UTI) de ambientes hospitalares é apropriada para a seleção de microrganismos resistentes e multirresistentes^{1,2}, principalmente diante do amplo uso de antimicrobianos, sendo um ambiente com condições favoráveis à seleção e sobrevivência de patógenos multirresistentes. Dessa forma, o objetivo deste trabalho foi isolar, caracterizar e avaliar a dinâmica de colonização e a resistência a antimicrobianos de estirpes de *Staphylococcus* spp., principalmente *S. pseudintermedius* resistente à meticilina (MRSP), isoladas de cães internados na UTI do Hospital Veterinário da Universidade Federal de Minas Gerais (HV-UFGM).

METODOLOGIA

O presente trabalho foi realizado a partir da coleta de amostras de 54 cães internados na UTI do HV-UFGM em Belo Horizonte, Minas Gerais, de agosto de 2019 até abril de 2020, em um total de 264 dias. Foram coletadas amostras de três sítios corporais distintos a partir de suabes, sendo eles narina, axila e reto, uma vez ao dia, desde o primeiro dia de internação até o último. Posteriormente, os suabes foram processados no Laboratório de Bacterioses e Pesquisa da Escola de Veterinária da UFMG. Ademais, houve a análise de dados epidemiológicos de todos os cães. A partir da avaliação das fichas clínicas dos participantes e avaliação de informações sobre idade, sexo, raça, porte, motivo e tempo de internação, comorbidades, uso de antimicrobianos prévio ou durante a internação, profissão do tutor (profissionais de saúde ou outros), convívio com outros animais e óbito. O estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Uso Animal (CEUA) da UFMG sob o protocolo 287/2019.

As amostras foram cultivadas e as colônias sugestivas foram identificadas pela técnica de espectrometria de massa por dessorção/ionização a laser assistida por matriz (MALDI-TOF MS)³. A partir disso, os isolados do Grupo *S. intermedius* (SIG) por MALDI-TOF foram confirmados por reação em cadeia da polimerase (PCR) do gene nuc⁶. Enquanto os isolados não-SIG com escore MALDI-TOF abaixo de 2.000 foram submetidos ao sequenciamento do gene 16S rRNA⁸.

Os isolados de *Staphylococcus* spp. foram submetidos ao teste de susceptibilidade antimicrobiana pelo método de disco-difusão em ágar e interpretada conforme os documentos do Instituto de padrões clínicos e laboratoriais (CLSI), M100-Ed31⁴ e VET01S-Ed5⁵, e *S. aureus* ATCC® 25923 foi usado como controle. Os antimicrobianos testados foram: oxacilina (OXA, 1 µg), cefoxitina (FOX, 30 µg), penicilina (PEN, 10 IU), gentamicina (GEN, 10 µg), eritromicina (ERI, 15 µg), clindamicina (CLI, 2 µg), tetraciclina (TET, 30 µg), ciprofloxacina (CIP, 5 µg), nitrofurantoína (NIT, 300 µg), trimetoprim-sulfametoxazol (SXT, 1,25/23,75 µg), cloranfenicol (CHL, 30 µg), enrofloxacina (ENO, 5 µg) e rifampicina (RIF, 5 µg) (Oxoid, EUA). Estirpes foram consideradas resistentes a múltiplas drogas (MDR) quando resistentes a três ou mais classes de antimicrobianos¹².

Por fim, todos os isolados de *Staphylococcus* foram testados por PCR para determinar se carregavam o gene *mecA*¹¹.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Do total de 501 amostras de suabes, 211 (42,1%) foram isolados de estafilococos de 51 cães (94,4%). Dentre as doze espécies de *Staphylococcus* encontradas nos isolados obtidos, *S. pseudintermedius* foi a espécie mais frequente (71,1%), sendo recuperado de 45 (8,2%) dos 51

cães com isolamento estafilocóico e mais prevalente nos sítios nasal e retal. A segunda espécie mais presente foi *S. aureus*, isolada de 13 cães (25,5%) e recuperada principalmente do sítio nasal.

Tabela 1: Frequência de isolamento de total e por dia de internação de *Staphylococcus* spp., *S. pseudintermedius* e MRSP recuperados de 54 cães internados na UTI do HV-UFGM entre agosto de 2018 e abril de 2019.

Dia	Isolamento <i>Staphylococcus</i> spp. (%)	Cães positivos para <i>Staphylococcus</i> spp. (%)	Isolamento <i>S. pseudintermedius</i> (%)	Cães positivos para <i>S. pseudintermedius</i> (%)	Isolamento MRSP (%)	Cães positivos para MRSP (%)
1	97/162 (59,9%)	45/54 (83,3%)	65/97 (67,0)	37/45 (82,2)	11/97 (11,3)	7/45 (15,6)
2	37/114 (32,5%)	23/38 (60,5%)	25/37 (67,6)	19/23 (82,6)	5/37 (13,5)	4/23 (17,4)
3	29/93 (31,2%)	19/31 (61,3%)	20/29 (69,0)	15/19 (78,9)	5/29 (17,2)	4/19 (21,0)
4	25/60 (41,7%)	14/20 (70,0%)	20/25 (80,0)	11/14 (78,6)	8/14 (32,0)	3/14 (21,4)
5	8/36 (22,2%)	6/12 (50,0%)	7/8 (87,5)	5/6 (83,3)	1/8 (12,0)	1/6 (16,7)
6	6/12 (50%)	4/4 (100,0%)	5/6 (83,3)	4/4 (100,0)	3/6 (50,0)	2/4 (50,0)
7	2/9 (22,2%)	2/3 (66,7%)	2/2 (100,0)	2/2 (100,0)	1/2 (50,0)	1/2 (50,0)
8	5/9 (55,6%)	3/3 (100,0%)	4/5 (80,0)	3/3 (100,0)	2/5 (40,0)	1/3 (33,3)
9	1/3 (33,3%)	1/1 (100,0%)	1/1 (100,0)	1/1 (100,0)	1/1 (100,0)	1/1 (100,0)
10	1/3 (33,3%)	1/1 (100,0%)	1/1 (100,0)	1/1 (100,0)	1/1 (100,0)	1/1 (100,0)
Total	211/501 (42,1%)	51/54 (94,4%)	150/211 (71,0%)	45/51 (88,2%)	38/211 (18,0)	11/51 (21,6%)

No que tange à resistência a antimicrobianos, 158 (74,9%) das 211 amostras isoladas foram resistentes a pelo menos um dos antimicrobianos testados, enquanto 92 (43,6%) foram multirresistentes e apenas 53 (25,1%) foram susceptíveis. Da totalidade de amostras, 57 (27,0%) foram resistentes à meticilina (MRS). Os antimicrobianos com maior número de isolados resistentes foram a penicilina (57,8%) e a tetraciclina (52,1%), enquanto cloranfenicol (7,6%) e nitrofurantoína (1,9%) apresentaram menor quantidade de isolados resistentes. Do total, 20 isolados (41,7%) foram resistentes a 9 classes diferentes de antimicrobianos e desses, 18 apresentaram perfis idênticos de resistência (OXA-ERI-CLI-SUT-ENO-RIF-PEN CIP-TET-GEN).

Na análise de resistência genotípica (gene *mecA*), 48 (84,2%) das 57 estirpes MRS foram positivas para o gene *mecA*. Dos *Staphylococcus* isolados, cinco espécies apresentaram esse gene, sendo a frequência de *S. pseudintermedius* (79,2%) significativamente maior. Na avaliação da dinâmica de isolamento de estirpes de *S. pseudintermedius* resistente à meticilina (MRSP), observou-se uma relação linear significativa entre dias de internação na UTI e proporção de isolados MRSP, na qual para cada dia de internação, espera-se um crescimento de 9,142% de isolados desse tipo, como observado na Figura 2a.

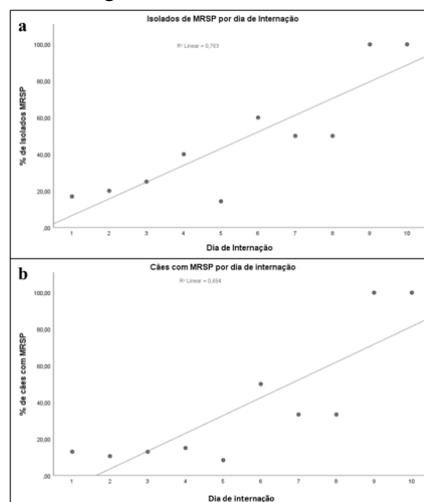
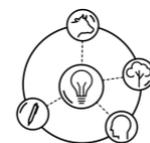


Figura 2: Relação entre o dia de internação e a proporção de estirpes MRSP (a); Relação entre o dia de internação e a proporção de cães positivos para estirpes MRSP.



Essa correlação positiva também foi observada individualmente nos animais, pois para cada dia de internação, espera-se um aumento de 9,748% de cães positivos para MRSP (Figura 2b).

O tempo total de internação também influenciou no número de resistência a diferentes classes antimicrobianas. Conforme mostrado na figura 3, cães com estirpes MRSP resistentes a 9 classes de antimicrobianos permaneceram internados, em média, 6,4 dias, enquanto cães com outras estirpes MRSP tiveram média de internação de 2,4 dias.

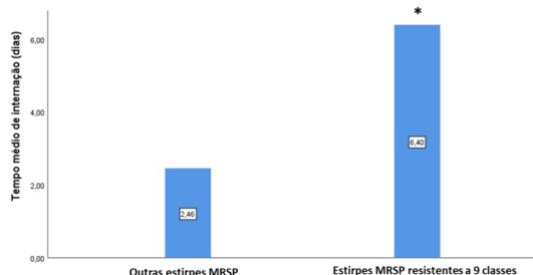


Figura 3: Comparação do tempo médio de dias de internação entre cães com estirpes MRSP resistentes a nove classes de antimicrobianos e cães com outras estirpes MRSP. * Diferença estatística significativa ($p = 0,009$).

Com base na análise epidemiológica dos cães internados, três fatores de risco foram encontrados estatisticamente relevantes para a aquisição de estirpes MRSP na UTI do HV-UFGM. Nesse sentido, a frequência de isolados MRSP foi estatisticamente maior no sexo feminino, em cães idosos e em cães que fizeram uso prévio de antimicrobianos.

Algumas observações de padrões de resistência idênticos e perfis de resistência aos mesmos antimicrobianos ao longo de todo o estudo sugerem que a transmissão de clones de estirpe MRSP estaria ocorrendo na UTI do HV-UFGM. Como por exemplo, o perfil OXA-ERI-CLI-SUT-ENO-RIF-PEN-CIP-TET-GEN foi observado no isolado nasal de um cão no segundo dia de internação, e logo depois, em mais cinco animais, nos quais quatro deles após o terceiro dia de internação e um no primeiro dia de internação. Nesse sentido, a perpetuação desse tipo de perfil durante todo o estudo gera a suspeita de que as estirpes MRSP estaria sendo transmitida e compartilhada por meio de outros modos, como fômites, equipamentos e funcionários, como já descrito em ambientes hospitalares em outros trabalhos^{8,9,10}.

Também há a suspeita de que possa ter ocorrido uma transferência horizontal de genes entre estirpes^{2,6}, pois uma cadela internada com piometra e com dois isolados de *S. aureus* resistentes a nitrofurantoina eram MRSA e, no mesmo dia de internação, outra cadela com piometra foi admitida na UTI do HV-UFGM e possuía uma estirpe de *S. hominis* MRS com o mesmo perfil de resistência.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

De um total de 501 amostras coletadas na UTI do HV-UFGM, 42,1% dos isolados foram de *Staphylococcus* spp., e desses, 71% foram identificados como *S. pseudintermedius*. O estudo também sugeriu que isolamento de suabes nasal e retal apresentam maior probabilidade de isolamento quando comparados ao suabe axilar. Cerca de 75% das amostras isoladas foram resistentes a pelo menos um dos antimicrobianos testados, sendo que quase metade foram MDR e 27%, MRS. Valores altos de resistência a antimicrobianos como a observada neste estudo são esperados em ambientes de UTI, considerando a alta frequência de utilização de antimicrobianos, culminando na seleção de microrganismos multirresistentes^{1,2}.

O estudo também sugere fatores de risco relevantes para a aquisição de estirpes MRSP na UTI, sendo eles cães do sexo feminino, cães idosos e cães que fizeram uso prévio de antimicrobianos.

Este foi o primeiro estudo a avaliar a frequência, resistência antimicrobiana e dinâmica de colonização de estirpes MRSP em cães internados em UTI no Brasil. Por fim, os achados sugerem que clones de estirpes MRSP podem estar circulando e sendo transmitidos no ambiente de UTIs veterinárias.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- NIENHOFF, U. et al. Methicillin-resistant *Staphylococcus pseudintermedius* among dogs admitted to a small animal hospital. **Veterinary Microbiology**, v.150, p.191–197, 2011a. DOI: 10.1016/j.vetmic.2010.12.018.
- SHOEN, H.R.C. et al. Analysis of *Staphylococcus* infections in a veterinary teaching hospital from 2012 to 2015. **Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases**, v.66, p.101332, 2019. DOI: 10.1016/j.cimid.2019.101332.
- ASSIS, G.B.N.; et al. Use of MALDI-TOF Mass Spectrometry for the Fast Identification of Gram-Positive Fish Pathogens. **Frontiers in Microbiology**, v.8, p.1492, 2017. DOI: 10.3389/fmicb.2017.01492.
- CLSI. Performance standards for antimicrobial disk and dilution susceptibility tests for bacteria isolated from animal. 5th ed. CLSI supplement VET01S. Clinical and Laboratory Standards Institute, 2020.
- CLSI. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing. 31th ed. CLSI supplement M100. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute, 2021.
- SASAKI, T. et al. Multiplex-PCR method for species identification of coagulase-positive staphylococci. **Journal of Clinical Microbiology**, 459 v.48, p.765–769, 2010. DOI: 10.1128/JCM.01232-09.
- LERMINIAUX, N.A.; CAMERON, A.D.S. Horizontal transfer of antibiotic resistance genes in clinical environments. **Canadian Journal of Microbiology**, v.65, p.34–44, 2019. DOI: 10.1139/cjm-2018-0275.
- FOX, J.G. et al. *Helicobacter hepaticus* infection in mice: models for understanding lower bowel inflammation and cancer. **Mucosal Immunology**, v.4, p.22–30, 2011. DOI: 10.1038/mi.2010.61.
- GRÖNTHAL, T. et al. Large Outbreak Caused by Methicillin Resistant *Staphylococcus pseudintermedius* ST71 in a Finnish Veterinary Teaching Hospital – From Outbreak Control to Outbreak Prevention. **PLoS ONE**, v.9, 2014. DOI: 10.1371/journal.pone.0110084.
- CUNY, C. et al. Colonization of Dogs and Their Owners with *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus pseudintermedius* in Households, Veterinary Practices, and Healthcare Facilities. **Microorganisms**, v.10, p.677, 2022. DOI: 10.3390/microorganisms10040677.
- MURAKAMI, K. et al. Identification of methicillin-resistant strains of staphylococci by polymerase chain reaction. **Journal of Clinical Microbiology**, v.29, p.2240–2244, 1991. DOI: 10.1128/JCM.29.10.2240-2244.1991.
- SWEENEY, M.T. et al. Applying definitions for multidrug resistance, extensive drug resistance and pandrug resistance to clinically significant livestock and companion animal bacterial pathogens. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v.73, p.1460–1463, 2018. DOI: 10.1093/jac/dky043.

APOIO:



Laboratório de Anaeróbios
Escola de Veterinária - UFGM



Escola de Veterinária
UFGM