



AMANDA CARVALHO ROSADO

**ESTÁGIO SUPERVISIONADO REALIZADO NO
LABORATÓRIO ZOONOSES BACTERIANAS DA
UNIVERSIDADE SÃO PAULO-USP**

LAVRAS-MG

2019

AMANDA CARVALHO ROSADO

**ESTÁGIO SUPERVISIONADO REALIZADO NO
LABORATÓRIO ZOONOSES BACTERIANAS DA
UNIVERSIDADE SÃO PAULO-USP**

Relatório de estágio supervisionado apresentado à
Universidade Federal de Lavras, como parte das
exigências do Curso de Medicina Veterinária, para
a obtenção do título de Bacharel.

Prof. Elaine Maria Seles Dorneles

Orientador

LAVRAS-MG

2019

AMANDA CARVALHO ROSADO

**ESTÁGIO SUPERVISIONADO REALIZADO NO
LABORATÓRIO ZOONOSES BACTERIANAS DA
UNIVERSIDADE SÃO PAULO-USP**

**SUPERVISED STAGE IN THE LABORATORY ZOONOSES
BACTERIANS UNIVERSITY OF SÃO PAULO-USP**

Relatório de estágio supervisionado apresentado à
Universidade Federal de Lavras, como parte das
exigências do Curso de Medicina Veterinária, para
a obtenção do título de Bacharel.

APROVADO em 24/05/2019

Dr. Elaine Maria Seles Dorneles UFLA

Me. Dircéia Aparecida Costa Custódio UFLA

M.V. Maysa Serpa Gonçalves UFLA

Prof. Elaine Maria Seles Dorneles

Orientador

LAVRAS-MG

2019

À Deus, meu criador e salvador.

Dedico

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente à Deus que me permitiu realizar o sonho de me tornar médica veterinária. Agradeço por ser meu sustento durante toda essa caminhada, e ser minha esperança de que no fim tudo daria certo.

À meus pais Heloísa e Maurício que me apoiaram a todo momento, orando por mim e me ajudando naquilo que lhes era possível. A compreensão de vocês foi essencial para chegar até aqui.

Aos meus irmãos Sara, Guilherme e Sofia que alegam meus dias, e dos quais tenho muito orgulho.

Ao meu amado noivo Walter, por todo apoio, força, compreensão e por ser um amigo sempre presente.

Aos meus pets Julieta, Spike e Julyly “*in memoriam*” que foram minhas cobaias durante todo o curso e que me alegraram todos os dias ao chegar em casa.

Aos meus tios Miriam, Adesilto e a minha prima Bárbara, por me acolherem durante o longo período de estágio.

Ao meu padrasto Maurício por sempre me incentivar, ensinar e auxiliar a estudar e correr atrás dos meus sonhos.

Aos meus sogros Walter e Adriana, por sempre estarem presente e me socorrem nos momentos em que precisei

Às minhas amigas Rafaela e Laís pela amizade, companheirismo e por compartilhar momentos difíceis, e alegres durante todo o curso.

Aos demais colegas de curso, por compartilharmos momentos memoráveis.

À Universidade Federal de Lavras por todo conhecimento ofertado através de profissionais e técnicos qualificados, em especial minha orientadora professora Elaine Maria Seles Dorneles e a amiga Dircéia Aparecida Costa Custódio.

Aos amigos do Núcleo de Estudos em Microbiologia Veterinária (NEMIV) e do Laboratório de Epidemiologia Molecular (LEM) por todo conhecimento alcançado e compartilhado.

Aos amigos do Laboratório de Zoonoses Bacterianas (LZB), por toda compreensão e paciência em me ensinar, em especial ao professor Marcos Bryan Heinemann.

Aos amigos da Vale Church pelas orações e apoio sempre.

Enfim muito obrigada a todos que contribuíram de forma direta ou indireta para a realização deste sonho.

“Um pouco de ciência nos afasta de Deus, muito nos aproxima.”

Louis Pasteur

RESUMO

No último período do curso de medicina veterinária é realizado o estágio supervisionado, no qual o aluno deve escolher uma instituição ou empresa conveniada para realizar estágio com o objetivo de ingressar na vivência profissional da área pretendida. O estágio relatado nesse trabalho foi realizado no Laboratório de Zoonoses Bacterianas (LZB) da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia (FMVZ) da Universidade de São Paulo (USP), no período de 04 de fevereiro de 2019 ao dia 30 de abril de 2019, sob orientação da Professora Elaine Maria Seles Dorneles e supervisionado pelo Professor Marcos Bryan Heinemann. Este relatório descreve a estrutura física do local, bem como as atividades realizadas no período de estágio. Apresenta também os resultados do projeto piloto de interesse do professor supervisor, intitulado “ESTUDO DA PREVALÊNCIA DE *Staphylococcus spp.* EM EQUINOS E PERFIL DE RESISTÊNCIA ANTIMICROBIANA” realizado durante o período de estágio. A pesquisa foi realizada no LZB utilizando material coletado de vestíbulo nasal de equinos internados no Hospital Veterinário da USP, e permitiu identificar resistência a antimicrobianos comumente na medicina equina. As experiências vivenciadas no estágio permitiram a aplicação e aprimoramento dos conhecimentos adquiridos ao longo do curso de graduação, bem como possibilitou adquirir novos conhecimentos, sobretudo nas áreas de microbiologia veterinária, biologia molecular e diagnóstico laboratorial.

Palavras-chave: doenças zoonóticas, resistência antimicrobiana, veterinária preventiva

ABSTRACT

In the last period of the veterinary medicine undergraduate course is carried out the supervised internship, in which the student must choose an institution or company to perform an internship with the objective of joining the professional experience of the intended area. The internship reported in this study was conducted at the Laboratório de Zoonoses Bacterianas (LZB), Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia (FMVZ), Universidade de São Paulo (USP), from February 4th, 2019 to April 30th, 2019, being Professor Elaine Maria Seles Dorneles the advisor and Professor Marcos Bryan Heinemann the supervisor of the internship. This report describes the physical structure of the laboratory, as well as the activities carried out during the internship period. It also shows the results of a pilot project of interest of the supervisor professor, entitled "STUDY OF THE PREVALENCE OF *Staphylococcus* spp. IN EQUINE AND PROFILE OF ANTIMICROBIAL RESISTANCE" performed during the period of training. The research was conducted at the LZB using material collected from the nasal vestibule of interned horses hospitalized in the university's Veterinary Hospital and allowed to identify resistance to antimicrobials commonly used in equine medicine. Experiences experienced in the internship allowed the application and improvement of the knowledge assimilated during the undergraduate course, as well as it made possible the acquisition of new knowledge, especially in the fields of veterinary microbiology, molecular biology and laboratory diagnostics.

Key words: zoonotic diseases, antimicrobial resistance, preventive veterinary

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Praça principal da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia.....	17
Figura 2: Visão do almoxarifado do LZB. Local onde é armazenado o material de reposição utilizado na rotina do laboratório.....	18
Figura 3: Visão da sala de lavagem: local de lavagem e esterilização de vidrarias e meios de cultura, bem como o preparo destes. Pode-se ver também freezers e geladeiras utilizados no armazenamento de amostras e reagentes.....	19
Figura 4: Visão geral da sala analítica do Laboratório de Zoonoses Bacterianas (LZB).....	20
Figura 5: Sala de cultivo do Laboratório de Zoonoses Bacterianas (LZB).....	20
Figura 6: Visão geral da sala de Eletroforese.....	20
Figura 7: Laboratório de Biologia Molecular, local destinado a extração de DNA, e PCR, do Laboratório de Zoonoses Bacterianas (LZB).....	21
Figura 8: Visualização de <i>Leptospira</i> spp. sob microscopia de campo escuro.....	23
Figura 9: Gel de agarose 1,5% (p/v), corado com SYBR Safe DNA gel stain (Invitrogen®) evidenciando marcador de peso molecular 100pb (1 e 17), DNA de <i>Leptospira</i> usado como controle positivo (2), TE (pH8,0) usado como controle negativo (3) e amostras testadas (4-16) para o gene <i>Lep</i> (330 pb).....	25
Figura 10: Observação sob microscopia de campo escuro de formação de complexo antígeno anticorpo em mais de 50% do campo.....	27
Figura 11: Teste do AAT evidenciando os soros 1, 2, 3 e 4 como positivos e os soros 5 e 6 como negativos. Na amostra de soro 2 a aglutinação é mais evidente.....	31
Figura 12: Leitura de diluição em 2-ME evidenciando soro positivo com titulação 100.....	32
Figura 13: Leitura do halo de inibição através da medida do seu diâmetro.....	36
Figura 14: Gel de agarose 1,5% (p/v), corado com SYBR Safe DNA gel stain (Invitrogen®) evidenciando marcador de peso molecular 100pb (1), DNA de <i>S. aureus</i> usado como controle positivo para os genes 16S rna (228 pb) e <i>nuc</i> (359 pb) (2), DNA de <i>Staphylococcus</i> spp. usado	

como controle positivo para o gene 16S TE (pH8,0) usado como controle negativo (4) e amostras testadas (5-26).....39

Figura 15: Gel de agarose 1,5% (p/v), corado com SYBR Safe DNA gel stain (Invitrogen®) evidenciando marcador de peso molecular 100pb (1), DNA de *S. aureus* positivo para o gene *mecA* usado como controle positivo (163pb) (2), TE (pH8,0) usado como controle negativo (3) e amostras testadas (4-29).....39

Figura16: Gel de agarose 1,5% (p/v), corado com SYBR Safe DNA gel stain (Invitrogen®) evidenciando marcador de peso molecular 100pb (1), DNA de *S. aureus* positivo para o gene *mecC* usado como controle positivo (188pb) (2), TE (pH8,0) usado como controle negativo (3) e amostras testadas (4-8).....40

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

2-ME: 2 Mercapto-etanol

AAT: Teste do Antígeno Acidificado Tamponado

ANVISA: Agência Nacional de Vigilância Sanitária

BAAR: Bacilos Álcool-ácido resistentes

BHI: Brain Heart Infusion

CCZ: Centros de Controle de Zoonoses

CIM: Concentração inibitória mínima

CLSI: Clinical and Laboratory Standards Institute

DNA: Ácido desoxirribonucleico

EDTA: Ácido etilenodiamino tetra-acético

EMJH: Ellighausen, McCullough, Johnson e Harris

FMVZ: Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia

HOVET: Hospital Veterinário

HPC: Cloreto de hexadecilpiridínio

LZB: Laboratório de Zoonoses Bacterianas

MAPA: Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento

MAT: Microscopic Agglutination Test

MRSA *Staphylococcus aureus* resistentes a meticilina

MTBC: Complexo *Mycobacterium tuberculosis*

NCCLS: National Committee for Clinical Laboratory Standards

OIE: Organização Mundial de Saúde Animal

PCR: Reação em cadeia da Polimerase

PNCEBT: Programa Nacional de Controle e erradicação da Brucelose e Tuberculose Bovina

PRG: Pró Reitoria de Graduação

SAL: Soroaglutinação lenta

SAM: Soroaglutinação Microscópica

SCN: *Staphylococcus* coagulase negativo

TAL: Teste do Anel do Leite

UFLA: Universidade Federal de Lavras

USP: Universidade São Paulo

UVZ: Unidades de Vigilância de Zoonoses

VPS: Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Animal

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Antígenos do gênero <i>Leptospira</i> empregados no teste de Soroaglutinação Microscópica (SAM), listados por sorogrupo com seus respectivos sorovares.....	26
Tabela 2. Iniciadores utilizados na PCR duplex para identificação do gênero <i>Staphylococcus</i> e da espécie <i>S.aureus</i>	37
Tabela 3. Iniciadores utilizados na PCR para identificação do genes <i>mecA</i> e <i>mecC</i> , responsáveis por conferir resistência a metilina.....	37
Tabela 4. Frequência de isolados resistentes e sensíveis aos antimicrobianos testados.....	40

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	16
2 DESCRIÇÃO DO LOCAL DE ESTÁGIO	16
3 DESCRIÇÃO DAS ATIVIDADES	21
3.1 Recepção das Amostras.....	21
3.2 Rotina de <i>Leptospira</i>	22
3.2.1 Cultura e isolamento	23
3.2.2 Identificação molecular: reação em cadeia da polimerase (PCR)	24
3.2.3 Identificação Sorologica	25
3.3 Rotina de Tuberculose Bovina.....	27
3.4 Rotina de Brucelose	29
3.4.1 Teste do Antígeno Acidificado Tamponado (AAT)	30
3.4.2 Teste do 2-Mercaptoetanol (2-ME)	31
4 PROJETO PILOTO.....	33
4.1 Referencial Teórico.....	33
4.2 Objetivos.....	34
4.3 Material e Métodos.....	34
4.3.1 Coleta das amostras.....	34
4.3.2 Cultivo e isolamento	35
4.3.3 Identificação em ágar cromogênico ACCUSTAPH®	35
4.3.4 Teste de Sensibilidade a antimicrobianos.....	35
4.3.5 Identificação molecular por PCR.....	36
4.3.6 Identificação molecular dos genes <i>mecA</i> e <i>mecC</i>	37
4.3.7 Eletroforese.....	38
4.4 Resultados	38

4.5 Conclusões	40
5 CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	41
6 REFERÊNCIAS	42

1. INTRODUÇÃO

O último período do curso de Medicina Veterinária na Universidade Federal de Lavras (UFLA) é composto por uma disciplina denominada Estágio Supervisionado (PRG 107), na qual o aluno deve escolher uma instituição ou empresa conveniada com a Universidade para realizar o estágio. Este estágio tem por objetivo promover a aplicação dos conhecimentos adquiridos ao longo do curso, bem como a aquisição de novas experiências e expertises. A disciplina é composta por 408 horas práticas e 68 horas teóricas que são destinadas a confecção do trabalho de conclusão do curso juntamente com o orientador.

O local de escolha para realização do estágio supervisionado foi o Laboratório de Zoonoses Bacterianas (LZB) da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia (FMVZ) da Universidade de São Paulo (USP). O presente relatório descreve as atividades desenvolvidas durante o período de estágio, que ocorreu entre os dias 04 de fevereiro de 2019 e 30 de abril de 2019. O estágio foi supervisionado pelo professor Dr. Marcos Bryan Heinemann, docente da instituição e orientado pela professora Elaine Maria Seles Dorneles, docente da Universidade Federal de Lavras.

A palavra zoonose vem do grego, na qual “zoon” significa animal e “nosos” doenças, ou seja, significa de acordo com a etimologia da palavra “doenças animais”. O nome se consagrou e foi definido, em umas das reuniões dos Peritos em Zoonoses da Organização Mundial da Saúde em 1967, como: as doenças e infecções naturalmente transmissíveis entre os hospedeiros vertebrados e o homem. (World Health Organization, 1967)

As zoonoses constituem um sério risco a saúde pública, e por isso, no Brasil, desde 1970 ações de controle e prevenção de zoonoses vem sendo oficialmente estruturadas. Entre estas ações destacam-se a criação de Centros de Controle de Zoonoses (CCZ), Unidades de Vigilância de Zoonoses (UVZ) e a elaboração de Manuais Técnicos com as normatizações de vigilância prevenção e controle das zoonoses. (Ministério da Saúde, 2016).

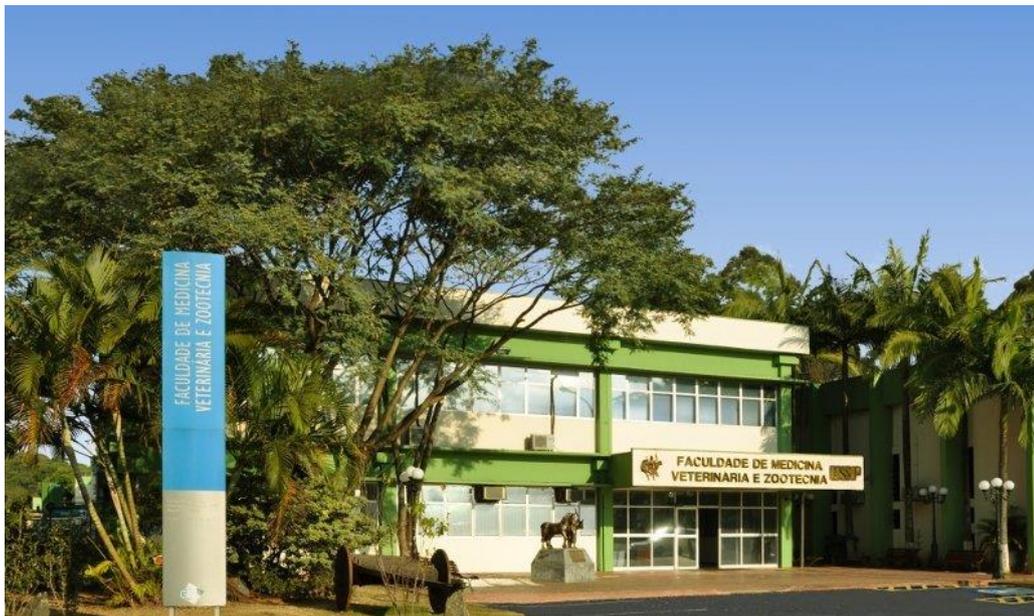
Os agentes etiológicos zoonóticos podem ser diversos, como por exemplos protozoários, fungos, vírus e bactérias. As zoonoses bacterianas têm como exemplo a brucelose, tuberculose, leptospirose, estafilococose, entre outras que são de grande relevância dentro da saúde animal e humana, e que justificam o local de escolha.

Este relatório também apresenta o projeto denominado “ESTUDO DA PREVALÊNCIA DE *Staphylococcus spp.* EM EQUINOS E PERFIL DE RESISTÊNCIA ANTIMICROBIANA”, realizado pela estagiária durante o período de estágio.

2. DESCRIÇÃO DO LOCAL DE ESTÁGIO

A USP é uma universidade pública mantida pelo governo do estado de São Paulo criada oficialmente em 1934. Atualmente, a universidade oferta 183 cursos de graduação e mais de 269 programas de pós-graduação, sendo responsável por mais de 20% da produção científica brasileira. Dentre os cursos de graduação ofertados está o de Medicina Veterinária que passou a integrar a universidade no ano de 1935, e que hoje é acreditada pelo Conselho Federal de Medicina Veterinária. A FMVZ está localizada na Cidade Universitária em São Paulo (Figura 1), mas também possui atividades no Campus Fernando Costa em Pirassununga-SP.

Figura 1: Praça principal da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia



Fonte: Portal FMVZ- USP

A infraestrutura de sede no Campus Universitário é dividida em 5 departamentos, entre os quais está o Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Animal (VPS). Instalado em 1969, este tem por objetivo “desenvolver atividades de formação, pesquisa e extensão, visando a solução de problemas nacionais relativos à Saúde Animal, Saúde Pública Veterinária e Higiene dos Alimentos”. O LZB, cujo os docentes responsáveis são os professores Dr. Marcos Bryan Heinemann e Dr. José Soares Ferreira Neto, constitui um dos laboratórios do VPS e atua nas linhas de pesquisas relacionadas a leptospirose, brucelose, tuberculose e estafilococose. O laboratório também atende a comunidade externa com a realização de diagnósticos laboratoriais.

O LZB, onde foi realizado o estágio, é dividido em quatro salas sendo estas: almoxarifado (Figura 2), sala de lavagem (Figura 3), sala analítica e sala de cultivo. Possui ainda, duas salas anexas sendo uma a sala de eletroforese e a outra a sala de biologia molecular.

O laboratório possui duas técnicas responsáveis, e é aberto a pesquisadores da área, bem como a alunos de mestrado, doutorado, bolsistas de iniciação científica e estagiários.

Figura 2: Visão do almoxarifado do LZB. Local onde é armazenado o material de reposição utilizado na rotina do laboratório.



Fonte: Do autor (2019)

Figura 3: Visão da sala de lavagem: local de lavagem e esterilização de vidrarias e meios de cultura, bem como o preparo destes. Pode-se ver também freezers e geladeiras utilizados no armazenamento de amostras e reagentes.



Fonte: Do autor (2019)

A sala analítica (Figura 4), é o local no qual são recebidas e registradas as amostras para diagnóstico, sendo também o local de processamento de algumas delas. Esta sala possui uma

grande bancada que é utilizada para realização de alguns exames que dispensam um ambiente estéril. Há também, quatro microscópios de campo escuro que são utilizados para visualização de bactérias do Gênero *Leptospira* spp., um microscópio óptico, algumas estufas para crescimento microbiológico e uma capela de exaustão.

Figura 4: Visão geral da sala analítica do Laboratório de Zoonoses Bacterianas (LZB).



Fonte: Do autor (2019)

Logo após a sala analítica, localiza-se a sala de cultivo (Figura 5), na qual é armazenado em estufas, a coleção de amostras de diferentes sorovares de *Leptospira* spp. do LZB. Nesta sala, também há duas capelas de fluxo laminar, uma para manipulação de material contaminado como tecidos ou outros tipos de amostras que serão analisados por exame bacteriológico, e a outra destinada apenas para a distribuição de meios de cultura.

A sala de Eletroforese (Figura 6) é utilizada para preparo de gel de agarose, para o próprio processo de eletroforese e para a foto-documentação do gel. Para isso a sala é equipada com um micro-ondas, cubas de eletroforese de vários tamanhos e um fotodocumentador.

Figura 5: Sala de cultivo do Laboratório de Zoonoses Bacterianas (LZB).



Fonte: Do autor (2019)

Figura 6: Visão geral da sala de Eletroforese.



Fonte: Do autor (2019)

O laboratório de Biologia Molecular (Figura 7) é dividido em duas partes, uma parte principal e uma sala de preparo de mix da Reação em cadeia da polimerase (PCR). O laboratório possui uma geladeira para armazenamento de reagentes, dois freezers para manutenção de amostras e de alguns reagentes, dois aparelhos termocicladores e centrífugas.

Figura 7: Laboratório de Biologia Molecular, local destinado a extração de DNA, e PCR, do Laboratório de Zoonoses Bacterianas (LZB).



Fonte: Do autor (2019)

Durante o período do estágio foi feita a visita no Clínica de Equinos do Hospital Veterinário (HOVET) da USP para a coleta de material utilizado no projeto piloto descrito neste relatório. O HOVET foi criado em 1981, e é considerado o maior da América Latina em relação ao número de casos atendidos. Atualmente conta com profissionais qualificados para o atendimento de cães e gatos, aves e grandes animais. A área destinada ao atendimento específico de grandes animais conta com a Clínica de Bovinos e Pequenos Ruminantes, Clínica Médica de Equinos e Cirurgia de Grandes animais, entre os quais o número de equinos atendidos se expressa de maneira relevante.

3. DESCRIÇÃO DAS ATIVIDADES

Previamente ao início das atividades foi estabelecido um plano de trabalho elaborado pelo professor supervisor do estágio. Dentre as atividades descritas no plano de trabalho constavam: a) acompanhamento da rotina de técnicas de limpeza, desinfecção e manutenção do ambiente do laboratório e infectório, bem como do material utilizado; b) rotina de cultivo de *Leptospira*, preparo de meios de cultivo, preparo de inóculo, observação dos tubos de cultivo, microscopia de campo escuro; c) execução da técnica de PCR para identificação de *Leptospira* em amostras clínicas e de cultivo; d) realização de prova sorológica para a detecção de

anticorpos anti-*Leptospira*; e) rotina de descontaminação e cultivo de tuberculose bovina; f) identificação de *Mycobacterium* por coloração de Ziehl- Neelsen; g) rotina de provas sorológicas para detecção de anticorpos anti-*Brucella*.

3.1 Recepção das amostras

Todas as amostras que são recebidas pelo LZB são conferidas e registradas em um caderno específico para o exame solicitado. São anexados os dados do solicitante, a data de entrada do material no laboratório e posteriormente ao seu processamento, o resultado.

O conjunto de amostras recebe uma codificação própria, a qual refere-se a ordem e ano de chegada no laboratório acrescidos da letra M inicialmente. Como exemplo, a primeira amostra de 2019 recebeu o código M1/2019.

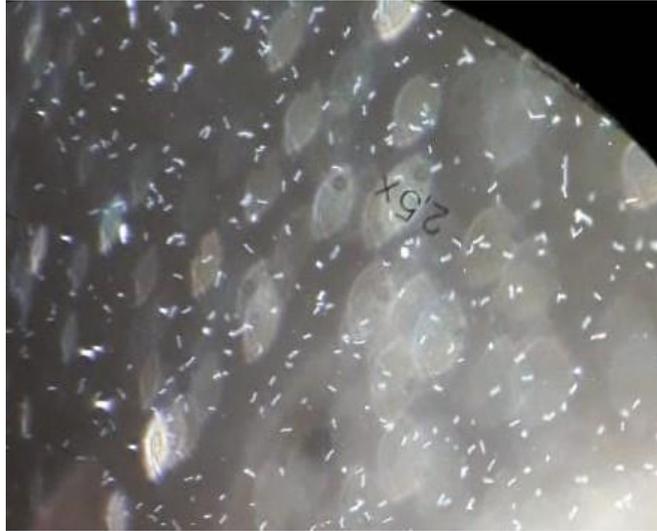
As requisições e solicitações de exames são arquivadas em pastas físicas identificadas para cada análise, obtendo-se dessa forma maior controle das entradas e saídas do laboratório.

3.2 Rotina de *Leptospira*

O gênero *Leptospira* é um dos gêneros da família *Leptospiraceae* da ordem Spirochaetales, e que segundo Adler (2011) se divide em mais de 230 sorovares de acordo com caracterizações sorológicas e moleculares.

As bactérias pertencentes a este gênero apresentam formato espiral, são flexíveis, medem 0,1 a 0,2 μm de diâmetro por 6 a 20 μm de comprimento, e quando observadas por microscópio de campo escuro (Figura 8), apresentam em sua extremidade em formato de ponto de interrogação (GOMES, 2019).

Figura 8: Visualização de *Leptospira* spp. sob microscopia de campo escuro.



Fonte: Do autor (2019)

Em relação ao metabolismo, são anaeróbias e exigentes nutricionalmente, necessitando de fontes de ácidos graxos de cadeia longa como fonte de carbono. Tem seu crescimento ótimo em temperatura de 28 a 30°C e em pH neutro (7,2-7,6) (LEVETT, 2001).

A leptospirose é classificada como antroponose direta, endêmica de distribuição mundial e que afeta diversas espécies de animais domésticos e silvestres, ocorrendo também no homem (McBride et al., 2005). Os sinais clínicos podem ser diversos como febre, dor de cabeça, dores no corpo e em casos mais graves icterícia, insuficiência renal e hemorragias.

O diagnóstico pode ser feito por meio de cultura e o isolamento, porém a *Leptospira* requer um longo período de cultivo. Outras opções seriam a detecção do agente utilizando a técnica de PCR, e a detecção de anticorpos anti-*Leptospira* por meio da soroprecipitação microscópica (SAM), recomendada pela Organização Mundial de Saúde Animal (OIE), 2018.

3.2.1 Cultura e isolamento

No LZB as amostras clínicas de urina, para as quais foram solicitadas isolamento, são diluídas em solução salina de Sørensen (pH 7,4) ou filtradas em membrana 0,22 µm e semeadas em duplicata no meio de cultura líquido EMJH (Ellinghausen, McCullough, Johnson e Harris), e meio semissólido de Fletcher. As amostras semeadas são incubadas em estufa bacteriológica a 28° C por um período mínimo de 6 semanas, sendo somente após esse período consideradas negativas. Os cultivos são examinados semanalmente quanto a turvação do meio, observados em caixa preta com presença de luz, e quanto a presença de formas bacterianas compatíveis com *Leptospira*, observadas sob microscopia de campo escuro.

O meio de EMJH ao ser preparado, parte é enriquecido com soro de coelho 10% e outra parte com enriquecimento comercial contendo albumina, polissorbato 80 e fatores de crescimento para *Leptospira* (*Leptospira* Enrichment EMJH, DIFCO), ambos os meios desprovidos de mistura antibiótica.

No caso de pesquisa em tecidos biológicos como rim, fígado ou baço, com o auxílio de pinça e tesoura estéreis estes, são colocados em sacos com o fecho também estéril em seguida são macerados com os dedos, adicionando-se solução salina em volume capaz de cobrir o macerado homogeneizado. Quando possível, a presença de células bacterianas com morfologia compatível a *Leptospira* é observada em microscópio de campo escuro e a cultura semeada (500 µL) nos meios de EMJH e Fletcher e em seguida incubada a 28°C.

3.2.2 Identificação molecular: Reação em cadeia da polimerase (PCR)

A detecção da *Leptospira* por meio de PCR se baseia na amplificação de várias cópias de uma região específica do DNA. No LZB, a pesquisa direta de *Leptospira* spp. por meio deste teste é realizada a partir do material clínico recebido, sendo este em sua maioria amostras de urina.

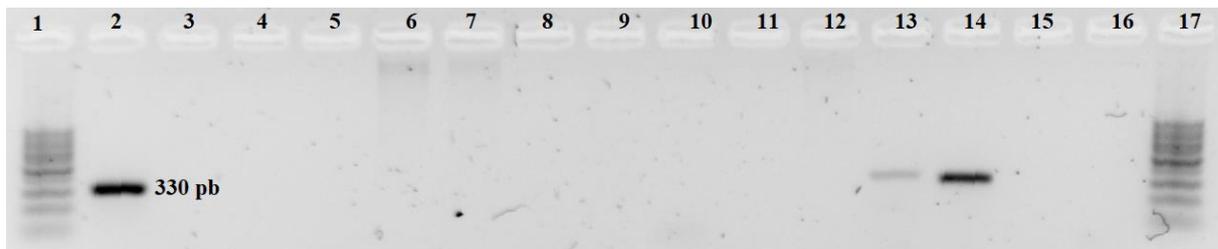
Para a extração do DNA utiliza-se o PureLink™ Genomic DNA Minikit da Invitrogen™, o qual se inicia com a lise celular seguido de purificação das amostras e eluição do DNA. A amplificação do DNA para *Leptospira* spp. é realizada empregando-se a GoTaq™ Green Master Mix (Promega, Brasil), e os iniciadores descritos por Mérien et al. (1992) [Lep1 (5'-GGCGGCGCGTCTTAAACATG-3') e Lep2 (5'-TTCCCCCATGAGCAAGATT-3')] que amplificam uma região de 330 pb do gene 16S rRNA (rrs), identificando o gênero *Leptospira*. As amostras são submetidas a uma desnaturação inicial de cinco minutos a 94°C, 40 ciclos de desnaturação a 94°C por 30 segundos, anelamento 60°C por 30 segundos e extensão a 72°C por 30 segundos, seguida por uma extensão final 72°C por cinco minutos.

Utiliza-se também os primers previamente descritos por Ahmed et al. (2006) LipL32 F 5'ATCTCCGTTGCACTCTTTG3' e R 'ACCATCATCATCATCGTCCA3', que apresenta um produto amplificado de 474 pb. A LipL32 é a principal proteína de membrana externa encontrada na superfície de *Leptospira* patogênicas e tem sido altamente conservada entre essas espécies (Stoddard et al. 2009). O protocolo de amplificação se dá por um ciclo de desnaturação a 95°C por 5 minutos, 35 ciclos de desnaturação a 95°C por 1 minuto, anelamento a 55°C por 30 segundos, extensão a 72°C por 1 min e extensão final a 72°C por 7 minutos.

Os produtos amplificados em ambas as reações de PCR são analisados por eletroforese em gel de agarose 1,5% (p/v), com tampão de corrida TBE 0,5 X (0,045 M de Tris-

borato, 1 mM de EDTA, pH 8,0). O gel é corado com SYBR Safe DNA gel stain (Invitrogen®) e fotografado sob luz ultravioleta com o auxílio de um transiluminador.

Figura 9: Gel de agarose 1,5% (p/v), corado com SYBR Safe DNA gel stain (Invitrogen®) evidenciando marcador de peso molecular 100pb (1 e 17), DNA de *Leptospira* usado como controle positivo (2), TE (pH8,0) usado como controle negativo (3) e amostras testadas (4-16) para o gene *Lep* (330 pb).



Fonte: Do autor (2019)

3.2.3 Identificação sorológica

O teste sorológico para identificação de anticorpos anti-*Leptospira* é um procedimento laboratorial que pode confirmar o diagnóstico clínico, e que é largamente utilizado para determinar a prevalência do rebanho e realizar estudos epidemiológicos. Os anticorpos contra leptospirose são produzidos com alguns dias de infecção e podem persistem por semanas ou meses e, em alguns casos por anos.

O Microscopic Agglutination Test (MAT), traduzido como Soroaglutinação Microscópica (SAM) utiliza antígenos vivos, que interagem com os anticorpos presente no soro do animal formando o complexo antígeno-anticorpo. Selecionar antígenos representativos de todos os sorogrupos conhecidos na região em que os animais são encontrados é de extrema importância para o diagnóstico.

Para realização desse teste, o LZB segue as normas padrão da Organização Mundial de Saúde Animal (World Organization for Animal Health- OIE, 2014). Os sorovares selecionadas são cultivados em meio EMJH a $29 \pm 1^\circ \text{C}$ e são utilizadas como antígeno, cultura de pelo menos 4 a 8 dias. A densidade aproximada é de 2×10^8 bactérias / mL. Os antígenos utilizados na rotina do laboratório estão descritos no quadro a seguir (Tabela 1), estes podem variar de acordo com a espécie animal da amostrada testada.

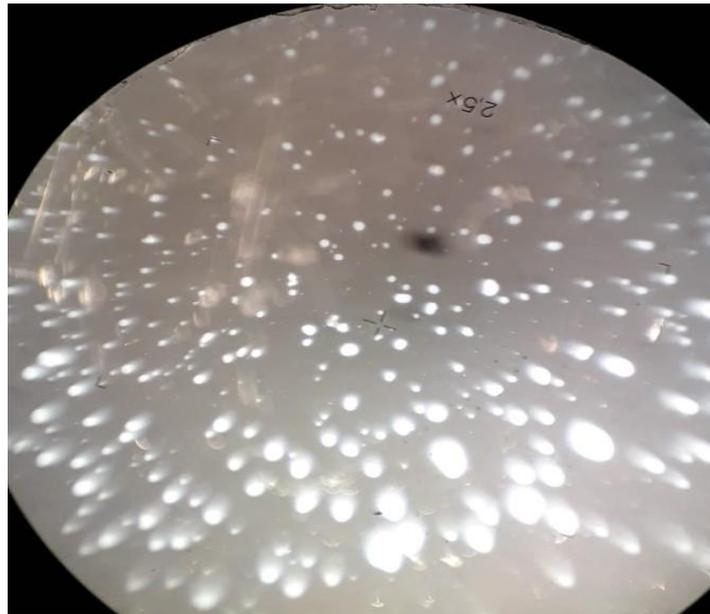
Tabela 1. Antígenos do gênero *Leptospira* empregados no teste de Soroaglutinação Microscópica (SAM), listados por sorogrupo com seus respectivos sorovares.

Sorogrupo	Sorovar
Australis	Australis
	Bratislava
Autumnalis	Autumnalis
	Butembo
Sejroe	Guaricura
Ballum	Castellonis
Bataviae	Bataviae
Canicola	Canicola
Celledoni	Whitcombi
Cynopteri	Cynopteri
Grippotyphosa	Grippotyphosa
Hebdomadis	Hebdomadis
Icterohaemorrhagiae	Copenhageni
Icterohaemorrhagiae	Icterohaemorrhagiae
Javanica	Javanica
Panama	Panama
Pomona	Ppomona
Pyrogenes	Pyrogenes
Sejroe	Hardjobovis
	Hardjoprajitno
Shermani	Shermani
Tarassovi	Tarassovi
Pomona	Pomona
Djasiman	Sentot

As amostras de soro sanguíneo são diluídas na proporção 1:50 em solução salina de Sørensen (pH 7,4) e 50 µL desta diluição são depositados em microplacas 96 poços. Em seguida 50 µL do antígeno é adicionado em cada poço, atingindo-se a diluição 1:100. As microplacas são incubadas a 28° C por no mínimo duas horas para posterior leitura e interpretação. Como controle para validação do teste, cada antígeno é analisado microscopicamente quanto a sua viabilidade, pureza e auto aglutinação.

A leitura é realizada em microscópio de campo escuro para observação de aglutinações, sendo consideradas reagentes, apenas aquelas amostras que apresentarem no mínimo 50 % de aglutinação por campo (Figura 10). Essa primeira fase é denominada como triagem, as amostras reagentes na triagem são novamente testadas para definir o título final de aglutinação.

Figura 10: Observação sob microscopia de campo escuro de formação de complexo antígeno anticorpo em mais de 50% do campo.



Fonte: Do autor (2019)

Para determinação do título de anticorpos, os soros sanguíneos são diluídos de forma seriada na razão dois em solução salina de Sørensen (pH 7,4) até a diluição 1:3.200 e acrescentado 50 μ L do antígeno que for reagente na triagem. A incubação das microplacas e leitura do teste é realizado da mesma forma como descrito para a triagem, considerando como título final a maior diluição da amostra em que se observará 50% ou mais de aglutinação. Em casos que se necessite de resultado rápido pode-se fazer a titulação direta.

A titulação direta consiste em fazer a diluição seriada na razão dois a partir do poço de triagem (50 μ L de antígeno + 50 μ L de soro diluído). Nesse caso ao se observar soro positivo na leitura da triagem segue para a leitura da titulação. A titulação direta é uma ferramenta mais utilizada para amostras isoladas, geralmente usada em infecções pontuais em cães. Quando se requer um diagnóstico de rebando, ou seja, são muitas amostras opta-se por fazer a primeiramente a triagem e em seguida a titulação apenas dos soros positivos.

3.3 Rotina de Tuberculose Bovina

A tuberculose é uma zoonose de grande importância na saúde pública causada por bactérias do gênero *Mycobacterium*. Dentre elas destaca-se o *Mycobacterium bovis* que

acomete principalmente bovinos e búfalos, podendo também acometer o homem, e o *Mycobacterium tuberculosis* acometendo principalmente humanos, podendo também causar doença em animais silvestres. Ambos patógenos são pertencentes do complexo *Mycobacterium tuberculosis* (MTBC). (EMBRAPA, 2014)

O *Mycobacterium bovis* tem formato de cocobacilo e mede 0,3 a 0,6 μ m de largura e 1 a 4 μ m de comprimento. A doença em bovinos é de distribuição mundial e apresenta caráter crônico podendo acometer diversos órgãos, principalmente pulmões e linfonodos. Gera diversos prejuízos ao produtor como, queda na produção de leite, perda na produção de carne e perdas referentes a condenação de carcaças que apresentem lesões. (CORNER, 1994)

Para o diagnóstico da tuberculose o padrão ouro é o isolamento da micobactéria em meio de cultura seguida de identificação. Porém, uma das dificuldades enfrentadas nesse tipo de diagnóstico é o crescimento lento das micobactérias, principalmente das patogênicas que podem levar 90 dias ou mais. Dessa forma, a qualidade do meio de cultura e a descontaminação da amostra devem ser aliados para o sucesso do isolamento. (CORNER; GORMLEY; PFEIFFER,2012)

A descontaminação da amostra (tecido ou material coletado em suabe) no LZB é feita pelo método de Cloreto de hexadecilpiridínio (HPC), o qual utiliza esse detergente na concentração de 1,5% para a descontaminação, ou pelo método de Petroff que faz a descontaminação através da reação com hidróxido de sódio (NaCl) 4 %. Nos casos em que as amostras são coletadas em suabes deve-se imergir o mesmo em solução salina 0,85% em um tubo fechado, e prosseguir com agitação em vórtex para se retirar o máximo de conteúdo possível do suabe.

Após a descontaminação o material deve ser semeado em meios a base de ovo e amido, sendo os mais utilizados o Lowenstein Jensen e o Stonebrink. A incubação deve ser feita a 37° C por um período mínimo de oito semanas, e os tubos devem estar hermeticamente fechados para evitar o ressecamento do meio. As colônias de *M.bovis* em geral são arredondadas, com borda irregular, pequenas e de coloração amarelo-pálida. (CORNER, 1994; CORNER; GORMLEY; PFEIFFER,2012)

No LZB após o crescimento de cultura segue-se para a confirmação que é feita através da visualização em microscópio utilizando a coloração de Ziehl- Neelsen e/ou a identificação molecular através da técnica de PCR multiplex, permitindo identificar não somente o gênero, mas também a espécie isolada.

A coloração de Ziehl- Neelsen é uma coloração especial utilizada para corar as bactérias que resistem fortemente a descoloração, mesmo por ácidos fortes diluídos em álcool. Bactérias

do gênero *Micobacterium* possuem essa propriedade e por isso são denominadas como BAAR (bacilos álcool-ácido resistentes). Os responsáveis por conferir essa característica, são os lipídios estruturais, como o ácido micólico, presentes abundantemente na parede celular destas bactérias que dificultam a ação dos mordentes e corantes aquosos. (COELHO, A. C. et al, 2008)

A técnica de coloração é realizada da seguinte forma:

- Confeccionar o esfregaço
- Cobrir o esfregaço, previamente fixada pelo calor, com fucsina fenicada. (Aquecer até a emissão de vapores, sem deixar o corante secar, por 5 minutos);
- Lavar em água suavemente;
- Em seguida descorar completamente com álcool-ácido;
- Lavar em água corrente novamente;
- Cobrir o esfregaço com azul de metileno por 30 segundos;
- Lavar em água corrente novamente;
- Deixar a lâmina secar
- Examinar a lâmina ao microscópio com objetiva de imersão (100X).

Fonte: Coloração de Gram e Ziehl-Neelsen- USP 2008

Durante o processo de aquecimento a membrana lipídica se torna permeável e dessa maneira a fucsina fenicada consegue corar as células bacterianas, que adquirem coloração avermelhada. Ao se aplicar a o ácido diluído em álcool todas as bactérias se descoram exceto as BAAR. O contracorante azul de metileno facilita a observação e distinção das BAAR uma vez que cora as demais bactérias não resistentes ao álcool ácido.

3.4 Rotina de Brucelose

O primeiro relato do gênero *Brucella* foi em 1887 pelo oficial e médico Dr. David Bruce, que isolou a bactéria em amostras de baço colhidas na necropsia de militares que morreram vítimas dessa enfermidade nas costas do Mediterrâneo, chamada de Febre de Malta (Corbel et. al, 2006).

Atualmente denominada brucelose, a doença é distribuída mundialmente, e tem como principal patógeno, no Brasil, a espécie *Brucella abortus*, bactéria Gram-negativa capaz de causar problemas reprodutivos nos bovinos. O microrganismo possui formato de cocabastonetes ou bastonetes curtos com 0,5-0,7 µm de diâmetro e 0,6-1,5µm de comprimento, não possuem esporos, são imóveis, não flagelados e aeróbios (GOMES, 2019).

Presente no grupo de doenças zoonóticas, a brucelose no homem tem maior prevalência como caráter ocupacional, sendo os médicos veterinários e funcionários de fazendas os

principais acometidos. Juntamente com a tuberculose bovina, a brucelose faz parte do Programa Nacional de Controle e Erradicação da Brucelose e Tuberculose Bovina (PNCEBT).

O PNCEBT instituído pelo MAPA em 2001, através da Instrução Normativa N°2,10 de janeiro de 2001, tem como uma de suas propostas técnicas o diagnóstico e apoio laboratorial. Este, visa a padronização dos procedimentos de diagnóstico utilizados, garantindo o sucesso do programa reduzindo assim, a prevalência e a incidência de novos focos de brucelose no país.

O LZB realiza os testes do Antígeno Acidificado Tamponado (AAT) e do 2-Mercaptoetanol (2-ME), para fins de pesquisa seguindo a normatização do PNCEBT, sendo estes descritos a seguir.

3.4.1 Teste do Antígeno Acidificado Tamponado (AAT)

O AAT é uma prova sorológica qualitativa que visa detectar anticorpos anti-*Brucella* no soro sanguíneo. De acordo com o PNCEBT, este teste, assim como o teste do Anel do leite (TAL), deve ser usado como triagem, os casos positivos seguem para os testes confirmatórios.

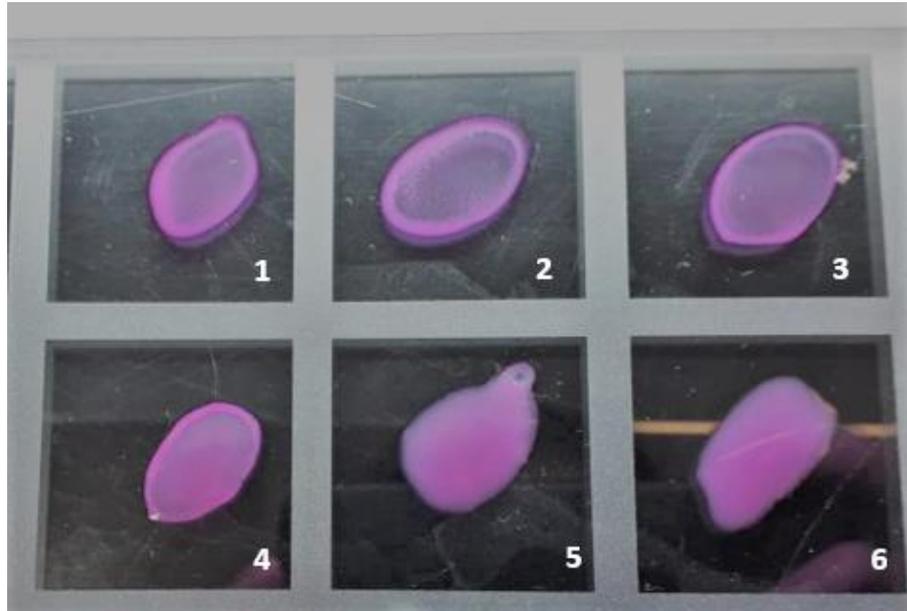
A realização do teste deve ser feita, de acordo como PNCEBT, da seguinte maneira:

1. Equilibrar os soros e o antígeno à temperatura ambiente por pelo menos 30 minutos;
2. Dispensar 30 µL de soro por área da placa. Depositar na placa de vidro em ângulo de 45°;
3. Agitar levemente o soro e colocar 30 µL ao lado do soro, sem deixar misturar antígeno;
4. Misturar com o auxílio de um misturador o soro e o antígeno com movimentos circulares. O círculo deve obter ± 2 cm;
5. Agitar a placa com movimentos oscilatórios continuamente por 4 minutos;
6. Colocar a placa em caixa preta com luz indireta para realizar a leitura;

Fonte: Manual Técnico PNCEBT MAPA 2006

A interpretação do teste deve ser feita imediatamente após o seu término. A presença de aglutinação (formação do complexo antígeno-anticorpo) evidencia as amostras reagentes. Dessa forma os negativos são aqueles que não apresentam aglutinação (Figura 11).

Figura 11: Teste do AAT evidenciando os soros 1, 2, 3 e 4 como positivos e os soros 5 e 6 como negativos. Na amostra de soro 2 a aglutinação é mais evidente.



Fonte: Do autor (2019)

3.4.2 Teste do 2- Mercaptoetanol (2-ME)

O 2-ME é uma prova quantitativa seletiva que detecta com maior facilidade anticorpos do tipo IgG, imunoglobulina indicativa de infecções crônicas. Esta deve ser executada sempre em paralelo com a prova lenta em tubos, denominada soroaglutinação lenta (SAL). (PNCEBT, 2006)

Este teste é considerado como um teste confirmatório, por isso nos casos de resultados positivos em ambas as provas, AAT e 2- ME, os animais devem ser considerados infectados, e de acordo com o PNCEBT abatidos.

O teste deve ser feito, de acordo com o PNCEBT, da seguinte maneira:

1. Diluir o antígeno para soroaglutinação lenta em tubos, 100 vezes (1:100) em solução salina 0,85% contendo 0,5% de fenol
2. Diluir o antígeno para soroalglutinção lenta em tubos, 50 vezes (1:50) em solução salina a 0,85% sem adição de fenol.
3. Preparar a solução de 2-ME a 0,1 M misturando-se 7,8 mL de 2 ME a 992,20 mL de solução salina 0,85% sem fenol, ou em volumes menores proporcionalmente.

4. Organizar os tubos de forma que haja tubo suficiente para as 4 diluições do 2 ME e 4 diluições da SAL
5. Pipetar no fundo do primeiro tubo da primeira fileira 0,08 mL de soro. No segundo tubo, deposita-se 0,04 mL, no terceiro, 0,02 mL e no quarto, 0,01 mL.
6. Dispensar 2 mL da solução de antígeno diluído 1:100 na fileira de soroaglutinação lenta.
7. Colocar na fileira de 2-ME, 1 mL da solução do 2-ME em cada tubo. Deixar 30 minutos descansando a temperatura ambiente.
8. Após 30 minutos acrescentar 1 mL do antígeno diluído 1:50 homogeneizar e colocar na estufa a 37° C por 48h.
9. Fazer leitura em caixa preta. As interpretações baseiam-se no grau de aglutinação do antígeno e na consistência dos grumos após agitação suave.

- Reação completa – é aquela em que o líquido da mistura soro-antígeno aparece translúcido e a agitação suave não rompe os grumos; (Figura 12)

- Reação incompleta – é aquela em que a mistura soroantígeno aparece parcialmente translúcida, e uma suave agitação não rompe os grumos;

- Reação negativa – é aquela em que a mistura soroantígeno aparece opaca ou turva, e uma agitação suave não revela grumos.

Fonte: Manual Técnico PNCEBT MAPA 2006

Figura 12: Leitura de diluição em 2-ME evidenciando soro positivo com titulação 100



Fonte: Do autor (2019)

4. PROJETO PILOTO

Durante o período de estágio foi atribuído à estagiária a realização de um projeto piloto de interesse do professor supervisor intitulado: “ESTUDO DA PREVALÊNCIA DE *Staphylococcus spp.* EM EQUINOS E PERFIL DE RESISTÊNCIA ANTIMICROBIANA”, o qual está descrito abaixo.

4.1 Referencial Teórico

De acordo com a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA 2008), as bactérias do gênero *Staphylococcus* receberam este nome devido ao seu formato esférico e seu agrupamento em cachos semelhantes a cachos de uva. Essas bactérias são classificadas como Gram-positivas, anaeróbias facultativas e apresentam faixa de temperatura ótima para seu crescimento entre 30 e 37° C.

Dentre as espécies do gênero, o *Staphylococcus aureus* se encontra em destaque devido à sua patogenicidade, prevalência e resistência. Pertencente ao microbioma natural da pele, conjuntivas e mucosas dos animais, o *S. aureus* pode ocasionar infecções oportunistas em seus hospedeiros devido à diversidade de seus fatores de virulência (Van den Eede et al., 2013; Weese, 2010).

Estudos feitos em equinos hospitalizados demonstram que estes se tornam mais propensos a desenvolver a infecção estafilocócica devido ao seu íntimo contato com o médico veterinário, sendo este um fator de risco de grande relevância. Olivo (2016), em seu estudo, objetivou avaliar a frequência de *Staphylococcus spp.* presentes em equinos hospitalizados e profissionais da área (médicos veterinários e funcionários), bem como avaliar possível transmissão interespecie. Como resultado obteve o isolamento do gênero em 17,5% das amostras de orifício nasal dos equinos testados, sendo 3,8 % de *S. aureus*. Em seres humanos isolou o gênero em 40% das amostras sendo estas 100% *S. aureus*, comprovando, a importância desse micro-organismo para a saúde pública.

A penicilina foi a princípio o fármaco de eleição no tratamento das estafilococoses, porém, a partir da década de 1940 se identificou resistência de algumas estirpes ao antibiótico. A aquisição de genes produtores de penicilinases, e transposição entre os estafilococos fez com que em 1960 fosse registrado altos índices de resistência a este fármaco. Em 1959, foi lançada a meticilina como terapia alternativa as cepas produtoras de penicilinases, porém logo após seu lançamento, em 1961 foram descritas estirpes resistentes no Reino Unido, denominadas

Staphylococcus aureus resistentes à meticilina (MRSA). Pouco tempo depois foram identificadas em outros países europeus, no Japão, Austrália, e os Estados Unidos. (Kepler A. et al, 2004; Mark C. et. al,2002; Tavares, 2000).

Os MRSA têm pouca especificidade e são capazes de causar a doença em diversos hospedeiros. Nos equinos, este patógeno pode causar a doença clínica, ou estes podem ser carreadores e disseminadores do agente para outros animais e seres humanos, por meio da infecção nosocomial (WEESE et al., 2005b). Surtos da doença em hospitais veterinários podem decorrer de diversos fatores, destacando-se a imunossupressão em pacientes pós-operados.

O Hospital Veterinário (HOVET) da USP foi criado em 1981, e é considerado o maior da América Latina em relação ao número de casos atendidos. Atualmente conta com uma área destinada ao atendimento específico de grandes animais, entre os quais o número de equinos se expressa de maneira relevante.

Diante disso, o estudo da prevalência de *Staphylococcus* spp. e o perfil de resistência antimicrobiana, bem como a presença de MRSA nos equinos hospitalizados atendidos no HOVET, é pertinente e de interesse, uma vez que os dados gerados podem influenciar nas medidas de controle e prevenção de surtos de MRSA, nos pacientes, médicos veterinários e funcionários do hospital.

4.2 Objetivos

Geral: Identificar e estudar a prevalência de *Staphylococcus* spp. em equinos internados no Hospital Veterinário (HOVET), USP.

Específicos:

- Traçar o perfil de resistência aos antimicrobianos dos isolados;
- Detectar a presença dos genes *mecA* e *mecC*, responsáveis pela resistência a meticilinas;
- Comparar o resultado da identificação por ágar cromogênico com a identificação molecular.

4.3 Material e métodos

4.3.1 Coleta das amostras

Para a execução do presente estudo, foram coletadas amostras de vestíbulo nasal de 22 equinos (machos e fêmeas independentes da raça ou idade) internados no Hospital Veterinário

da USP no dia primeiro de abril de dois mil e dezenove. Para isso utilizou-se suabe estéril, friccionando na mucosa nasal com movimentos de rotação, na região de vestibulo nasal segundo Van den Eede et al. (2013).

4.3.2 Cultivo e isolamento

Após a colheita, as amostras foram semeadas em meio de ágar cromógeno AcccStaph® e mantidos em condições de aerobiose a 37°C, por 20 horas. Após o crescimento inicial seguiu-se para o isolamento de colônias puras, utilizando-se a técnica de estriação composta, no mesmo ágar. As colônias puras foram selecionadas e semeadas em meio líquido Brain Heart Infusion (BHI), para manutenção, e novamente em ágar cromogênico com o objetivo de obtenção de massa bacteriana para testes posteriores.

4.3.3 Identificação por Ágar cromogênico ACCUSTAPH®

Os meios de cultura cromogênicos em geral, são meios que possuem em sua formulação material corante. As bactérias, por meio de enzimas quebram esse “substrato” originando compostos coloridos que permitem diferenciar as colônias pela coloração que apresentam quando cultivadas nesses meios.

O meio cromogênio utilizado permite a identificação de *S. aureus* por meio do crescimento de colônias com a coloração rosa, as colônias azuis são identificadas como *Staphylococcus haemolyticus* e as brancas como estafilococos coagulase negativo (SCN), apresentando 99% de sensibilidade de acordo com o fabricante. Utilizou-se então da coloração apresentada como identificação primária.

4.3.4 Teste de sensibilidade a antimicrobianos

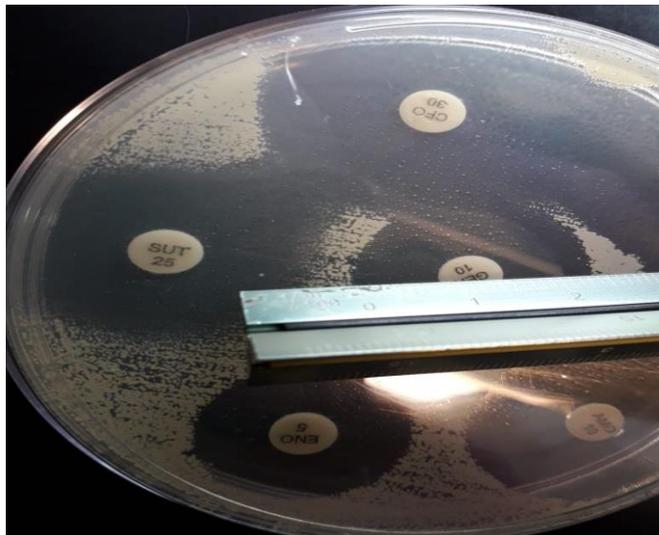
O perfil de sensibilidade a antimicrobianos foi traçado a partir do método de difusão em disco descrito pelo NCCLS 2005, o qual se baseia no tamanho do halo de inibição formado, correlacionado às concentrações inibitórias mínimas (CIMs) das amostras reconhecidamente sensíveis e resistentes a diversos agentes antimicrobianos. Utilizou-se a cepa *S. aureus* ATCC 25923 como controle de qualidade em todos os ensaios.

O inóculo foi preparado equivalendo a uma solução padrão 0,5 de McFarland. Utilizou-se o ágar Miller Hinton distribuído em placa de petri com 4 mm de espessura, e as bases utilizadas foram: cefoxitina, oxacilina, sulfa + trimetropim, gentamicina, enrofloxacina, ceftiofur e amoxicilina, as quais foram selecionadas devido a sua frequência de utilização na medicina

equina. As placas foram incubadas em estufa 35°C, sendo a leitura realizada após 18h de cultivo, exceto para oxacilina, a qual foi lida com 24h horas de cultivo como recomendado pelas normas.

A interpretação dos resultados foi realizada de acordo com o diâmetro do halo de inibição (Figura 13), correlacionando essa medida com as medidas já padronizadas pelo CLSI/NCCLS 2005, para cada antimicrobiano, determinando o perfil de sensibilidade de cada microrganismo. Para o antimicrobiano amoxicilina utilizou-se as medidas correspondentes a ampicilina, antimicrobiano da mesma classe. No caso do ceftiofur, foi utilizado a medida correspondente a ceftriaxona, cefalosporina semelhante de terceira geração. Fez-se uso dessas correspondências uma vez que não há medidas padronizadas para os antimicrobianos selecionados quando testados em amostras de *Staphylococcus* spp.

Figura 13: Leitura do halo de inibição através da medida do seu diâmetro



Fonte: Do autor (2019)

4.3.5 Identificação molecular por PCR

A técnica de PCR foi utilizada para confirmação dos dados obtidos pela identificação primária no cultivo de *Staphylococcus* spp. A extração do DNA para realização do teste foi feita a partir do método de termólise, amostras da cultura pura foram acrescidas de 200 µL de TE (pH8,0), e mantidas por 30 minutos a 95°C. Em seguida realizou-se a centrifugação por 10 minutos a 10.000 rpm coletando-se o sobrenadante.

Foi realizado PCR duplex com alvo nos genes *16S* rRNA e *nuc*, para a identificação do gênero *Staphylococcus* e da espécie *S.aureus*, respectivamente. A sequência de primers utilizados, bem como o tamanho esperado do fragmento amplificado estão descritos na tabela 2.

Tabela 2. Iniciadores utilizados na PCR duplex para identificação do gênero *Staphylococcus* e da espécie *S.aureus*

<i>Gene</i>	<i>Sequência de primers (5'-3')</i>	<i>Tamanho do produto de PCR (bp)</i>	<i>Referência</i>
mecA	ACTGCTATCCACCCTCAAAC	163	Mehrothra et. al. (2000)
mecC	CTGGTGAAGTTGTAATCTGG ATTAAAATCAGAGCGAGGC TGGCTGAACCCATTT TTGAT	188	Paterson et.al (2012),

Para a reação utilizou-se a GoTaq Green Master Mix, 2X (Promega, Brasil). A amplificação do DNA se deu pelo seguinte protocolo: desnaturação inicial à temperatura de 95°C por 2 minutos, seguida de 35 ciclos de desnaturação a 95°C por 30 segundos, anelamento a 56°C por 35 segundos e extensão a 72°C por 1 minuto, seguidos de extensão final de 72°C por 2 minutos.

4.3.6 Identificação molecular dos genes *mecA* e *mecC*

Realizou-se então a técnica de PCR para amplificação dos genes *mecA* e *mecC* separadamente. A sequência de primers utilizados, bem como o tamanho esperado do fragmento amplificado estão descritos na tabela 3.

Tabela 3. Iniciadores utilizados na PCR para identificação do genes *mecA* e *mecC*, responsáveis por conferir resistência a metilina.

<i>Gene</i>	<i>Sequência de primers (5'-3')</i>	<i>Tamanho do produto de PCR (bp)</i>	<i>Referência</i>
mecA	ACTGCTATCCACCCTCAAAC	163	Mehrothra et. al. (2000)
mecC	CTGGTGAAGTTGTAATCTGG ATTAAAATCAGAGCGAGGC TGGCTGAACCCATTT TTGAT	188	Paterson et.al (2012),

O protocolo de amplificação do DNA para o gene *mecA*, iniciou-se com a desnaturação a 94°C por 5 minutos, seguida de 35 ciclos de desnaturação a 94°C por 2 minutos, anelamento a 57°C por 2 minutos, extensão a 72°C por 1 minuto e extensão final de 72°C por 7 minutos.

Para o gene *mecC* o protocolo de amplificação utilizado foi: desnaturação a 94°C por 5 minutos, seguida de 34 ciclos de desnaturação a 94°C por 30 segundos, anelamento a 52°C por 30 segundos, extensão a 72°C por 1 minuto e extensão final de 72°C por 10 minutos.

4.3.7 Eletroforese

A eletroforese em gel é uma técnica usada para separar fragmentos de DNA de acordo com seu tamanho. O DNA testado é colocado sobre uma das extremidades do gel, este, recebe a passagem de uma corrente elétrica, permitindo assim a movimentação das moléculas de DNA que em função de seu tamanho ou carga. Elas se movimentam em velocidades diferentes permitindo a separação das moléculas, os fragmentos menores atravessam o gel mais rapidamente do que os maiores (BRAMMER, 2001).

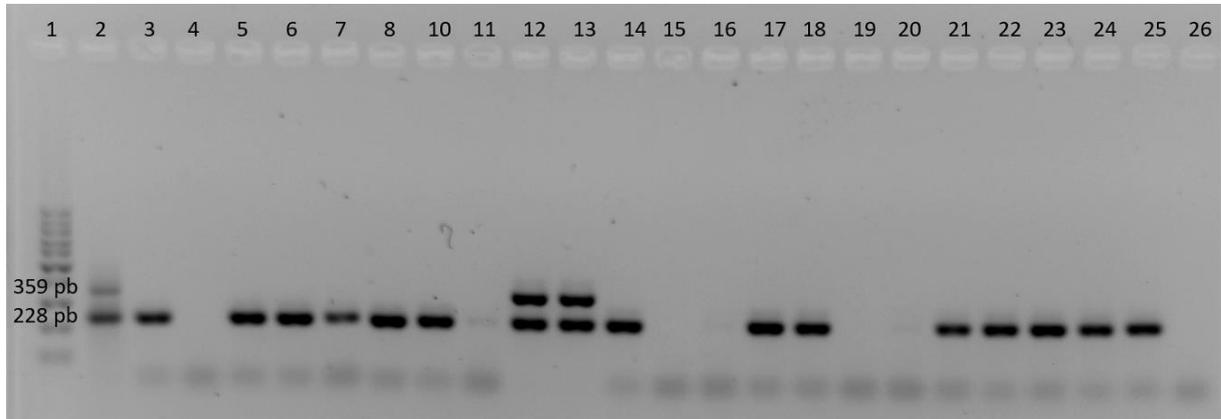
No LZB, o gel utilizado é feito de agarose 1,5% (p/v), corado com SYBR Safe DNA gel stain (Invitrogen®), dessa forma os fragmentos de DNA são vistos como **bandas**, que representam, cada uma delas, um grupo de fragmentos de DNA de mesmo tamanho. Em cada gel juntamente com as amostras testadas são colocados um marcador de peso molecular para auxiliar na leitura da banda formada de acordo com o seu tamanho, e um controle positivo e negativo.

4.4 Resultados

A partir da cultura das amostras clínicas analisadas (suabe nasal), isolou-se 47 amostras. A identificação primária foi realizada por meio de ágar cromogênico (AccuStaph®), a partir do qual obteve-se 6 (12,8%) amostras de coloração rosa, identificadas como *S. aureus*; 18 (38,2%) de coloração branca (*Staphylococcus* coagulase negativo); e 23 (49%) colônias de coloração entre azul e verde identificadas como *S. haemolyticus*.

Dos 47 isolados obtidos, submetidos a identificação pela técnica de PCR duplex para os genes *16S* e *nuc*, 39 (82,98%) foram identificados como sendo *Staphylococcus* spp., e 1 (2,13%) isolado foi identificado como *S. aureus* (Figura 14). Os outros isolados não positivos para o gênero *Staphylococcus* spp foram denominados como outros e não foram realizados os demais testes para estes.

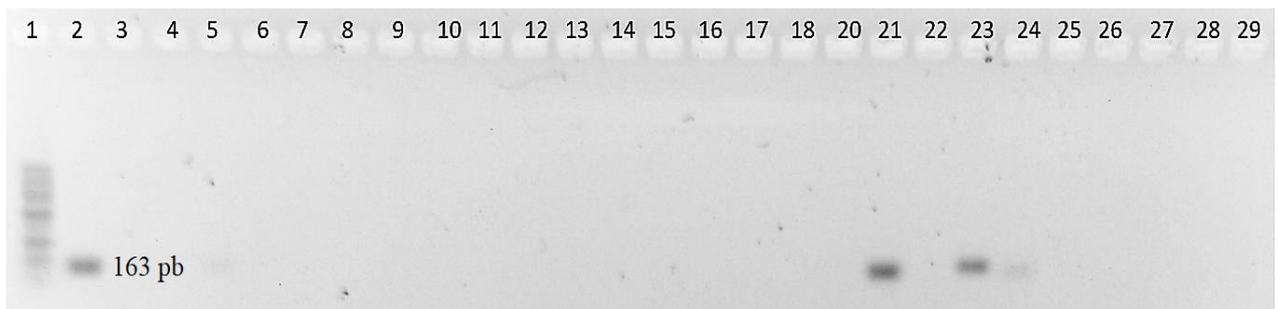
Figura 14: Gel de agarose 1,5% (p/v), corado com SYBR Safe DNA gel stain (Invitrogen®) evidenciando marcador de peso molecular 100pb (1), DNA de *S. aureus* usado como controle positivo para os genes 16S rna (228 pb) e *nuc* (359 pb) (2), DNA de *Staphylococcus spp.* usado como controle positivo para o gene 16S TE (pH8,0) usado como controle negativo (4) e amostras testadas (5-26).



Fonte: Do autor (2019)

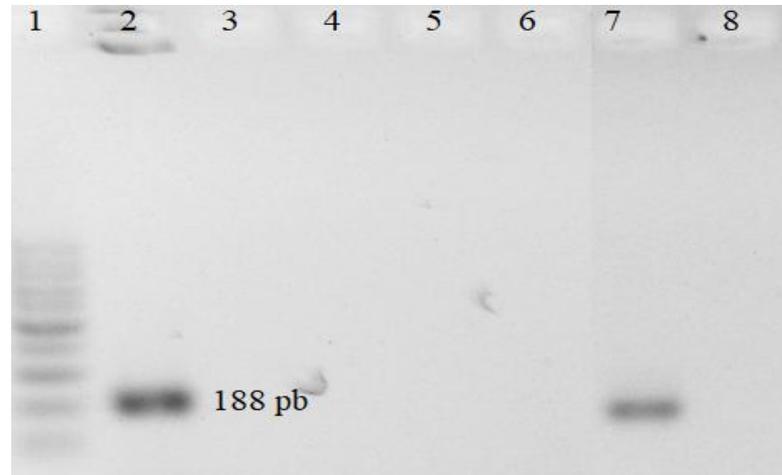
Em relação a identificação dos genes *mecA* (Figura 15) e *mecC* (Figura 16), 5 (10,64%) foram positivas para o gene *mecA* e 1 (2,13%) positivo para o gene *mecC*. Não houve isolado positivo para os dois genes simultaneamente. Os isolados positivos para *mecA*, 4 (80%) foram identificadas com *S. haemolyticus* e 1 (20%) como SCN, por meio do ágar cromogênico. Para o gene *mecC* a amostra positiva foi identificada como *S. haemolyticus*.

Figura 15: Gel de agarose 1,5% (p/v), corado com SYBR Safe DNA gel stain (Invitrogen®) evidenciando marcador de peso molecular 100pb (1), DNA de *S. aureus* positivo para o gene *mecA* usado como controle positivo (163pb) (2), TE (pH8,0) usado como controle negativo (3) e amostras testadas (4-29).



Fonte: Do autor (2019)

Figura 16: Gel de agarose 1,5% (p/v), corado com SYBR Safe DNA gel stain (Invitrogen®) evidenciando marcador de peso molecular 100pb (1), DNA de *S. aureus* positivo para o gene *mecC* usado como controle positivo (188pb) (2), TE (pH8,0) usado como controle negativo (3) e amostras testadas (4-8).



Fonte: Do autor (2019)

O teste de difusão em disco foi realizado para 35 (74,47%) isolados, e o resultados estão representados na tabela 4.

Tabela 4. Frequência de isolados resistentes e sensíveis aos antimicrobianos testados

Antimicrobiano	% de isolados resistentes	% de isolados sensíveis
Amoxicilina	37,4	62,86
Cefoxitina	15,15	84,85
Ceftiofur	0	100
Enrofloxacina	2,7	34,3
Gentamicina	8,6	91,4
Oxacilina	41,9	58,1
Sulfa+ Trimetropim	25,7	74,3

Fonte: Do autor (2019)

Dentre as amostras resistentes para oxacilina e amoxicilina estão presentes as estirpes positivas para o gene *mecA*. Das 5 amostras portadoras deste gene, 3 (60%) foram resistentes aos antimicrobianos representantes da classe beta-lactâmicos testados. Para as outras duas amostras, não foi possível identificar o perfil de resistência.

O isolado positivo para o gene *mecC* foi sensível a oxacilina porém resistente para amoxicilina e cefoxitina.

4.5 Conclusões

Há baixa prevalência de *S. aureus* entre equinos hospitalizados do HOVET-USP. Além disso, a comparação dos resultados da identificação de *Staphylococcus* spp. por ágar cromogênico e molecular mostra que o ágar cromogênico serve como método de triagem, sendo necessário teste confirmatório após o isolamento de culturas puras.

A resistência a meticilina, detectada pela presença dos genes *mecA* e *mecC* e pelo teste de difusão em disco, está presente em outras espécies de *Staphylococcus*, bem como em *S. aureus*.

O teste de difusão em disco evidenciou expressiva resistência aos antimicrobianos oxacilina e amoxicilina para as amostras isoladas dos equinos hospitalizados do HOVET-USP, sendo necessária maior reflexão nas escolhas das bases utilizadas para o tratamento desses animais.

5. CONSIDERAÇÕES FINAIS

A realização do estágio curricular obrigatório foi de extrema importância para a conclusão do curso de graduação em medicina veterinária, uma vez que permitiu a aplicação e aprimoramento dos conhecimentos adquiridos ao longo do curso, assim como também permitiu acrescentar novos saberes. A supervisão de pesquisadores especializados contribuiu muitíssimo para isso.

A escolha do Laboratório de Zoonoses Bacterianas proporcionou vivência na rotina de um laboratório de diagnóstico de doenças esclarecendo a importância de um diagnóstico bem feito para o estudo da epidemiologia, e métodos de controle e prevenção de doenças de importância veterinária e em saúde pública.

A realização do projeto piloto contribuiu não só para o aprimoramento acadêmico, mas também contribuiu para a formação pessoal. Ter responsabilidades, metas e prazos para cumprir, ter que estudar e pesquisar quais as melhores técnicas a se utilizar e como fazê-las da maneira correta, acrescentou de maneira extraordinária para a vida de uma futura profissional médica veterinária.

6. REFERENCIAS

ADLER, Ben et al. Pathogenesis of leptospirosis: the influence of genomics. **Veterinary microbiology**, v. 153, n. 1-2, p. 73-81, 2011.

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. **Gram-positivos. Módulo 4. 2008.** Disponível em: <http://www.anvisa.gov.br/servicosade/controle/rede_rm/cursos/boas_praticas/modulo4/intr_sta.htm>. Acessado em: 22 de mar. 2019.

AHMED, Niyaz et al. Multilocus sequence typing method for identification and genotypic classification of pathogenic *Leptospira* species. **Annals of clinical microbiology and antimicrobials**, v. 5, n. 1, p. 28, 2006.

ALI, Rajeh et al. Role of Polymerase Chain Reaction (PCR) in the detection of antibiotic-resistant *Staphylococcus aureus*. **Egyptian Journal of Medical Human Genetics**, v. 15, n. 3, p. 293-298, 2014.

BARBOSA GUEDES, Israel et al. Prevalence and risk factors for bovine tuberculosis in the State of Mato Grosso do Sul, Brazil. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 37, n. 5, 2016.

BAUER, A. W. et al. Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. **American journal of clinical pathology**, v. 45, n. 4_ts, p. 493-496, 1966.

BRAMMER, S. P. A técnica de eletroforese: importância e aplicações em análises genéticas. **Embrapa Trigo-Documentos (INFOTECA-E)**, 2001.

Brasil. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Programa Nacional de Controle e Erradicação da Brucelose e da Tuberculose Animal (PNCEBT) / organizadores, Vera Cecilia Ferreira de Figueiredo, José Ricardo Lôbo, Vitor Salvador Picão Gonçalves. - Brasília: MAPA/SDA/DSA, 2006. 188 p. ISBN 85-99851-01-2

Clinical and Laboratory Standards Institute/NCCLS. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Fifteenth Informational Supplement. CLSI/NCCLS document M100-15 [ISBN 1-56238-556-9]. Clinical and Laboratory Standards Institute, 940 West Valley Road, Suite 1400, Wayne, Pennsylvania 19087-1898 USA, 2005.)

COELHO, A. C. et al. Coloração de Ziehl-Neelsen como método rápido de diagnóstico de paratuberculose ovina. **Arq. Bras. Med. Vet. Zoo**, v. 60, p. 1097-1102, 2008.

CORBEL, Michael J. **Brucellosis in humans and animals**. World Health Organization, 2006.

CORNER, L. A. Post mortem diagnosis of *Mycobacterium bovis* infection in cattle. **Veterinary microbiology**, v. 40, n. 1-2, p. 53-63, 1994.

CORNER, L. A. L.; GORMLEY, E.; PFEIFFER, D. U. Primary isolation of *Mycobacterium bovis* from bovine tissues: conditions for maximising the number of positive cultures. **Veterinary microbiology**, v. 156, n. 1-2, p. 162-171, 2012.

DAVIS, Kepler A. et al. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) nares colonization at hospital admission and its effect on subsequent MRSA infection. **Clinical Infectious Diseases**, v. 39, n. 6, p. 776-782, 2004.

DEPARTAMENTO DE MEDICINA VETERINÁRIA PREVENTIVA E SAÚDE ANIMAL. **Histórico**. Disponível em: <<http://vps2.fmvz.usp.br/>> Acesso em: 17 de mar. 2019

EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA- EMBRAPA. **Artigo: Sintomas, prejuízos e medidas preventivas sobre tuberculose bovina**. Disponível em: <<https://www.embrapa.br/busca-de-noticias/-/noticia/1908535/artigo-sintomas-prejuizos-e-medidas-preventivas-sobre-tuberculose-bovina>>. Acesso em: 17 de mar. 2019

ENRIGHT, Mark C. et al. The evolutionary history of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 99, n. 11, p. 7687-7692, 2002.

FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO. **A FMVZ**. Disponível em: <<http://portal.fmvz.usp.br/a-fmvz/>>. Acesso em: 17 de mar. 2019

GUEDES, Israel Barbosa. **Pesquisa de *Leptospira* spp. em fêmeas bovinas pertencentes ao município de Novo Repartimento-Pará**. 2017. Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo.

GOMES, Marcos JP. Gênero *Brucella* spp. **FAVET-UFRGS**. Disponível em: <<http://www.ufrgs.br/labacvet/files/G%C3%AAnero%20Brucella>>. Acessado dia 9 de mai. 2019.

GOMES, Marcos JP. Gênero *Leptospira* spp. **FAVET-UFRGS**. Disponível em: <<http://www.ufrgs.br/labacvet/files/G%C3%AAnero%20Brucella>>. Acessado dia 9 de mai. 2019.

HOVET. **Hospital veterinário da FMVZ-USP.** Disponível em: <http://www.hovet.fmvz.usp.br/>. Acesso em: 25 de mar. 2019.

LANGE, Carla C. et al. Uso de PCR e sequenciamento do rDNA 16S para identificação de bactérias do gênero *Staphylococcus* isoladas de mastite bovina. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 1, p. 36-40, 2011.

LEVETT, P. N. Leptospirosis. **Clinical Microbiological Reviews**, 14. 2001. Disponível em:< <https://cmr.asm.org/content/cmr/14/2/296.full.pdf>>. Acesso: 09 de mar. 2019.

Manual de vigilância, prevenção e controle de zoonoses: normas técnicas e operacionais [recurso eletrônico] / Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde, Departamento de Vigilância das Doenças Transmissíveis. – Brasília: Ministério da Saúde, 2016. 121 p. Modo de acesso: World Wide Web:www.saude.gov.br/svs

McBride AJ, Athanazio DA, Reis MG, Ko AI 2005. Leptospirosis. **Current Opinion in Infectious Diseases** 2005. Disponível em:< <https://www.arca.fiocruz.br/bitstream/icict/7554/1/McBride%20AJA%20Leptospirosis.pdf>>. Acesso em 9 de mar. 2019

MEHROTRA, Manisha; WANG, Gehua; JOHNSON, Wendy M. Multiplex PCR for detection of genes for *Staphylococcus aureus* enterotoxins, exfoliative toxins, toxic shock syndrome toxin 1, and methicillin resistance. **Journal of clinical microbiology**, v. 38, n. 3, p. 1032-1035, 2000.

ELKENANY, Rasha et al. Multiplex PCR for detection of genes for *Staphylococcus aureus* enterotoxins, exfoliative toxins, toxic shock syndrome toxin 1 and methicillin resistance. **Asian Journal of Biological Sciences**, v. 11, n. 1, p. 1751-1773, 2010.

MERIEN, F. et al. Polymerase chain reaction for detection of *Leptospira* spp. in clinical samples. **Journal of clinical microbiology**, v. 30, n. 9, p. 2219-2224, 1992.

MONDAY, Steven R.; BOHACH, Gregory A. Use of multiplex PCR to detect classical and newly described pyrogenic toxin genes in staphylococcal isolates. **Journal of clinical microbiology**, v. 37, n. 10, p. 3411-3414, 1999.

PATERSON, Gavin K. et al. The newly described *mecA* homologue, *mecA* LGA251, is present in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates from a diverse range of host species. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 67, n. 12, p. 2809-2813, 2012

VAN DEN EEDE, A.; HERMANS, K.; VAN DEN ABEELE, A.; FLORÉ, K.; DEWULF, J.; VANDERHAEGHEN, W.; MARTENS, A. The nasal vestibulum is the optimal sampling site for MRSA screening in hospitalised horses. **The Veterinary Journal**. 197:415-419,2013.

NCCLS. Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Tests; Approved Standard— Eighth Edition. NCCLS document M2-A8 [ISBN 1-56238-485-6]. NCCLS, 940 West Valley Road, Suite 1400, Wayne, Pennsylvania 19087-1898 USA, 2003.

SASAKI, Takashi et al. Multiplex-PCR method for species identification of coagulase-positive staphylococci. **Journal of clinical microbiology**, v. 48, n. 3, p. 765-769, 2010.

STODDARD, Robyn A. et al. Detection of pathogenic *Leptospira* spp. through TaqMan polymerase chain reaction targeting the LipL32 gene. **Diagnostic microbiology and infectious disease**, v. 64, n. 3, p. 247-255, 2009.

TAVARES, W. **Bactérias gram-positivas problemas: resistência do estafilococo, do enterococo e do pneumococo aos antimicrobianos**. Rev. Soc. Bras. Med. Trop., v.33, 2000. Disponível em: < <http://www.scielo.br/pdf/rsbnt/v33n3/2477.pdf> >. Acessado em: 24 de abr. 2019

VAN DEN EEDE, Annelies et al. The nasal vestibulum is the optimal sampling site for MRSA screening in hospitalised horses. **The Veterinary Journal**, v. 197, n. 2, p. 415-419, 2013.

WEESE, J. Scott et al. Community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in horses and humans who work with horses. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 226, n. 4, p. 580-583, 2005.

WEESE, J. Scott et al. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in horses and horse personnel, 2000–2002. **Emerging infectious diseases**, v. 11, n. 3, p. 430, 2005.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE ANIMAL (OIE). Terrestrial Manual. Leptospirosis. 2014. chap. 2.1.9. Disponível em:<<http://www.oie.int/doc/ged/d6515.pdf>> Acesso em: 9. mar. 2019.

OLIVO, Giovane. Prevalência de *Staphylococcus* spp. resistentes a meticilina (mrs) em equinos no ambiente hospitalar e humanos contactantes. 2016

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO. **A Universidade de São Paulo**. Disponível em: <<https://www5.usp.br/institucional/a-usp/>>. Acesso em: 17 de mar.2019

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO. **Coloração de Gram e Ziehl-Neelsen**, São Paulo: Universidade de São Paulo, 2008. Disponível em <https://edisciplinas.usp.br/pluginfile.php/2843125/mod_resource/content/1/Colora%C3%A7%C3%B5es%20Gram%20e%20Ziehl.pdf>. Acesso em: 15 de mar. 2019

WEESE, J. Scott. Methicillin-resistant Staphylococcus aureus in animals. **ILAR journal**, v. 51, n. 3, p. 233-244, 2010.

World Health Organization Joint WHO/FAO expert committee on zoonoses. 2nd report. WHO technical report series no. 169, Geneva; 1959. 3rd report, WHO Technical Report Series no. 378, Geneva; The Organization; 1967

World Organization for Animal Health OIE 2018. **Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals/ Leptospirosis**. Disponível em:<http://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Health_standards/tahm/3.01.12_LEPTO.pdf>. Acesso em: 9. mar. 2019

XIMENES Luíz A, **AVALIAÇÃO TÉCNICA E FINANCEIRA ENTRE O CHROMAGAR E OS MEIOS USUAIS DE ANÁLISE MICROBIOLÓGICA**. Disponível em:<http://www.ciencianews.com.br/arquivos/ACET/IMAGENS/revista_virtual/microbiologia/artigoximenes.>. Acesso em: 9. mar. 2019