

***Staphylococcus aureus* RESISTENTES À METICILINA ISOLADOS DE ANIMAIS DOMÉSTICOS E SILVESTRES EM PROPRIEDADE PLURIATIVA**

JULIANE LEITE ALVES¹; **DÉBORA RODRIGUES SILVEIRA²**; **THAMÍRIS PEREIRA DE MORAES³**; **KAUANA KAEFER⁴**; **THAÍS GONÇALVES GONÇALVES⁵**; **CLAUDIO DIAS TIMM⁶**

¹Universidade Federal de Pelotas – julianemv31@gmail.com

²Universidade Federal de Pelotas – debora.rsilveira@hotmail.com

³Universidade Federal de Pelotas – mirismoraes@hotmail.com

⁴Universidade Federal de Pelotas – kauanakaefer@gmail.com

⁵Universidade Federal de Pelotas – thaais.g@hotmail.com

⁶Universidade Federal de Pelotas – timm@ufpel.edu.br

1. INTRODUÇÃO

A pluriatividade fundamenta-se na utilização de mais de uma atividade agrícola, em grande parte das vezes para aumento da renda. No Rio Grande do Sul, em pequenas propriedades de produção familiar, são comuns estratégias que consistem em manutenção e lucratividade através da criação de diversas espécies de animais no mesmo ambiente, para subsistência e/ou comercialização (SCHNEIDER et al., 2006). Ao serem portadores de microrganismos importantes em saúde pública, como *Staphylococcus aureus*, animais domésticos podem contaminar o homem de forma direta ou indireta (SÁ e FERREIRA, 2007). Um fator considerável a ser estudado é o íntimo contato entre espécies animais, podendo umas contaminarem as outras, gerando assim, a perpetuação de patógenos por se adaptarem a diferentes animais.

S. aureus resistente à meticilina (*Methicillin-resistant Staphylococcus aureus*, MRSA) é um dos principais causadores de infecção nosocomial, resultando em uma variedade de complicações podendo gerar riscos à vida (CHAMBERS, 2001). A principal linhagem isolada é predominantemente associada ao gado (GRAVELAND et al., 2011), outra igualmente relevante está associada a suíños, tendo sido isolada de bovinos e aves (VAN LOO et al., 2007). A evolução da resistência à meticilina por *S. aureus* tem relação com a baixa afinidade por antibióticos β -lactâmicos. Além destes, isolados resistentes à meticilina são também resistentes à maioria dos antimicrobianos normalmente utilizados (UTSUI e YOKOTA, 1985). Atualmente, cefoxitina tornou-se o antibiótico de escolha para os testes de sensibilidade à meticilina, já que a própria meticilina não é mais fabricada (SKOV et al., 2003; FELTEN et al., 2002).

Devido à dificuldade de se obter amostras de animais silvestres, dados sobre portadores de patógenos responsáveis por doenças bacterianas são escassos, sendo necessárias mais investigações por região, para averiguar a importância das bactérias em saúde pública, quando veiculadas por animais silvestres (TOMPKINS et al., 2015). O estudo e compreensão sobre possíveis interações que promovam transmissão de patógenos entre animais silvestres, domésticos e seres humanos permanecem necessários, para que assim seja possível definir estratégias de controle.

Este trabalho teve como objetivo verificar a presença de MRSA em isolados de fezes de animais, tanto domésticos como silvestres, que vivem próximo aos seres humanos em uma propriedade rural que realiza pluriatividade.

2. METODOLOGIA

Foram utilizados isolados de *Staphylococcus* coagulase positiva obtidos no trabalho de SILVEIRA et al. (2019) a partir de fezes de aves silvestres das espécies Canário-da-terra (*Sicalis flaveola*) (2), Sabiá-laranjeira (*Turdus rufiventris*) (1), João-de-barro (*Furnarius rufus*) (1) e Pardal (*Passer domesticus*) (1), e isolados obtidos a partir de fezes de animais domésticos, sendo eles porcos (3), gatos (3), galinhas (2), cães (2), perus (2), ovelhas (1) e cavalo (1). Os isolados foram recuperados do estoque passando-se 100 µL de cada para tubos contendo 3 mL de caldo Infusão de Cérebro e Coração (BHI, Acumedia, Michigan, USA) e incubados a 36 °C por 24 h. Os pellets das culturas foram submetidos à 100 µL de lisostafina à 36 °C por 1 h. Foi realizada a extração do DNA dos isolados conforme Sambrook e Russel (2001) e, após, foi realizada a Reação em Cadeia da Polimerase (PCR), pesquisando a presença do gene *nuc* com uso dos primers au-F3 e au-nucR (TAKASHI et al., 2010) para identificação da espécie *S. aureus*.

As cepas confirmadas como *S. aureus* foram submetidas ao teste de disco difusão em Ágar Müller-Hinton (Kasvi, Itália), utilizando o disco de cefoxitina 30 µg (SKOV et al., 2003) para a identificação de MRSA. Os resultados obtidos foram avaliados segundo o *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI, 2015), que considera o microrganismo resistente quando o halo possuir diâmetro menor ou igual a 21 mm e sensível halo com diâmetro maior ou igual a 22 mm.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Dos 19 isolados obtidos por SILVEIRA et al. (2019) e classificados como *Staphylococcus* coagulase positiva, 16 (84%) foram identificados como pertencentes à espécie *Staphylococcus aureus* pela PCR. Estes isolados foram obtidos a partir de fezes de aves silvestres das espécies *Sicalis flaveola* (1/2), *Turdus rufiventris* (1/1), *Furnarius rufus* (1/1) e *Passer domesticus* (1/1), e de fezes dos animais domésticos porcos (3/3), gatos (2/3), galinhas (2/2), cães (2/2), perus (2/2) e ovelha (1/1). Destes, oito (50%), foram resistentes à cefoxitina, os quais foram obtidos de fezes de galinhas (2/2), porcos (1/3), cães (1/2), perus (1/2) e das aves silvestres das espécies *Sicalis flaveola* (1/2), *Turdus rufiventris* (1/1) e *Furnarius rufus* (1/1).

Os animais domésticos porco, ovelha, peru e galinha criados nas propriedades pluriativas servem para o consumo, produzindo carne e ovos, ou para companhia no caso de cão e gato. Estas espécies albergando *S. aureus* constituem potenciais transmissores do patógeno ao homem, seja pelo contato direto, através do consumo desses produtos ou pela contaminação do ambiente e da água (SÁ e FERREIRA, 2007).

Este estudo demonstrou que *Sicalis flaveola*, *Turdus rufiventris*, *Furnarius rufus* e *Passer domesticus* podem servir como reservatório de *S. aureus*, podendo disseminar o patógeno através das fezes no meio ambiente. Desta forma, além de ameaçar a saúde humana e dos animais domésticos, constituem potencial fonte de contaminação para outros animais silvestres. Por outro lado, as espécies silvestres de vida livre podem se contaminar com os animais domésticos e humanos (DASZAK et al., 2000). O fato das três primeiras espécies de aves de livre estarem carreando MRSA pressupõe que a contaminação dessas aves silvestres tenha ocorrido a partir de animais domésticos ou humanos, de onde estas cepas são originárias.

Algumas cepas de MRSA têm poucas restrições de especificidade quanto ao hospedeiro, possuindo a capacidade de colonizar várias espécies, possivelmente este seja o caso na presente propriedade, onde houve alta taxa de isolamento de MRSA entre os animais. A presença de cepas MRSA pouco espécie-específicas em propriedades aumentam a preocupação em relação a disseminação entre animais e ao potencial de contaminação de seres humanos. Uma vez MRSA infectando humanos há grande dificuldade de tratamento dos pacientes, tendo em vista a ampla resistência deste microrganismo aos antibióticos. Para que seja possível detectar mudanças na epidemiologia e implementar medidas de controle efetivas em propriedades pluriativas, se faz necessária a vigilância contínua de MRSA em humanos e animais (GRAVELAND et al., 2011).

4. CONCLUSÕES

S. aureus, incluindo MRSA, pode estar presente tanto nas fezes dos animais domésticos porco, gato, galinha, cão, peru e ovelha, como dos animais silvestres *Sicalis flaveola*, *Turdus rufiventris*, *Furnarius rufus* e *Passer domesticus* em uma mesma propriedade pluriativa. A ocorrência de cepas MRSA representa risco adicional à saúde humana, tendo em vista as dificuldades de tratamento inerentes a elas.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

CHAMBERS, H.F. The changing epidemiology of *Staphylococcus aureus*? **Emerging infectious diseases**, v.7, n.2, p.178, 2001.

CLSI. **Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing**. Twenty Fourth Informational Supplement. CLSI document M100-S24. Wayne: Clinical and Laboratory Standards Institute, 2015.

DASZAK, P.; CUNNINGHAM, A.A.; HYATT, A.D. Emerging infectious diseases of wildlife-threats to biodiversity and human health. **Science**, v.287, n.5452, p.443-449, 2000.

DE SÁ, M.I., FERREIRA, C. Importância das zoonoses na segurança alimentar. 2007. Acessado em 12 set. 2019. Online. Disponível em: <http://www.infoqualidade.net/SEQUALI/PDF-SEQUALI-02/n02-14-17.pdf>.

FELTEN, A.; GRANDRY, B.; LAGRANGE, P.H.; CASIN I. Evaluation of three techniques for detection of low-level methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA): a disk diffusion method with cefoxitin and moxalactam, the Vitek 2 system, and the MRSA-screen latex agglutination test. **Journal of Clinical Microbiology**, v.40, n.8, p.2766-2771, 2002.

GRAVELAND, H.; DUIM, B.; VAN DUIJKEREN, E.; HEEDERIK, D.; WAGENAAR, J.A. Livestock-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in animals and humans. **International Journal of Medical Microbiology**, v.301, n.8, p.630-634, 2011.

SAMBROOK, J.; RUSSEL, D.W. **Molecular Cloning: A Laboratory Manual.** 3^ºed. Nova York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001. 999 p.

SCHNEIDER, S. **A diversidade da agricultura familiar.** 2. ed. Porto Alegre: Editora da UFRGS, 2006. p.137-164.

SILVEIRA, D.; de MORAES, T.P.; KAEFER, K.; BACH, L.G.; TIMM, C.D. *Staphylococcus* coagulase positiva isolados de animais silvestres e domésticos em propriedade pluriativa. In: **Encontro de Pós-graduação, 11.III MOSTRA ACADÉMICA DO VII SIMPÓSIO DE BIOTECNOLOGIA**, Pelotas, 2019, *Anais....* Pelotas: XXI Encontro de Pós-Graduação, 2016.

SKOV, R.; SMYTH, R.; CLAUSEN, M.; LARSEN, A.R.; FRIMODT-MOLLER, N.; OLSSON-LIJEQUIST, B.; KAHLMETER, G. Evaluation of a cefoxitin 30 microg disc on Iso-Sensitest agar for detection of methicillin resistant *Staphylococcus aureus*. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v.52, n.2, p.204-7, 2003.

TAKASHI, S.; TSUBAKISHITA, S.; TANAKA, Y.; SAKUSABE, A.; OHTSUKA, M.; HIROTAKI, S.; KAWAKAMI, T.; FUKATA, T.; HIRAMATSU, K. Multiplex-PCR method for species identification of coagulase-positive Staphylococci. **Journal of Clinical Microbiology**, v.48, n.3, p.765-769, 2010.

TOMPKINS, D.M.; CARVER, S.; JONES, M.E.; KRKOŠEK, M.; SKERRATT, L.F. Emerging infectious diseases of wildlife: a critical perspective. **Trends in parasitology**, v.31, n.4, p.149-159, 2015.

UTSUI, Y.; YOKOTA, T. Role of an altered penicillin-binding protein in methicillin- and cepham-resistant *Staphylococcus aureus*. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v.28, n.3, p.397-403, 1985.

VAN LOO, I.; HUIJSDENS, X.; TIEMERSMA, E.; DE NEELING, A.; VAN DE SANDE-BRUINSMA, N.; BEAUJEAN, D.; KLUYTMANS, J. Emergence of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* of animal origin in humans. **Emerging infectious diseases**, v.13, n.12, p.1834, 2007