

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
FACULDADE DE VETERINÁRIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS**

**“PERFIL DE SUSCETIBILIDADE A ANTIMICROBIANOS DE  
ISOLADOS HISTÓRICOS DE *Staphylococcus hyicus* COMPARADO  
COM ISOLADOS CONTEMPORÂNEOS”**

**MARIANA ROQUE DE ANDRADE**

**PORTO ALEGRE**

**2013**

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
FACULDADE DE VETERINÁRIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS

**“PERFIL DE SUSCETIBILIDADE A ANTIMICROBIANOS DE ISOLADOS  
HISTÓRICOS DE *Staphylococcus hyicus* COMPARADO COM ISOLADOS  
CONTEMPORÂNEOS”**

**Autor:** Mariana Roque de Andrade

Dissertação apresentada como requisito parcial para  
obtenção do grau de Mestre em Ciências Veterinárias  
na área de Medicina Veterinária Preventiva

**Orientador:** Prof. David Emilio S. N. de Barcellos

PORTO ALEGRE

2013

**Mariana Roque de Andrade**

PERFIL DE SUSCEPTIBILIDADE A ANTIMICROBIANOS DE ISOLADOS HISTÓRICOS DE *Staphylococcus hyicus* COMPARADO COM ISOLADOS CONTEMPORÂNEOS

Aprovado em 11 de março de 2013.

APROVADO POR:

---

Prof. Dr. David Emilio Santos Neves de Barcellos  
Orientador e Presidente da Comissão

---

Dra. Jalusa Deon Kich  
Membro da Comissão

---

Prof. Dra. Marisa Ribeiro de Itapema Cardoso  
Membro da Comissão

---

Prof.Dra. Luciana Sonne  
Membro da Comissão

## AGRADECIMENTOS

Agradeço a meus pais, Cloreci e Eliazar, que apesar de todas as dificuldades estiveram presentes, e por me motivarem a buscar caminhos melhores.

Ao meu noivo, Reginaldo Coelho Rodrigues, do fundo do meu coração, por todo amor, carinho e força em todas as horas.

Aos meus irmãos e familiares que incentivaram. Aos meus amigos de Porto Alegre, Luciane, Carol, Lilliam, William, Marco, Beto, Leandro, Milton, Cris, Ricardo, por me acolherem com carinho e levantarem meu animo quando precisei.

Ao meu orientador, David Barcellos, pelo apoio e todos os ensinamentos, e principalmente pela paciência. A Professora Mari, pelo suporte na análise estatística e também pela paciência. Ao professor Ivo Wentz e Fernando Bortolozzo que colaboraram para o meu crescimento pessoal e profissional. A professora Andrea Moreno (USP), por fornecer ensinamentos sobre a metodologia do experimento.

Aos profissionais que ao longo desses dois anos me inspiraram e alimentaram a minha paixão por sanidade, Marcos H. Rostagno, Marisa R. I. Cardoso e Wondwossen A. Gebreyes.

Ao pessoal do Setor da Preventiva, em especial a Caroline Pisseti, Débora Pelegrini e Vanessa Dias pela boa recepção, dúvidas esclarecidas e ensinamentos em microbiologia.

A todos os estagiários do Setor de Suínos, que tiveram importância fundamental para a execução do experimento. Um agradecimento em especial para as estagiárias Carine Vier e Luiza Pommerehn pela boa vontade em ajudar até em finais de semana.

Aos colegas de pós-graduação, profissionais da agroindústria e empresas que colaboraram com a coleta de amostras em suabe: José P. H. Sato, Diogo Magnabosco, Pedro Sbardella, Brenda Marques, André Michelin, Flauri Migliavacca. E aos demais que passaram pelo meu caminho durante esse tempo e colaboraram muito com pequenos gestos.

A todos, muito obrigada!

## RESUMO

PERFIL DE SENSIBILIDADE A ANTIMICROBIANOS DE ISOLADOS HISTÓRICOS DE *Staphylococcus hyicus* COMPARADOS COM ISOLADOS CONTEMPORÂNEOS.

Autor: Mariana Roque de Andrade

Orientador: David Emilio Santos Neves de Barcellos

O presente estudo teve o objetivo de avaliar o perfil de sensibilidade *in vitro* de 171 isolados de *Staphylococcus hyicus* a nove antimicrobianos utilizados na suinocultura. A coleta das amostras foi realizada através de suabes de pele de leitões das fases de maternidade e creche provenientes de casos de epidermite exsudativa. As amostras foram submetidas ao isolamento e identificação e compreenderam dois grupos, classificadas de acordo com o período em que foram coletadas. O primeiro grupo foi formado por amostras históricas (80 isolados) provenientes de estudos anteriores entre 1975 a 1984 no Rio Grande do Sul, e mantidos liofilizados no laboratório de sanidade do Setor de Suínos (FAVET-UFRGS), e o segundo grupo (91 isolados) coletados no ano de 2012 nos estados do Rio Grande do Sul, Santa Catarina, Paraná e Minas Gerais. A realização do teste de susceptibilidade foi feita utilizando a técnica de diluição em ágar conforme protocolo M31-A3 do CLSI. Através de valores de Concentração Inibitória Mínima (CIM), foi obtido o perfil quantitativo de resistência em relação a nove antimicrobianos utilizados na suinocultura. A análise estatística possibilitou a avaliação de mudanças entre os dois grupos de amostras isoladas em diferentes épocas. Os resultados obtidos nesse estudo revelaram que para todas as cepas obtidas os beta-lactâmicos (ceftiofur e amoxicilina) foram os antimicrobianos mais ativos, com CIM para 90% dos isolados históricos (CIM<sub>90</sub>) de 0.5 µg/mL e 2.0 µg/mL para isolados recentes. A lincomicina, sulfametoxazol e tilmicosina foram os antimicrobianos menos ativos, com CIM<sub>90</sub> variando de 128 a 256 µg/mL. O aumento na resistência entre o grupo de amostras históricas e recentes foi observado em seis dos nove antimicrobianos testados (amoxicilina, enrofloxacina, florfenicol, lincomicina, tilmicosina e tiamulina), em particular para a enrofloxacina e tiamulina. No caso do sulfametoxazole e tetraciclina, não foram observadas diferenças significativas na resistência, entretanto altos valores de CIM foram observados nos dois grupos avaliados (p<0,05).

**Palavras-chave:** suínos, epidermite exsudativa, *Staphylococcus hyicus*, resistência a antimicrobianos, Concentração Inibitória Mínima.

## **ABSTRACT**

### ***ANTIMICROBIAL SUSCEPTIBILITY PROFILE OF HISTORICAL *Staphylococcus hyicus* ISOLATES COMPARED TO RECENT ISOLATES.***

*Author: Mariana Roque de Andrade*

*Advisor: David Emilio Santos Neves de Barcellos*

*This study was performed to evaluate the "in vitro" susceptibility profile of 171 *Staphylococcus hyicus* isolates from cases of exudative epidermitis to nine antibiotics used in pig production. Sample consisted of skin swabs from weanling and nursery piglets from farms suspected of exudative epidermitis. Samples were processed for bacterial isolation and identification and divided in two groups, according to the time of collection. The first group comprised historical samples (80 isolates) from previous studies (1975-1984) conducted in the state of Rio Grande do Sul, and stocked lyophilized in Swine Health Lab (FAVET-UFRGS), and the other group (91 isolates) formed by isolates collected in 2012 in the states of Rio Grande do Sul, Santa Catarina, Paraná and Minas Gerais, Brazil. The test was carried out using agar dilution protocol, according to M31-A3 CLSI. Through Minimal Inhibitory Concentrations (MIC) data, analysis was performed to get a quantitative profile of resistance to antimicrobials. Statistical analysis was performed to evaluate changes in resistance between the groups studied. Results showed that beta-lactam (ceftiofur and amoxicillin) were the most active antimicrobials for all strains tested, with the lowest MIC for inhibition of 90% of isolates (MIC<sub>90</sub>) of 0.5 µg/ml for historical isolates and of 2.0 µg/ml for recent isolates. Lincomycin, sulfamethoxazole and tilmicosin were the less active antimicrobials, with MIC<sub>90</sub> varying from 128 to 256 µg/ml. Significant increase in resistance between historical and recent strains was observed for six out of nine antimicrobials tested (amoxicillin, enrofloxacin, florfenicol, lincomycin, tilmicosin and tiamulin), in particular for enrofloxacin e tiamulin. For sulfamethoxazole and tetracycline there was no significant differences in resistance between strains collected in different periods, however high MIC values were observed for these drugs.*

**Key words:** *swine, exudative epidermitis, *Staphylococcus hyicus*, antimicrobial resistance, Minimal Inhibitory Concentration.*

## LISTA DE TABELAS

Tabelas inseridas no Artigo Científico		Página
Table 1	Distribution of isolates in % according to MIC's (Minimal Inhibitory Concentration) of nine antimicrobials tested for 80 historical (H) and 91 recent (R) <i>Staphylococcus hyicus</i> isolates	44

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO.....</b>	<b>8</b>
<b>2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA .....</b>	<b>10</b>
<b>2.1 A infecção causada por <i>Staphylococcus hyicus</i> em suínos .....</b>	<b>10</b>
2.1.1 Histórico e importância .....	10
2.1.2 Etiologia .....	11
2.1.3 Epidemiologia .....	12
2.1.4 Patogenia .....	14
2.1.5 Sinais clínicos.....	17
2.1.6 Lesões macroscópicas e microscópicas .....	18
2.1.7 Diagnóstico.....	19
2.1.8 Tratamento e prevenção .....	20
<b>2.2 <i>Staphylococcus hyicus</i> e a resistência à antimicrobianos.....</b>	<b>21</b>
2.2.1 Bases bioquímicas e moleculares da resistência .....	22
2.2.2 Relação entre toxicidade e resistência .....	23
2.2.3 Relação entre o uso de antimicrobianos e ocorrência de resistência .....	23
2.2.4 Impacto da resistência na cadeia produtiva e saúde pública .....	24
2.2.5 Análises da resistência <i>in vitro</i> do <i>S. hyicus</i> .....	25
2.2.6 Resistência aos beta-lactâmicos.....	26
2.2.7 Resistência a quinolonas .....	27
2.2.8 Resistência aos cloranfenícolos .....	28
2.2.9 Resistência as tetraciclinas .....	29
2.2.10 Resistência aos macrolídeos, lincosamidas e pleuromutilinas .....	30
2.2.11 Resistência as sulfonamidas .....	31
2.2.12 Multiresistência .....	31
<b>3. ARTIGO.....</b>	<b>33</b>
<b>4. CONSIDERAÇÕES FINAIS.....</b>	<b>45</b>
<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>46</b>



## 1. INTRODUÇÃO

A epidermite exsudativa (EE) é uma infecção bacteriana causada pelo *Staphylococcus (S.) hyicus*, com ampla ocorrência em todos os países produtores de suínos, e caracterizada por uma afecção cutânea intermitente, predominante em leitões das fases de maternidade e creche (BARCELLOS et al., 2012a).

O *S. hyicus* é comensal da pele dos suínos e necessita de fatores predisponentes que geram condições favoráveis para a ocorrência da doença (WEGENER, 1992a), relacionados principalmente a falhas de desinfecção do ambiente, algumas práticas de manejo, prejuízo da integridade da pele (WEGENER & SKOV-JENSEN, 2006; BARCELLOS et al., 2012a), patogenicidade da cepa infectante e imunidade dos animais (SATO et al., 2000; AHRENS & ANDRESEN, 2004). O aumento de sua ocorrência está associado à intensificação dos sistemas de produção nos últimos anos, com a criação de grandes unidades produtoras, acompanhada de maior estresse dos animais devido ao aumento da densidade nas instalações, adoção do desmame precoce e sistema contínuo de criação (SCHEIBER, 1995; L'ECUYER, 1966; CARVALHO et al., 2007).

Durante muitos anos EE representou um desafio para a indústria suína (JONES, 1956), podendo determinar aumento da taxa de mortalidade e redução do crescimento (WEGENER & SKOV-JENSEN, 2006). Baseados nas informações encontradas nesta revisão, estudos avaliando a ocorrência deste agente em nosso país datam da década de 70 e 80. Desde então não tem sido realizadas avaliações sobre a ocorrência do agente e suas características genotípicas e fenotípicas. Porém, sabe-se que o agente continua representando um problema sanitário economicamente significativo em algumas criações comerciais de suínos no Brasil. Existem poucas informações e trabalhos científicos publicados baseados no estudo de formas eficientes de tratamento e controle, os quais serão descritos ao longo do texto. Ocorre alta variabilidade na eficiência dos antimicrobianos utilizados para o tratamento da doença e é frequente a ocorrência de resistência, porém há escassez de informações sobre *S. hyicus* isolados no Brasil.

Estudos sobre a susceptibilidade das bactérias a antimicrobianos são importantes para o uso prudente dos mesmos no tratamento de infecções, no intuito de minimizar a pressão de seleção que origina bactérias resistentes (BARCELLOS et al., 2012b).

O presente estudo propôs a avaliação fenotípica de isolados de *S. hyicus* provenientes de casos de EE de uma coleção de cepas da década de 80 e 90 (isolados

históricos, mantidos liofilizados no laboratório de bacteriologia do Setor de Suínos da FAVET-UFRGS) e de isolados recentes (isolados contemporâneos, coletados ao longo do ano de 2012 em quatro estados brasileiros) através de testes de susceptibilidade *in vitro*. Utilizando a técnica da diluição em ágar (CLSI, 2008), foi possível caracterizá-los em relação ao seu perfil de sensibilidade a diferentes princípios antimicrobianos utilizados usualmente na suinocultura comercial do Brasil, através da obtenção de valores de Concentração Inibitória Mínima (CIM), em inglês, Minimal Inhibitory Concentration (MIC). Com os resultados obtidos foram analisadas as mudanças no perfil de resistência aos antimicrobianos, ocorridas entre as amostras coletadas nos dois períodos. Os resultados gerados no presente trabalho objetivam contribuir para uma escolha mais racional do princípio ativo a ser empregado no tratamento de casos de epidermite exsudativa em leitões. Além disso, não há pontos de corte recomendados para cepas de *S. hyicus* pelo CLSI. Através da pesquisa no banco de dados do EUCAST, foi encontrada pouca informação sobre susceptibilidade desse agente, baseado em poucos estudos e amostras. As informações obtidas neste trabalho podem proporcionar maior conhecimento sobre a ocorrência de resistência desse agente e auxiliar na determinação de pontos de corte epidemiológicos.

## 2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 A infecção causada por *Staphylococcus hyicus* em suínos

#### 2.1.1 Histórico e importância

A epidermite exsudativa, atualmente conhecida como “eczema úmido” ou “*greasy pig disease*”, ao longo dos anos recebeu diversas outras denominações, entre elas “eczema seborreico dos porcos”, “dermatite seborreica”, “impetigo contagioso dos suínos”, “edema crostoso seborreico”, “dermatite esfoliativa”, “dermatite exsudativa”, “dermatite pustular contagiosa”, “dermatite necrótica”, “dermatite infecciosa”, “seborreia oleosa”, “doença gordurosa dos leitões”, e “tizne dos leitões” (JONES, 1956; PORTUGAL et al., 1979). A doença é caracterizada por uma dermatite seborreica não pruriginosa, generalizada ou localizada, de aparecimento brusco e curso agudo, acometendo principalmente leitões de maternidade e creche, em rebanhos suínos de todo o mundo (JONES, 1956; BARCELLOS et al., 1975; UNDERDAHL & TWIEHAUS, 1975; WEGENER, 1992b).

A primeira descrição da doença foi dada por Spindola, na Alemanha em 1842 (JONES, 1956; PORTUGAL et al., 1979). Logo em seguida, vários trabalhos relataram casos semelhantes em diversos continentes (JONES, 1956; BLOOD & JUBB, 1957; L’ECUYER, 1967; PENNY & MUIRHEAD, 1986). Nos primeiros relatos havia poucas informações sobre o agente etiológico da doença, com frequente confundimento dos sinais clínicos da epidermite com as diversas outras doenças que acometem a pele dos suínos (JONES, 1956, UNDERDAHL et al., 1963). No Brasil, a primeira suspeita clínica deve-se a Meincke & Wentz (1975) no Rio Grande do Sul. Logo em seguida, a doença foi relatada em Santa Catarina (PORTUGAL et al., 1979).

Os danos causados pela doença são decorrentes principalmente da mortalidade, atraso no crescimento e gastos com mão de obra e medicamentos (WEGENER & SKOV-JENSEN, 2006; BJÖRKLUND, 2011; PARK, 2011). A extensão dos prejuízos depende do número de leitegadas afetadas, da severidade da doença, assim como da duração do surto (PEPPER & TAYLOR, 1977). Segundo Park (2011), até mesmo infecções moderadas podem influenciar negativamente, dificultando principalmente a venda dos animais no momento do desmame, quando as lesões presentes podem reduzir o preço dos leitões. Perdas em mortalidade podem atingir índices de 50% (PORTUGAL

et al., 1979). No relato de Pepper & Taylor (1977) a redução nos lucros chegou a 9% em um surto ocorrido em uma granja durante dois meses.

### 2.1.2 Etiologia

Inicialmente, o agente causador da EE foi denominado *Micrococcus hyicus* (SOMPOLINSKY, 1953), sendo posteriormente caracterizado como parte do gênero *Staphylococcus* por Baird-Parker (1965). O microrganismo é um pequeno coco anaeróbico facultativo, Gram-positivo, da família *Micrococcaceae*, com cerca de 0,8 a 1,0 micron de diâmetro. Em ágar contendo sangue de ovino, após 24 horas de incubação, apresenta colônias com cerca de 3 a 4 mm, não hemolíticas, não pigmentadas e com coloração esbranquiçada semelhante à porcelana (QUINN et al., 1994; QUINN et al., 2011; WERCKENTHIN et al., 2001). A ausência de hemólise em ágar contendo sangue ovino, bovino ou suíno é uma das principais características que diferenciam o *S. hyicus* dos demais estafilococos, entretanto o agente apresenta hemólise em ágar contendo sangue de coelho (L'ECUYER, 1967). O *S. hyicus* apresenta reação positiva para as provas de Dnase, lipase e hialuronidase, e reação negativa para as provas de maltose, manitol, acetoina, oxidase, e hidrólise de esculina. Possui reação variável no teste de coagulase (25-50% das linhagens são coagulase-positivas) e no teste de urease (11 a 89% são positivas). E apresenta ainda, atividade fermentativa em relação aos carboidratos glicose, lactose, manose e sacarose (L'ECUYER, 1967; DEVRIESE, 1977; QUINN et al., 1994).

Um das ferramentas úteis para o isolamento seletivo do *S. hyicus* é o uso do meio contendo polissorbato 80, descrito por Devriese (1977). Nele, é evidenciada a atividade da lipase do microrganismo, com apresentação de um halo esbranquiçado ao redor das colônias, facilitando a identificação fenotípica dessa bactéria através do cultivo em placas. Após 20 a 24 horas de incubação à 37°C, é possível obter colônias brancas de 1 a 1,5mm de diâmetro rodeadas de uma zona de material lipídico precipitado. No Purple Agar Base (Difco®) *Staphylococcus hyicus* não fermenta a maltose, porém ataca a peptona do meio produzindo uma reação alcalina, de coloração roxa, ao redor das colônias (QUINN et al., 1994).

### 2.1.3 Epidemiologia

*Staphylococcus hyicus* é uma bactéria comensal dos suínos, fazendo parte da microbiota normal da pele e pode, com frequência, ser isolada da pele de animais sadios. Já foi também isolada da mucosa nasal, conjuntiva, tonsilas, linfonodos, sangue e da vulva de leitoas e porcas (SOBESTIANSKY et al., 1989; SKOV-JENSEN & WEGENER, 1992; WEGENER & SKOV-JENSEN, 1999).

O agente não é específico para a espécie suína, já tendo sido isolado da pele de bovinos e aves (DEVRIESE et al., 1985; TAKEUCHI et al., 2000), caprinos (VALLE et al., 1991), e em casos de doenças cutâneas em equídeos e bovinos (DEVRIESE et al., 1983; HAZAKIRA et al., 1991), mastite subclínica em vacas (GIANNEECHINI et al., 2002), osteomielite em novilhas (DEVRIESE & DEKESEL, 1982), conjuntivite em frangos, perus e avestruzes (CHEVILLE et al., 1988), e septicemia em seres humanos (CASANOVA et al., 2011). Entretanto, estudos genotípicos e fenotípicos sugerem que os isolados de origem suína pertencem a ecovares diferentes daqueles de outras espécies animais (TAKEUCHI et al., 1987; TAKEUCHI et al., 1988; SATO et al., 1991a).

Embora o *S. hyicus* tenha sido amplamente reconhecido como o agente causador da EE, estudos experimentais comprovaram o possível envolvimento de outras espécies, como o *S. chromogenes* (ANDRESEN et al., 2005) e o *S. sciuri* (CHEN et al., 2007), capazes de produzir variantes das toxinas envolvidas na patogenia da epidermite.

A transmissão do *S. hyicus* no plantel de suínos ocorre através do contato direto entre os animais. A colonização ocorre já no início da vida dos leitões no momento da passagem pelo canal vaginal durante o parto. É possível identificar cepas de *Staphylococcus hyicus* idênticas às presentes na vulva das fêmeas e na pele das leitegadas ao longo das primeiras semanas de vida, tornando-se parte da microbiota estável da pele dos leitões (WEGENER & SKOV-JENSEN, 1992). Uma vez que o agente faz parte da microbiota normal dos animais, o conjunto de fatores relacionados ao agente, hospedeiro e ambiente são importantes na ocorrência da doença (WEGENER & SKOV-JENSEN, 2006).

Cepas de *S. hyicus* podem ser divididas em virulentas (patogênicas) e avirulentas (não patogênicas), categorizadas com base na produção de toxinas esfoliativas (WEGENER et al., 1993), envolvidas na patogenia da doença. Ambos os tipos podem estar presentes simultaneamente na pele de leitões doentes e sadios (WEGENER et al., 1993), embora tenha sido observado que haja maior frequência de *S. hyicus* toxigênicos

nos animais doentes do que nos animais saudáveis (ANDRESEN, 2005; FUTAGAWA-SAITO et al., 2007; BJÖRKLUND, 2011).

*S. hyicus* não é capaz de invadir a pele saudável. Além da bactéria produtora de toxina, é fundamental a ocorrência de uma lesão na pele para o agente poder se multiplicar e produzir toxinas (WEGENER & SKOV-JENSEN, 2006). Geralmente, são feridas decorrentes de pisos abrasivos ou paredes ásperas no ambiente de criação, além de lesões resultantes de práticas de manejo como castração, marcação, caudectomia, corte de dentes, tratamento incorreto do umbigo, ou então ferimentos provocados por brigas no momento da mamada, ou brigas ao desmame devido à formação de hierarquia como evento consequente à mistura de lotes (L'ECUYER, 1966).

A imunidade dos animais é um importante fator protetor, útil na predição da ocorrência e severidade da doença (WEGENER & SKOV-JENSEN, 2006). Surtos geralmente ocorrem dentro de uma semana pós-parto ou logo após o desmame e chegada à creche, momento em que a imunidade passiva dos leitões está reduzida e onde há mistura de diversos lotes com perfis de imunidade distintos (L'ECUYER, 1966). A doença geralmente dura por volta de 2 a 3 meses após a introdução de animais portadores em um rebanho não imune e podem persistir nos casos em que porcas não imunes sejam trazidas para instalações infectadas, ou em que animais sadios sejam expostos a animais infectados. Sucessivas leitegadas são afetadas, sendo que os mais acometidos são os leitões nascidos de porcas não imunes, principalmente as leitoas (WEGENER & SKOV-JENSEN, 1999). Caso as matrizes tenham sido vacinadas, anticorpos via colostro protegem os leitões durante as primeiras semanas de idade (ANDRESEN & AHRENS, 2004). Os surtos em rebanhos onde há reprodutores jovens geralmente tendem a ser autolimitantes na medida em que a imunidade do plantel se desenvolve (WEGENER & SKOV-JENSEN, 2006).

A pressão de infecção ambiental é outro aspecto crítico no desencadeamento do quadro (BARCELLOS et al., 1998). A dose infectante do agente pode representar um fator determinante, em que uma grande população bacteriana pode superar a imunidade do suíno em determinadas condições. *S. hyicus* é muito resistente a condições adversas, assim como as demais espécies de estafilococos, podendo persistir no ambiente por longos períodos, principalmente em condições de umidade, e calor típicas do ambiente da maternidade e creche (WEGENER & SKOV-JENSEN, 2006). Ambientes altamente contaminados, como nos casos de falhas no processo de desinfecção, superlotação, vazio sanitário curto ou uso de sistemas de produção contínua também favorecem o

aparecimento de casos clínicos (L'ECUYER, 1966). A alta densidade animal, além de aumentar o desafio sanitário, também contribui para brigas e estresse dos animais (PARK, 2011).

Outras doenças concomitantes como a circovirose, que possui caráter imunossupressor, e a parvovirose também são fatores considerados predisponentes à ocorrência de EE, já que a replicação do circovírus suíno tipo 2 (PCV2) e do parvovírus suíno (PPV) podem causar as lesões necessárias para que o *S. hyicus* tenha acesso ao interior da epiderme e desencadeie o processo infeccioso (KIM & CHAE, 2004; WEGENER & SKOV-JENSEN, 2006).

As maiores prevalências e sinais clínicos mais severos são relatados geralmente em leitões em aleitamento durante a primeira semana de vida. Leitões ao desmame também estão em um período vulnerável, visto que a imunidade passiva está decrescente e o seu sistema imune está em fase de desenvolvimento (PARK, 2011). Há grande variação nas taxas de morbidade e mortalidade, sendo que todas as leitegadas em um rebanho podem estar afetadas e a mortalidade pode atingir 70% dos animais (UNDERDAHL et al., 1963).

#### 2.1.4 Patogenia

A pele intacta possui características que previnem a invasão das camadas mais profundas por bactérias patogênicas (ISAACSON, 1992). Infecções bacterianas na pele, como por estafilococos, são na maioria das vezes localizadas em dobras cutâneas, axila, virilha e outros locais onde há acúmulo de umidade, além de aberturas naturais, como poros, folículos pilosos, ou glândulas, assim como feridas, que oferecem um ambiente mais favorável ao crescimento bacteriano do que na superfície saudável da pele. Como barreira natural do organismo, as regiões mais favoráveis à infecção bacteriana são protegidas pela lisozima, uma enzima que degrada peptídeos bacterianos e lipídeos tóxicos. Outra barreira para a colonização da pele é a microbiota residente. Patógenos potenciais invasores não somente necessitam ser hábeis para colonizar a pele como também devem competir com a microbiota comensal por nutrientes e sítios de colonização (SALYERS & WHITT, 1994).

Apesar dessas defesas, algumas bactérias patogênicas possuem mecanismos que as tornam aptas a ganhar acesso ao tecido subcutâneo, como no caso do *S. hyicus*. Uma vez que o agente consegue atravessar a barreira da epiderme através da porta de entrada,

esse microorganismo entra em contato com o tecido linfóide associado à pele (“Skin-Associated Lymphoid Tissue”, ou SALT). A função desse tecido é conter as bactérias que conseguem invadir o espaço subcutâneo, impedindo-as de ter acesso à corrente sanguínea, através da produção de diversos fatores imunes como a fagocitose, produção de anticorpos, células apresentadoras de antígeno como as células de Langerhans, células T, e a redução do pH do local da infecção (STREILEIN, 1989). Através da ativação de células T na presença das células de Langerhans e MHC de classe 2, ocorre a produção de uma variedade de citocinas, como a interleucina 1 (IL1) e o fator de necrose tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ), capazes de estimular outras células do sistema imune (TOKURA et al., 1994; ISAACSON, 1992).

Existem muitos fatores nas cepas de *S. hyicus* que podem ajudá-las a se instalar no organismo do animal, modulando o sistema imune. Embora a primeira linha de defesa contra a infecção envolva o sistema fagocitário, todas as cepas virulentas e parte das cepas avirulentas possuem fatores que as protegem da fagocitose por neutrófilos e macrófagos. A proteína A, presente na parede celular da maioria das cepas suínas de *S. hyicus* e ausente nas de galinhas e bovinos, além de induzir hipersensibilidade e inativar proteínas do complemento, inibe a fagócitos através da ligação a região Fc terminal das imunoglobulinas, principalmente IgG (TAKEUCHI et al., 1988; TAKEUCHI et al., 1990). Outro fator de defesa é a cápsula, que também atua inibindo a opsonização e fagocitose (YOSHIDA et al., 1988; WEGENER & SKOV-JENSEN, 1999). Todas as cepas suínas de *S. hyicus* coagulam o plasma, sugerindo um potencial para a formação de agregados que podem aumentar a proteção das bactérias contra a fagocitose. A produção de catalase também pode proteger a bactéria de ser morta pelas células fagocíticas (WEGENER & SKOV-JENSEN, 1999). Assim como a maioria dos estafilococos, o *S. hyicus* possui a capacidade de ligação à fibronectina presente no sangue e no tecido conjuntivo frouxo, representando um mecanismo de aderência e colonização (SWITALSKI et al., 1983).

A produção de toxinas esfoliativas é reconhecida como o fator de virulência mais importante do *S. hyicus* na patogenia da EE (ALLAKER et al., 1991; WEGENER et al., 1993; TANABE et al., 1996; FOSTER, 2012). Cepas toxigênicas e não toxigênicas estão presentes em animais saudáveis e doentes (WEGENER et al., 1993; TANABE et al. 1996; ANDRESEN, 1998), mas somente as cepas toxigênicas produzem toxinas, que são responsáveis pelas lesões características da doença (TANABE et al., 1996; ANDRESEN et al., 1997). Até o momento, seis toxinas



esfoliativas produzidas pelo *S. hyicus* foram reconhecidas. Com cerca de 27kDa ou 30kDa (WEGENER et al., 1993, ANDRESEN et al., 1997), são designadas ExhA, ExhB, ExhC e ExhD (AHRENS & ANDRESEN, 2004) e ShetA e ShetB (SATO et al., 1999; SATO et al. 2000). Entre as quatro primeiras, a análise molecular revelou que o resíduo de ácido aspártico que constitui o sítio ativo das toxinas ExhA, ExhB e ExhC é substituído por ácido glutâmico em ExhD. Os autores afirmaram ser improvável que essa substituição possa mudar as propriedades bioquímicas da toxina e, histologicamente, as lesões produzidas por ExhD são idênticas às produzidas pelas outras toxinas (AHRENS & ANDRESEN, 2004). Sabe-se que a ShetA tem sua expressão geneticamente controlada por DNA cromossômico, sendo uma toxina termolábil, com perda da toxicidade após aquecimento a 60°C por 15 minutos e seu peso molecular é de aproximadamente 27kDa (SATO et al., 1991b; SATO et al., 2000). A ShetB tem seu gene codificador localizado em plasmídeo, e também é uma toxina termolábil com mesmo peso molecular, porém mantém sua toxicidade por mais tempo, perdendo-a após aquecimento a 60°C por 30 minutos (SATO et al., 1999; SATO et al., 2000).

As toxinas esfoliativas agem como “tesouras moleculares” (NISHIFUJI et al., 2005; NISHIFUJI et al., 2008). Elas são serinas proteases (ou serinas endopeptidases) com o mesmo modo de ação das toxinas EtA e EtB, produzidas por cepas de *Staphylococcus aureus* causadoras da infecção humana chamada Síndrome da Pele Escaldada Estafilocócica (“Staphylococcal Scalded Skin Syndrome” ou “SSSS”) (LADHANI et al., 1999). São semelhantes na estrutura molecular, lesões histopatológicas e mecanismos de codificação genética (SATO et al., 1999; AHRENS & ANDRESEN, 2004). Através das toxinas, as cepas virulentas de *S. hyicus* são capazes de clivar uma molécula desmossomal responsável pela adesão intercelular, a desmogleina 1 (Dsg1), presente ao longo de toda a pele dos animais. Essa clivagem resulta na separação dos queratinócitos da epiderme com consequente esfoliação da pele (FUDABA et al., 2005). Em seguida, ocorre o excesso de secreção sebácea e exsudato seroso, responsável pelo aspecto gorduroso das lesões. Nesse estágio, o prejuízo na integridade da pele provoca desidratação, perda de fluidos e predisposição a septicemia (PARK, 2011). Após penetrar no organismo animal, o *Staphylococcus hyicus* multiplica-se no sangue, espalhando-se por todo o organismo e atingindo principalmente rins, fígado, articulações, sistema nervoso e pele (BARCELLOS et al., 2012a).

No mesmo animal doente podem estar presentes cepas expressando diferentes tipos de toxinas (ANDRESEN, 1999; SATO et al., 2000; ANDRESEN & AHRENS, 2004; KANBAR et al., 2008). Entretanto, Futagawa-Saito et al. (2007) observaram que cada isolado positivo para a produção de toxina carregava somente um único tipo de gene. Os autores não encontraram diferenças entre as cepas isoladas de animais doentes e saudáveis em relação aos tipos de toxinas encontradas, mas a frequência de isolados toxigênicos em doentes foi quatro vezes maior do que nos isolados de animais saudáveis. Resultados semelhantes foram descritos em outros trabalhos (TANABE et al., 1996; BJÖRKLUND, 2011; ONUMA et al., 2011).

Cepas produtoras de toxina são encontradas amplamente difundidas em diversos países, e alguns genes parecem ser dominantes em certos locais (AARESTRUP & JENSEN, 2002; ANDRESEN, 2005; FUTAGAWA-SAITO et al., 2007). Em 2005, Andresen apresentou resultados do primeiro estudo relacionado à prevalência de cepas toxigênicas em suínos. Na Alemanha a variante ExhD foi dominante, seguido ExhB. Na Bélgica a ExhD também foi dominante, onde também foi observada alta prevalência do gene que codifica a toxina ExhD também em animais sadios. Em estudo semelhante na Rússia, foi observado que a toxina ocorria com mais frequência em cepas de animais doentes, sendo a ExhD predominante entre os isolados (KANBAR et al., 2006). Na Dinamarca, Andresen (1998) e Andresen (1999) através dos testes ELISA e *immunoblotting* conseguiram identificar a produção de ExhA, ExhB e ExhC com os anticorpos utilizados. Posteriormente, através da PCR foi possível identificar a toxina ExhD (ANDRESEN & AHRENS, 2004). Os resultados combinados mostraram que a produção de toxinas foi vista em 93% dos isolados, sendo que a ExhB foi a toxina dominante, seguido para as quase igualmente distribuídas ExhA, ExhC e ExhD. No Japão, Futagawa-Saito et al. (2007) observaram alta prevalência de isolados toxigênicos, sendo que o gene mais prevalente foi *exhA*, seguido de *exhB* e *exhD*.

#### 2.1.5 Sinais clínicos

A EE apresenta início súbito e de curta duração (JONES, 1956). A doença clínica aparece entre 2 a 3 dias pós-infecção, e após 24 horas do início dos sinais já pode ocorrer a formação de crostas na pele dos animais. Em seis dias após a infecção toda a pele pode estar afetada (WEGENER et al., 1993). A epidermite afeta uma proporção variável de leitões nascidos e geralmente, depois de um tempo, desaparece do rebanho.

Alguns animais afetados morrem, alguns podem se recuperar completamente e outros desenvolvem uma forma crônica da doença (PEPPER & TAYLOR, 1977). Lesões localizadas geralmente ocorrem logo após o desmame e as generalizadas são frequentemente observadas em leitões lactentes (PEPPER & TAYLOR, 1977; BARCELLOS et al., 1984; CARVALHO et al., 2007), sendo que nem todos os indivíduos de uma leitegada são igualmente afetados (BARCELLOS et al., 2012). As feridas não são pruriginosas e se iniciam com vesículas na pele e hiperemia, aparecendo na face, axila e virilha, alastrando-se por todo o corpo, e se rompem e formando uma úlcera cutânea superficial. A sujeira do ambiente adere-se às áreas afetadas causando uma coloração escura nas feridas, que aliada à excessiva secreção sebácea e exsudação, favorece crescimento de bactérias da pele e confere um aspecto engordurado e escuro (JONES, 1956; BARCELLOS et al., 2012a). A necrose tecidual gera perda da função da região da pele afetada e produção de um odor desagradável (CORREA et al., 1976; DOSTER, 1995). Também podem ocorrer úlceras na região oral e na almofada plantar dos cascos. Os animais podem apresentar-se febris, desidratados, apáticos, anoréxicos, podendo ocorrer morte em 24 horas em função da septicemia e toxemia. Infecções bacterianas secundárias podem aumentar a gravidade do quadro (JONES, 1956; UNDERDAHL et al., 1963; WEGENER et al., 1993). Raramente a EE foi associada à artrite ou poliartrite em leitões (PHILLIPS et al., 1980; HILL et al., 1996), aborto em porcas (DUNCAN & SMITH, 1992), ou epidermite em animais adultos (PEPPER & TAYLOR, 1977; BARCELLOS et al., 1998).

#### 2.1.6 Lesões macroscópicas e microscópicas

As lesões cutâneas macroscópicas observadas durante necropsia são basicamente as descritas nos sinais clínicos. A pele apresenta hiperemia inicial e produção de exsudato claro que geralmente inicia ao redor da boca, olhos e orelhas e região abdominal. Pode haver formação de uma camada espessa, gordurosa e amarronzada e com odor rançoso devido à mistura de exsudato gorduroso, debris celulares, sujeira e fezes que se aderem à pele afetada (ANDREWS, 1979). As crostas podem ser removidas por ligeira fricção, e expõem uma região sensível, úmida e vascularizada numa camada mais profunda da pele. Durante a fase de recuperação, há crostas secas na pele por um período que pode se estender por semanas (WEGENER & SKOV-JENSEN, 1999). Na forma localizada se observam lesões circulares próximas à face,

com predileção à região caudal da orelha. Animais severamente afetados apresentam desidratação e emaciação. Na necropsia, os linfonodos submaxilar, retrofaríngeo, periescapular, inguinal e poplíteo podem estar aumentados de volume (JONES, 1956; CORREA et al., 1976). Lesões no sistema urinário são frequentes, com dilatação dos ureteres e da pelve renal, e formação de cistos (UNDERDAHL et al., 1963; BARCELLOS et al., 1975; UNDERDAHL & TWIEHAUS, 1975).

Lesões microscópicas são observadas na pele e sistema urinário. Frequentemente há hiperemia, dilatação dos capilares linfáticos e multiplicação do microorganismo na camada queratinizada da epiderme (JONES, 1956; WEGENER & SKOV-JENSEN, 2006). Acantose, espongiose, e paraqueratose também são observadas (ANDRESEN et al., 1993; BARCELLOS et al., 2012a). O estrato germinativo geralmente se torna desorganizado e penetra profundamente na derme, ocorrendo separação da epiderme e derme (JONES, 1956; SATO et al., 1991b; WEGENER et al., 1993; WEGENER & SKOV-JENSEN, 2006) e com infiltrado inflamatório (BARCELLOS et al., 2012a). Nos cascos acometidos, há separação da parede e do estrato córneo que cobrem a sola e almofada plantar, com ulcerações nas regiões interdigitais e coroa do casco (JONES, 1956; ANDREWS, 1979). Os ureteres e pelve renal apresentam edema, infiltrado de células inflamatórias, hiperplasia e degeneração mucoide do epitélio, resultantes da septicemia (MEBUS et al., 1968), podendo ocorrer oclusão desta estrutura, com posterior hidronefrose e pielonefrite (BARCELLOS et al., 2012a). Nos rins, ainda pode-se observar dilatação dos túbulos coletores e hiperplasia com degeneração hidrópica (JONES, 1956; BLOOD & JUBB, 1957).

### 2.1.7 Diagnóstico

Problemas de pele em unidades intensivas de produção de suínos podem ter causas variadas. Entre as possíveis etiologias, a infecção por *S. hyicus* é a mais importante. Diagnósticos diferenciais incluem o ácaro causador da sarna sarcóptica; outras infecções bacterianas por *Streptococcus* spp. e *Actinomyces pyogenes*; fungos como *Microsporum* spp. e *Trichophyton* spp; e infecções virais, incluindo parvovírus e vírus da varíola, e patologias de etiologia ainda indeterminada, como a pitiríase rósea.

Existem também causas nutricionais, em particular as deficiências de riboflavina, niacina, biotina, zinco e iodo (SCHEIBER, 1995; WEGENER & SKOV-JENSEN, 2006). Com as melhorias nutricionais das últimas décadas, causas ligadas ao

uso de rações deficientes se tornaram menos frequentes. Apesar da variedade de agentes associados com lesões cutâneas em suínos, o diagnóstico clínico de epidermite exsudativa pode ser feito com grande probabilidade de acerto quando baseado nas características da doença (SOBESTIANSKY et al. 1989). A ausência de prurido, a aparência das lesões, idade dos animais afetados e condições de criação são características úteis (BARCELLOS et al., 2012a).

A confirmação do diagnóstico pode ser obtida com o isolamento e identificação do agente a partir do exame de suabes coletados das lesões (TANABE et al., 1996) e, como alternativa, o exame histopatológico de amostras da pele lesionada, rins, linfonodos superficiais, fígado e baço (WEGENER & SKOV-JENSEN, 1999). Entretanto, o simples isolamento não é suficiente para definir se a bactéria isolada é a causadora da doença (WEGENER et al., 1993; WEGENER & SKOV-JENSEN, 2006; FUTAGAWA-SAITO, 2007). É importante realizar um diagnóstico com a identificação de isolados virulentos expressando toxinas específicas no rebanho (PARK, 2011).

#### 2.1.8 Tratamento e prevenção

Em casos de EE, medidas de manejo devem ser corrigidas para auxiliar na melhoria do quadro clínico e prevenção da doença (WEGENER & SCHWARZ, 1993; BARCELLOS et al., 2012a), incluindo a correção de problemas higiênicos, ambientais e no manejo com as fêmeas (SCHMIDT, 1983). A limpeza periódica das instalações durante o alojamento dos animais representa um manejo importante. Na saída dos animais de uma baia ou prédio, a limpeza e desinfecção deve ser seguida de vazio sanitário, assim como o uso do sistema de todos dentro/todos fora pode reduzir a pressão de infecção (PARK, 2011).

O tratamento com drogas antimicrobianas e, em menor escala, o uso de vacinas, tem sido as formas frequentemente utilizadas para o controle da EE (BJÖRKLUND, 2011). Para o sucesso terapêutico, uma das estratégias fundamentais para o controle da doença é identificar e tratar os animais doentes no estágio inicial da infecção (SCHMIDT, 1983; WEGENER & SKOV-JENSEN, 2006). Quanto maior for a demora na tomada de decisão e consequente medicação dos animais doentes, pior será a eficiência e sucesso no tratamento (L'ECUYER, 1966) uma vez que animais que já apresentam lesões generalizadas ou comprometimento renal, como resultado da septicemia, frequentemente não respondem à terapia (L'ECUYER & ALEXANDER,

1969; BARCELLOS et al., 2012a). Animais severamente afetados pela doença devem ser eutanasiados (L'ECUYER & ALEXANDER, 1969).

A atividade da toxina pode ser neutralizada por resposta humoral, porém há diversidade antigênica entre as toxinas de diferentes isolados, se fazendo necessário o uso de vacinas autógenas (ANDRESEN et al., 1992; ANDRESEN et al., 1997). O sucesso das vacinas autógenas depende da seleção de cepas virulentas e precisa detecção da prevalência dos tipos toxinas que realmente estão causando a doença no rebanho (WEGENER et al., 1993; BJÖRKLUND, 2011). O uso dessas vacinas é destinado à imunização de fêmeas jovens introduzidas no plantel visando à transmissão de imunidade para as leitegadas (WEGENER et al., 1993; ANDRESEN & AHRENS, 2004).

A fagotipagem tem sido uma das técnicas descritas para seleção de cepas usadas na produção de vacinas autógenas (WEGENER, 1993a). Os suínos são portadores de diversos fagotipos, podendo coexistir até seis fagotipos diferentes no mesmo animal (WEGENER, 1992b; WEGENER, 1993b). Entretanto, animais doentes abrigam uma maior variedade, possuindo fagotipos dominantes (WEGENER, 1992b; WEGENER, 1993b; ANDRESEN, 1998). Wegener (1992b) concluiu que a escolha de 10 isolados aleatórios do *S. hyicus* seria suficiente para cobrir o espectro de fagotipos representativos presentes em um caso. Outros estudos afirmam que o uso exclusivo da fagotipagem pode não ser adequado para a seleção de cepas vacinais, uma vez que isolados toxigênicos e não toxigênicos podem fazer parte de todos os fagogrupos conhecidos, havendo necessidade da utilização em conjunto com antibiograma e perfil de plasmídeos (ANDRESEN, 1998; ANDRESEN, 1999; WEGENER, 1993b).

## **2.2 *Staphylococcus hyicus* e a resistência a antimicrobianos**

Desde a descoberta científica relevante dos antimicrobianos para o tratamento de infecções, observou-se que diversas espécies de bactérias de importância humana e veterinária tem adquirido resistência, em muitos casos a quase todos os antimicrobianos conhecidos (BARBOSA & LEVY, 2000; GNANOU & SANDERS, 2000; SCHWARZ & CHASLUS-DANCLA, 2001; DZIDIC et al., 2008; SAGA & YAMAGUCHI, 2009).

Sob o ponto de vista clínico, uma cepa é considerada resistente quando a terapia antimicrobiana instituída no animal (*in vivo*) não mais resulta na sua eliminação (SCHWARZ & CHASLUS-DANCLA, 2001; BARCELLOS et al., 2012a). Do ponto de

vista microbiológico, a resistência pode ser definida quando um isolado consegue se multiplicar *in vitro* em concentrações do antimicrobiano maiores do que determinado ponto de corte estabelecido. Tal classificação requer critérios aprovados de interpretação (SCHWARZ et al., 2010). Porém, dados de testes de susceptibilidade, como no caso do antibiograma, representam uma estimativa *in vitro* da sensibilidade ou resistência de determinados agentes a uma droga. Geralmente este resultado apresenta boa correlação com o resultado do tratamento nos animais, entretanto, nem sempre isso acontece. Não existe a garantia da eficiência do tratamento *in vivo*, onde muitos outros fatores interagem (L'ECUYER & ALEXANDER, 1969; BARCELLOS et al., 2007).

### 2.2.1 Bases bioquímicas e moleculares da resistência

A habilidade de bactérias em utilizar diversas estratégias responsáveis por torná-las resistentes aos antimicrobianos possui origem genética. A resistência pode ser classificada como natural (intrínseca) ou adquirida. A resistência natural é baseada em genes presentes no cromossomo, que não são transferíveis. É a resistência característica da espécie, e que determina o espectro do antimicrobiano. A resistência adquirida ocorre devido a uma mutação do DNA ou através da aquisição de genes presentes em DNA extra-cromossômico, também chamados de elementos genéticos móveis, entre eles os plasmídeos e os transposons (PRESCOTT et al., 2000; LAMBERT, 2005; ALEKSHUN & LEVY, 2007). A maior parte dos genes de resistência são mediados por plasmídeos, entretanto pode ocorrer transferências para o cromossomo através de eventos de recombinação genética, e esse processo é em grande parte facilitado pelos transposons (KAYE et al., 2004). Certos elementos genéticos móveis podem se autoreplicar dentro da célula e serem transferidos através de diversas formas, sendo elas a transdução, a transformação e a conjugação, se disseminando na população (SCHWARZ & CHASLUS-DANCLA, 2001). Estudos moleculares demonstraram que os plasmídeos desempenham um papel importante na resistência apresentada por *S. hyicus* em relação a diversos antimicrobianos (SCHWARZ & BLOBEL, 1989; SCHWARZ & BLOBLEL, 1990b; WEGENER & SCHWARZ, 1993). Schwarz & Bloblel (1990b), por exemplo, observaram que 66,7% dos *S. hyicus* isolados ao longo de três anos na Alemanha apresentaram plasmídeos e que estes eram geralmente mais resistentes aos antibióticos testados que os demais isolados que não continham plasmídeos.

Os genes de resistência codificam diversos mecanismos nas bactérias, garantindo a sobrevivência das mesmas aos antimicrobianos, podendo ser: a inativação enzimática da droga (modificação ou degradação da molécula do antimicrobiano); por causar impermeabilidade da célula bacteriana, impedindo o antimicrobiano de atingir seu sítio alvo; pela expulsão ativa da droga através de bombas de efluxo dependentes de energia, gerais ou específicas; ou através da alteração na estrutura dos receptores celulares alvos (PRESCOTT et al., 2000; SCHWARZ & CHASLUS-DANCLA, 2001; BUTAYE et al., 2003; LAMBERT, 2005; TENOVER, 2006; ALEKSHUN & LEVY, 2007; DZIDIC et al., 2008).

### 2.2.2 Relação entre toxicidade e resistência

Apesar da possibilidade de que genes de resistência antimicrobiana estejam localizados em conjunto com genes de toxicidade nos mesmos segmentos do genoma ou nos elementos móveis, os estudos feitos até o presente não conseguiram esclarecer completamente essa associação. O que tem sido observado é que a resistência a antimicrobianos existe tanto em isolados toxigênicos como não toxigênicos, provenientes de animais saudáveis e doentes (FUTAGAWA-SAITO et al., 2009). Em 1980, Devriese observou que *S. hyicus* isolados de lesões apresentaram mais resistência do que os isolados de pele não afetada. Wegener & Schwarz (1993), observaram maior resistência a certos antibióticos entre isolados de animais doentes. Outro estudo obteve a resistência praticamente aos mesmos antimicrobianos, porém nos animais saudáveis (TERANISH et al., 1987).

### 2.2.3 Relação entre o uso de antimicrobianos e ocorrência de resistência

O uso de antimicrobianos determina uma pressão de seleção em que são eliminadas as bactérias susceptíveis no hospedeiro, mas não as resistentes (AARESTRUP et al., 1998a; SCHWARZ & CHASLUS-DANCLA, 2001; ANGULO et al., 2004). O potencial de aquisição e transferência dos determinantes genéticos da resistência, aliados ao curto período de replicação desses microorganismos podem rapidamente produzir populações inteiras para as quais um ou mais antimicrobianos não possui capacidade de inibição (PRESCOTT et al., 2000). Um agravante é que o uso de um antibiótico para o qual um plasmídeo da bactéria alvo codifica resistência



determinará a seleção de todo o plasmídeo, sendo que esses segmentos de DNA possuem regiões com genes que podem codificar resistência de um a dez antibióticos diferentes (SCHWARZ & BLOBEL, 1990a; PRESCOTT et al., 2000; SCHWARZ & NOBLE, 1994). Em alguns casos, esses plasmídeos podem conter genes que codificam outros atributos, como a habilidade de colonizar ou a resistência a metais pesados, que podem garantir a permanência destes na ausência de seleção por antibióticos (SCHWARZ & BLOBEL, 1989; SCHWARZ & NOBLE, 1994; PRESCOTT et al., 2000).

Trabalhos já evidenciam que a resistência em suínos é muito mais evidente do que em outros animais de produção. No caso do *S. hyicus*, trabalhos verificaram que isolados provenientes de suínos são mais resistentes ou multirresistentes a antimicrobianos do que os isolados de outras espécies animais (TERANISHI et al., 1987, SCHWARZ & BLOBEL, 1989; AARESTRUP et al., 1998a; AARESTRUP et al.; 1998b; SCHWARZ et al., 1998b; WEGENER & SKOV-JENSEN, 2006; FUTAGAWA-SAITO et al., 2009). O efeito da rotina de administração de antimicrobianos no desenvolvimento de resistência em *S. hyicus* tem sido evidente (BJÖRKLUND, 2011). O único programa de monitoramento de resistência a antimicrobianos em que o *S. hyicus* já foi incluído é o da Dinamarca (Danish Integrated Antimicrobial Resistance Monitoring and Research Programme - DANMAP). Este tem confirmado essa associação, em que houve correlação positiva entre a quantidade de antimicrobiano utilizada em determinado período com o aumento de ocorrência desse fenômeno (AARESTRUP et al.; 1998a). Futagawa-Saito et al. (2009) e Aarestrup & Jensen (2002) observaram comportamento semelhante em amostras provenientes do Japão e Dinamarca, respectivamente.

#### 2.2.4 Impacto da resistência na cadeia produtiva e saúde pública

É importante esclarecer a amplitude do impacto causado pelo problema da resistência aos antimicrobianos. A tomada de decisão em relação ao uso de drogas antimicrobianas na produção animal tem o potencial de influenciar o controle de doenças em todo o sistema produtivo, assim como gerar impactos na saúde pública (AARESTRUP et al., 1998a; ANGULO et al., 2004). Sem desconsiderar sua essencial importância veterinária como ferramenta no tratamento dos animais doentes, o uso dos mesmos para fins terapêuticos ou como aditivos alimentares pode selecionar uma

microbiota resistente não só patogênica, mas também agir em bactérias comensais para qual o antimicrobiano é ativo (SCHWARZ, 1994). Outro agravante é a capacidade das bactérias de realizar a transferência de genes não só de forma interespecífica (vertical), mas também entre gêneros e famílias diferentes (horizontal) (SCHWARZ et al., 1992; SCHWARZ & CHASLUS-DANCLA, 2001). Noble et al. (1996), Tollefson & Karp (2004) e Angulo et al. (2004) apresentaram diversas evidências da transferência horizontal de genes. Por exemplo, Schwarz & Blobel (1990a) observaram indícios de alta frequência de transferência de plasmídeos entre estafilococos de origem humana (*S. aureus*) e animal (*S. hyicus*) em seu estudo. Simeoni et al. (2008) encontraram ao longo de toda uma cadeia de produção de suínos, diversas espécies de estafilococos com alta prevalência de genes de resistência às diversas classes de antimicrobianos. Além disso, havia alta proporção de isolados multiresistentes podendo possuir até seis genes de resistência.

#### 2.2.5 Análise da resistência *in vitro* do *S. hyicus*

Diversos trabalhos *in vitro* foram executados sobre a resistência do *S. hyicus* através de testes de susceptibilidade e estudos moleculares. Porém, ainda há escassez de informações (DEVRIESE, 1980; WERCKENTHIN et al., 2001), muitas vezes em virtude da necessidade constante de atualização do perfil de resistência, da ausência de estudos sobre certos agentes antimicrobianos, e principalmente devido à falta de homogeneidade sobre os critérios de interpretação dos resultados. Estudos *in vitro* utilizaram diferentes técnicas, como disco-difusão (WEGENER & SCHWARZ, 1993; AARESTRUP et al., 1998a; SCHWARZ et al., 1998b; AARESTRUP & JENSEN, 2002; KEHRENBURG et al., 2007), microdiluição em caldo (WEGENER et al., 1994; AARESTRUP & JENSEN, 2002; FUTAGAWA-SAITO et al., 2009), macrodiluição em caldo (KEHRENBURG et al., 2007) e diluição em ágar (DEVRIESE, 1980; TERANISHI et al., 1987; AARESTRUP et al., 1998b), seguindo diferentes protocolos. Os trabalhos realizados também variam na metodologia quanto ao número de isolados analisados, o que pode interferir na interpretação dos resultados (SCHWARZ et al., 2010). Existem poucas informações disponíveis que associam o uso prévio de antimicrobianos e resultados de susceptibilidade (AARESTRUP et al., 1998a; AARESTRUP et al., 1998b; FUGATAWA-SAITO et al., 2009) ou que avaliam

mudanças no perfil de suscetibilidade do *S. hyicus* ao longo do tempo (AARESTRUP e JENSEN, 2002).

Na medicina veterinária, diversos estudos interpretam testes de suscetibilidade categorizando isolados como resistente ou suscetível com base no critério desenvolvido para agentes isolados de seres humanos. Entretanto, essa extrapolação do critério de interpretação com base na farmacocinética em humanos ou outros animais domésticos pode não ser válido para suínos (WEGENER et al., 1994; SALMON et al., 1995; SCHWARZ et al., 2010). Uma vez que não há pontos de corte aprovados pelo CLSI/NCCLS em relação a agentes antimicrobianos para *S. hyicus* baseados em eficácia de testes *in vivo* ou *in vitro*, existe dificuldade em categorizar isolados como resistentes ou susceptíveis.

#### 2.2.6 Resistência aos beta-lactâmicos

Entre os antimicrobianos, os beta-lactâmicos são amplamente utilizadas na suinocultura e para o tratamento de epidermite exsudativa (BARCELLOS et al., 2012b). Drogas dessa classe possuem poder bactericida e amplo espectro, atuando através da inibição de reações enzimáticas na fase final da síntese da camada de peptidoglicano da parede bacteriana, o que leva a produção de uma parede defeituosa e lise celular (FRIENDSHIP & PRESCOTT, 2006; DZIDIC et al., 2008). As penicilinas, como a amoxicilina, fazem parte desse grupo. Entre as cefalosporinas, o único representante do grupo utilizado em suínos é o ceftiofur, uma cefalosporina de terceira geração (BARCELLOS et al., 2012a).

Na veterinária, sabe-se que a resistência à amoxicilina está disseminada (FRIENDSHIP & PRESCOTT, 2006). Entre bactérias Gram-positivas, o mecanismo principal é a destruição enzimática da droga, através de uma grande variedade de beta-lactamases (SCHWARZ & CHASLUS-DANCLA, 2001). Tanto para penicilinas quanto para cefalosporinas, a associação com a produção de beta-lactamases entre patógenos veterinários tem sido vista, através dos genes *blaTEM*, *blaSHV*, *blaCTX-M*, *blaCMY-2*, e *blaAMPC* (BENNETT & CHOPRA, 1993; SCHWARZ & CHASLUS-DANCLA, 2001; CHANDER et al., 2011). Em outras espécies de *Staphylococcus* que não o *S. hyicus*, outro gene mediador é o gene *mecA* (mediador de resistência a outros grupos de antimicrobianos como macrolídeos e tetraciclina), que causa a alteração da estrutura molecular do sítio de ligação (SCHWARZ & CHASLUS-DANCLA, 2001).

Em testes de susceptibilidade *in vitro*, a eficácia do ceftiofur foi analisada quanto à inibição de isolados de *S. hyicus*. Wegener et al. (1994) através da microdiluição em caldo, observaram que 90% dos isolados analisados apresentavam a concentração inibitória mínima necessária para a inibição de 90% dos isolados (CIM<sub>90</sub>) de 1µg/mL e nenhuma relação com a produção de beta-lactamases foi encontrada. Outro estudo utilizou a técnica de disco-difusão e observou que havia 6% de isolados resistentes ao ceftiofur (AARESTRUP et al., 1998a). Nenhum estudo foi encontrado sobre amoxicilina atuando na inibição de *Staphylococcus hyicus*.

### 2.2.7 Resistência as quinolonas

As quinolonas são antimicrobianos bactericidas de amplo espectro, que atuam na fase de síntese do DNA bacteriano, inibindo a síntese da DNA-girase (BARCELLOS & SOBESTIANSKY, 1998; DZIDIC et al., 2008). Com as melhorias nas formas originais através da introdução de um grupo flúor na molécula, foi possível desenvolver uma nova geração de quinolonas, as fluorquinolonas, em que o espectro de ação foi potencializado (SAGA & YAMAGUCHI, 2009; BARCELLOS et al., 2012b). A enrofloxacin é uma quinolona de terceira geração e para uso exclusivo veterinário. Os mecanismos de resistência são modificações no sítio alvo ou sistemas de efluxo ativo da droga (SCHWARZ & DANCLA, 2001), geralmente devido a mutações dos cromossomos (BARCELLOS & SOBESTIANSKY, 1998; SALMON et al., 1995; BARCELLOS et al., 2012b), principalmente nos genes *gyrA* and *gyrB* que codificam a enzima DNA-girase (CAIN, 2013).

Estudos encontraram evidências de resistência às quinolonas logo após sua introdução no mercado (SCHWARZ & CHASLUS-DANCLA, 2001). No caso do *S. hyicus*, testes *in vitro* verificaram alta sensibilidade à enrofloxacin (WEGENER et al., 1994; AARESTRUP et al., 1998a). Wegener et al. (1994) obtiveram um baixo MIC<sub>90</sub> (0,25µg/mL) para os isolados analisados. Aarestrup & Jensen (2002) encontraram valores de CIM variando de 0,25 a 8 µg/mL entre os isolados avaliados. Aarestrup et al. (1998a) observaram baixa resistência em testes de disco difusão, com apenas um isolado resistente em noventa analisados.

### 2.2.8 Resistência aos cloranfenicóis

Os cloranfenicóis e seus derivados, como o florfenicol, são antimicrobianos bacteriostáticos de amplo espectro que atuam através da inibição da formação de polipeptídios na síntese proteica bacteriana (DZIDIC et al., 2008). A resistência aos cloranfenicóis é quase sempre mediada por plasmídeos, porém entre os genes mediadores conhecidos somente um pequeno número confere resistência para o cloranfenicol e florfenicol (SCHWARZ et al., 2004; BARCELLOS et al., 2012b). Existem diversos mecanismos de resistência, sendo o mais encontrado a acetiltransferases (CATs), cuja função é a inativação enzimática da droga (SCHWARZ et al., 1989). Bactérias resistentes ao cloranfenicol devido exclusivamente à CATs são sensíveis ao florfenicol. Isso ocorre devido a alterações na molécula do florfenicol que impedem a inativação desse componente pelas enzimas CAT das bactérias (SCHWARZ & CHASLUS-DANCLA, 2001).

Como consequência da utilização na medicina humana e animal, uma variedade de patógenos bacterianos de diversos gêneros tem adquirido resistência ao cloranfenicol (SCHWARZ et al., 2004). Estudos moleculares também identificaram genes de resistência em isolados de *S. hyicus* (SCHWARZ et al., 1989; SCHWARZ & NOBLE, 1994). Através da Instrução Normativa nº 9 de 2003 (BRASIL, 2003), o uso de cloranfenicol foi proibido no Brasil. O florfenicol tem sido utilizado somente na medicina veterinária e foi introduzido para uso clínico no meio da década de 90. Desde então, houve a detecção de novos genes de resistência, como *floR*, *cfr* ou *fexA* (SCHWARZ et al., 2004). Esses genes e outros, como *pp-flo*, *cmlA-like*, *floSt*, e *flo*, mediam a resistência combinada com o cloranfenicol, e é provável que muitos destes existissem antes da introdução do florfenicol para uso veterinário (SCHWARZ & CHASLUS-DANCLA, 2001; BUTAYE et al., 2003; SCHWARZ et al., 2004).

Em relação ao *S. hyicus*, Kehrenberg et al. (2007), detectaram genes *cfr* e *fexA* quanto à resistência ao florfenicol. Através de teste de disco-difusão, os autores observaram resistência em todos os isolados analisados, e com o uso de técnica de microdiluição em caldo, os valores de CIM<sub>90</sub> dos isolados variavam entre 128 e 256 µg/mL.

### 2.2.9 Resistência às tetraciclinas

As tetraciclinas são drogas bacteriostáticas de amplo espectro de ação, e inibem a síntese proteica através do bloqueio da ligação do RNA mensageiro à subunidade 50S do ribossoma bacteriano (BARCELLOS & SOBESTIANSKY, 1998; DZIDIC et al., 2008). Descoberta em 1948, foi o primeiro grande grupo de antimicrobianos pelas quais o termo “amplo espectro” foi utilizado (ROBERTS, 1996; SCHWARZ & CHASLUS-DANCLA, 2001). Devido a essa característica, baixo custo e relativa segurança, essa classe de antimicrobianos ao longo das últimas décadas foi largamente utilizada como medicamento terapêutico e em estratégias preventivas, na medicina humana, animal e em plantas. Devido ao amplo uso desse agente, a resistência à tetraciclina é disseminada (SCHWARZ & BLOBEL, 1989; FRIENDSHIP & PRESCOTT, 2006).

Os mecanismos de resistência às tetraciclinas são principalmente devido ao efluxo ativo ou proteção dos ribossomos da ação da droga (SCHWARZ & CHASLUS-DANCLA, 2001). A maior parte das bactérias se torna resistente através da aquisição de genes associados a elementos genéticos móveis, também denominados de genes *tet* (*K*, *L*, *M*, *O*) (SCHWARZ et al., 1992; ROBERTS, 1994). No caso do *S. hyicus*, plasmídeos codificando resistência à tetraciclina foi observada através de análise molecular (SCHWARZ & BLOBEL, 1989; WEGENER & SCHWARZ, 1993), sendo que os genes encontrados nos estudos são o *tetK* (SCHWARZ & BLOBEL, 1990b; SCHWARZ et al., 1998b) e o *tetL* (SCHWARZ et al., 1992; SCHWARZ et al., 1998b).

Estudos com teste de susceptibilidade *in vitro* identificaram em *S. hyicus* altos valores de MIC em dois estudos (TERANISH et al., 1987; AARESTRUP & JENSEN, 2002). Wegener et al. (1994) encontraram uma  $CIM_{90} = >32\mu/mL$  utilizando microdiluição em caldo. Através de teste de discodifusão, 47% de isolados resistentes foram encontrados no trabalho de Wegener & Schwarz (1993), 31% no estudo de Aarestrup et al. (1998a) e 100% no estudo de Kehrenberg et al. (2007). Aarestrup & Jensen (2002) observaram variação na proporção de resistência ao longo dos diversos períodos de tempo do estudo. A indicação de alguns autores é que essa droga deva ser usada para o tratamento da EE exclusivamente após a realização de testes de susceptibilidade dos isolados no rebanho afetado (WEGENER et al., 1994).

### 2.2.10 Resistência aos macrolídeos, lincosamidas e pleuromutilinas

Os macrolídeos, lincosamidas, e diterpenos (ou pleuromutilinas) são classes estruturalmente distintas de antimicrobianos que possuem sítios comuns de ligação no ribossomo bacteriano inibindo a síntese proteica (BARCELLOS & SOBESTIANSKY, 1998; DZIDIC et al., 2008). Essas drogas apresentam ação bacteriostática e, em altas doses, podem se tornar bactericidas, sendo predominantemente ativas contra bactérias Gram-positivas (AARESTRUP et al., 1998b; FRIENDSHIP & PRESCOTT, 2006). A tilmicosina (macrolídeo), lincomicina (lincosamida) e tiamulina (pleuromutilina) são utilizadas muito frequentemente em suínos e são agentes de escolha para uso em pulsos antimicrobianos preventivos ou terapêuticos (FRIENDSHIP & PRESCOTT, 2006; BARCELLOS et al., 2012b). Destes, a tiamulina e tilmicosina são usadas exclusivamente na medicina veterinária (SCHWARZ & CHASLUS-DANCLA, 2001).

A resistência a essas classes dá-se principalmente através da modificação enzimática do sítio alvo de ligação e uso de bombas de efluxo, e os genes mediadores geralmente estão tanto em plasmídeos quanto em cromossomos (LUTHJE & SCHWARZ, 2007; BARCELLOS et al., 2012b). Os genes que codificam a expressão dessas enzimas modificadoras são chamados genes *erm*, nos quais diversos tipos já foram descritos (ROBERTS et al., 1999). Nos *S. hyicus*, já foram detectados os genes *ermA*, *ermB* e *ermC* (SCHWARZ et al., 1998a; LUTHJE & SCHWARZ, 2007), com maior prevalência em relação ao gene *ermC* em *S. hyicus* e outros estafilococos de origem suína (SCHWARZ et al., 1998a; WERCKENTHIN et al., 2001; LUTHJE & SCHWARZ, 2007). Outros genes também já descritos em espécies de estafilococos são *inuA* e *inuB*, que conferem resistência às lincosamidas (SCHWARZ & CHASLUS-DANCLA, 2001). Destes, o gene *inuA* já foi relatado em *S. hyicus* (LUTHJE & SCHWARZ, 2007).

Estudos anteriores *in vitro* relataram alta resistência de *S. hyicus* tanto a macrolídeos quanto a lincosamidas (AARESTRUP et al., 1998b) e encontraram correlação positiva em relação à resistência cruzada para as duas classes em *S. hyicus* e outras espécies (DEVRIESE, 1980; AARESTRUP & FRIIS, 1998). Aarestrup et al. (1998b) observaram 41% de resistência à lincomicina através de testes de disco-difusão. Outro estudo também observou alta frequência de resistência a macrolídeos durante vários anos de abrangência do estudo (Aarestrup & Jensen, 2002).

### 2.2.11 Resistência as sulfonamidas

As sulfonamidas são drogas bacteriostáticas de amplo espectro de ação, que agem na inibição da síntese do ácido fólico das bactérias, um cofator necessário para a biossíntese de DNA, e conseqüentemente, ocorre inibição da divisão bacteriana (DZIDIC et al., 2008). A resistência a esta classe de drogas está disseminada em bactérias presentes em suínos (FRIENDSHIP & PRESCOTT, 2006), provavelmente devido ao uso amplo dessa droga nesses animais (SCHWARZ & BLOBEL, 1989). Geralmente é mediada por genes em plasmídeos como o gene *dfrA* já identificado em estafilococos (SCHWARZ & CHASLUS-DANCLA, 2001), e em geral se associa com a resistência a outros membros do grupo (BARCELLOS et al., 2012b). Aarestrup & Jensen (2002) detectou altos valores de CIM do sulfametoxazole para a inibição de isolados de *S. hyicus*.

### 2.2.12 Multiresistência

O termo multiresistência refere-se exclusivamente a resistência adquirida, e ainda não existe uma definição universal (SCHWARZ et al., 2010). Segundo Schwarz et al. (2010), em se tratando de testes de susceptibilidade, a resistência a três ou mais classes de antimicrobianos pode ser classificada como multiresistência. No caso da resistência a diversos agentes pertencentes à mesma classe, quando determinada pelo mesmo mecanismo, não se caracteriza por multiresistência. Em outros casos, um único mecanismo de resistência pode promover proteção a um ou mais antimicrobianos. Por exemplo, os genes *erm* determinantes de enzimas metiltransferases que proporcionam resistência à eritromicina (macrolídeo) também o fazem para lincosamidas. Se estudos moleculares são realizados em conjunto, a resistência deve ser considerada quando há isolados bacterianos com três ou mais genes de resistência ou mutações, todas as quais são associadas com diferentes classes de antimicrobianos. Estudos moleculares identificaram isolados de *S. hyicus* resistentes à macrolídeos, lincosamidas, tetraciclina e aminoglicosídeos (WEGENER & SCHWARZ, 1993), e resistentes a macrolídeos, lincosamidas, tetraciclina, aminoglicosídeos e cloranfenicol (SCHWARZ & BLOBEL, 1990a). Em outro trabalho realizado durante oito anos no Japão, Futagawa-Saito et al.



(2009) observaram uma tendência do *S. hyicus* em aumentar a resistência a diversos antimicrobianos.

### 3. ARTIGO

ANTIMICROBIAL SUSCEPTIBILITY PROFILE OF RECENT AND HISTORICAL  
*Staphylococcus hyicus* ISOLATES FROM CASES OF EXUDATIVE EPIDERMITIS  
IN BRAZIL

**Antimicrobial susceptibility profile of historical and recent *Staphylococcus hyicus* isolates from cases of exudative epidermitis in Brazil**

**ABSTRACT**

This study was conducted to assess antimicrobial activity of nine antimicrobial agents against one hundred seventy-one porcine *Staphylococcus hyicus* isolates from Brazilian herds, collected in different periods (1975-1984 and 2012). Beta-lactam (ceftiofur and amoxicillin) were the most active compounds for both groups of isolates, with similar results. Lincomycin, sulfamethoxazole and tilmicosin were the less effective against the *S. hyicus* strains tested, with MIC<sub>90</sub> varying from 128 to 512 µg/ml. A significant increase in resistance between historical and recent isolates was observed in six out of nine antimicrobial agents (amoxicillin, enrofloxacin, florfenicol, lincomycin, tilmicosin and tiamulin). There are no suggestion of breakpoints for animal *S. hyicus* strains in CLSI and scarce data on EUCAST database. The information provided by this study which analyzed 171 strains from clinical cases of exudative epidermitis can greatly contribute to improve the background on resistance of this pathogen.

Keywords: swine, exudative epidermitis, *Staphylococcus hyicus*, antimicrobial resistance

**INTRODUCTION**

Virulent strains of *Staphylococcus hyicus* have been associated with exudative epidermitis (EE), an infectious disease that affect swine worldwide (WEGENER, 1992). Suckling and weaned pigs are mostly affected, and the disease is characterized by a generalized infection of the skin with a clinical picture of greasy exudation, along with exfoliation and generalized crust formation (WEGENER & SKOV-JENSEN, 1999). Due to septicemia and toxemia, affected pigs may show decreased growth rate, dehydration and death within 24 hours (WEGENER & SKOV-JENSEN, 2006).

Exudative epidermitis represents a challenge to many swine farms. The use of antimicrobial agents is the usual strategy to control the disease, but increase observed of

resistant bacteria may cause treatment failure (PENNY & MUIRHEAD, 1986; WEGENER & SCHWARZ, 1993).

Previous research on antimicrobial resistance of *Staphylococcus hyicus* isolates using *in vitro* susceptibility tests were performed with different techniques, including protocols of agar disk diffusion (WEGENER & SCHWARZ, 1993; AARESTRUP et al., 1998a; SCHWARZ et al., 1998; AARESTRUP & JENSEN, 2002; KEHRENBERG et al., 2007), broth micro dilution (WEGENER et al., 1994; AARESTRUP & JENSEN, 2002; FUTAGAWA-SAITO et al., 2009), broth macro dilution (KEHRENBERG et al., 2007), and agar dilution (DEVRIESE, 1980; TERANISHI et al., 1987; AARESTRUP et al., 1998b). Scientific information from studies varies not only with the technique used but also with sample size, antimicrobial drugs tested, clinical status (diseased/healthy), type of strain (virulent/avirulent), and interpretation criteria, making comparison between them very difficult.

Few studies are available about susceptibility of *S. hyicus*, and for some antimicrobials currently used in pig production no published data were found. Moreover, to our best knowledge, there is no information about isolates from Brazil. The purpose of this study was to determine MICs of various traditional and contemporary drugs used at field for inhibition of porcine *S. hyicus* isolates collected at two different periods of time from different farms of southern Brazil, where most pig production of this country is concentrated.

## **MATERIALS AND METHODS**

### **Sampling:**

A total of one hundred seventy-one porcine isolates of *Staphylococcus hyicus* belonging to two groups of samples were used: historical and recent strains. Historical strains (80) belonged to a collection of isolates from cases of exudative epidermitis that occurred from 1975 to 1984 in southern Brazil, stocked lyophilized at Swine Health Laboratory (Setor de Suínos at Federal University of Rio Grande do Sul- UFGRS), and Recent strains (91) were isolated in 2012 from clinical cases from fifteen farms from the same area in 2012. All farms were located in states in southern Brazil, where at least 80% of pig production of the country is concentrated. These farms occasionally used

antimicrobials to control infections in weanling piglets with varied protocols and products (beta-lactam, fluoroquinolones, sulfonamides, florfenicol and aminoglycosides). Samples were cultured on a selective medium described by Devriese (1977), and the phenotypic identity of all isolates was confirmed by biochemical and microbiological methods as described by Devriese (1977) and Quinn et al. (2011).

#### Antimicrobial susceptibility testing:

Antimicrobial susceptibility tests were performed by agar dilution following the protocol of the M31-A3 document, according to the Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI, 2008). Minimal inhibitory concentrations (MICs) were determined for nine antimicrobial agents (with test dilutions indicated in parenthesis, in two-fold dilutions): ceftiofur, amoxicillin, lincomycin, tilmicosin, tetracycline, florfenicol, enrofloxacin, tiamulin (0.0125 to 256  $\mu\text{g/ml}$ ) and sulfamethoxazole (0.0125 to 512 $\mu\text{g/ml}$ ). In all cases the MIC was defined as the lowest concentration producing no visible growth. The following quality control organisms were included in the study: *Escherichia coli* ATCC 25922 and *Staphylococcus aureus* ATCC 29213, as recommended in M31-A3/CLSI (2008) document.

#### Statistical analysis:

Data were described considering values of MIC<sub>50</sub>, MIC<sub>90</sub> and MIC range showed by groups of strains for each antimicrobial. Significant differences between groups in the percentages of samples within each MIC value were tested using  $\chi^2$  test or Fisher's test ( $\alpha= 0.05$ ). A non parametric analysis was used to compare MIC values between groups of strains and differences were determined using the Wilcoxon test. In this analysis, values  $\leq 0.125$ ,  $>256$  and  $>512$  were considered as 0.125, 512 and 1024, respectively.

## RESULTS AND DISCUSSION

In Veterinary Medicine, a number of studies have interpreted data by categorizing isolates as resistant or susceptible on the basis of the criteria developed for human bacterial isolates. However, the validity of using this extrapolation of interpretative criteria considering pharmacokinetics of humans or other domestic animals has not been established for pigs (WEGENER et al., 1994; SALMON et al., 1995). Since there are no CLSI-approved breakpoints for antimicrobial agents against *Staphylococcus hyicus*, it was not possible to categorize isolates as resistant or susceptible, therefore only MIC data are presented.

The MIC distribution of the 171 isolates of *Staphylococcus hyicus* are summarized in Table 1. Beta-lactam (represented by ceftiofur and amoxicillin) showed the lowest concentration necessary to inhibit 90% of isolates (MIC<sub>90</sub>) of historic and recent group (MIC<sub>90</sub>= 0.5 µg/ml and MIC<sub>90</sub>= 2 µg/ml, respectively). Amoxicillin has been widely used in suckling and weaned pigs to treat exudative epidermitis in Brazil, but we did not find studies about its efficacy against *S. hyicus* in this country or elsewhere. In the present work, it was observed a significant increase in MIC values of this antimicrobial by Wilcoxon analysis. Previous studies tested ceftiofur and its efficacy to *S. hyicus*. Wegener et al. (1994) reported a limited level of resistance, with MIC<sub>90</sub> of 1µg/ml and lower MIC range of ceftiofur using broth microdilution, whereas Aarestrup et al. (1998a) found a reduced resistance of microorganisms to ceftiofur using disc diffusion test. Statistically, although there was an increase on MIC values for recent strains, a important amount of strains belonging to this group remained with low MIC's, not giving a significant variation of resistance to ceftiofur between historical and recent strains by Wilcoxon test.

Enrofloxacin is a third generation fluoroquinolone that has been developed solely for veterinary medicine (SALMON et al., 1995). It showed the best activity *in vitro* against historical isolates, with MIC<sub>90</sub> of ≤0.125 µg/ml and a range from 0,125 to 1 µg/ml. However, for recent isolates, MIC<sub>90</sub> raised to 32 µg/ml along with a greater MIC range of ≤0.125-256 µg/ml. Statistical analysis revealed a marked increase in MIC values between historical and recent strains, with a reduction of isolates with 0.125 µg/ml and an increase of isolates within the range of 2-16 µg/ml (p<0.05). When historical strains were obtained, enrofloxacin was not used in pigs in Brazil what could explain the high susceptibility of the historical isolates. The drug was launched in Brazil

in 1990, and since then it was widely used to treat infections of young piglets. Other studies found occurrence of resistance shortly after introduction of quinolones to commercial usage (SCHWARZ & CHASLUS-DANCLA, 2001). Previous studies found a good susceptibility of *S. hyicus* to enrofloxacin (WEGENER et al.; 1994; AARESTRUP et al.; 1998a). Wegener et al. (1994) reported MIC<sub>90</sub> of 0,25µg/ml, while Aarestrup et al. (1998a) found 1,1% resistance using disk diffusion test.

Florfenicol is a fluorinated derivative of chloramphenicol and has exclusive use in veterinary medicine (SCHWARZ et al., 2004). In Brazil, it was introduced in 1996, after collection of our historical strains. A significant increase on MIC values were observed ( $p < 0.05$ ) between groups. Isolates showed MIC<sub>90</sub> of 2 µg/ml for historical isolates and 32 µg/ml for recent isolates, and MIC range (of  $\leq 0.125$ -16 µg/ml for historical isolates and of  $\leq 0.125$ -128 µg/ml for recent isolates). Kehrenberg et al. (2007) reported resistance in 100% of isolates analyzed using disk diffusion tests, and higher range of MIC<sub>90</sub>=128 to 256 µg/mL using broth macro dilution tests.

Tiamulin, a representative of pleuromutilins, is commonly used in preventive programs in swine farms in southern Brazil. High MIC values were observed for both historical (MIC<sub>90</sub>= 64 µg/ml) and recent strains (MIC<sub>90</sub>= 256 µg/ml), with a marked increase in MIC values in recent strains. Most historical isolates had MIC values in the range of 0.25-0.5 µg/ml contrasting with recent isolates which were concentrated in 128-256 µg/ml ( $p < 0.05$ ). This is in accordance with a previous study that reported an increased resistance of *S. hyicus* to tiamulin (PARK, 2011). This product is generally recommended for treatment of enteric and respiratory diseases, without a clear indication for therapy or prevention of skin diseases.

Tetracycline showed high MIC values for both historical and recent strains, with MIC<sub>90</sub>=32 µg/ml. No significant difference ( $P > 0.05$ ) was observed in MIC values between strains isolated in different periods. These results indicate that resistance was already present at the time of collection of the historical samples and remained relatively constant. This could be explained by the fact that tetracycline has been used for a long time in swine herds in Brazil and elsewhere (ROBERTS, 1996). Other studies also found high MIC values among studied strains (TERANISH et al., 1987; AARESTRUP & JENSEN, 2002). Wegener et al. (1994) found MIC<sub>90</sub> >32µ/mL using broth microdilution. Other studies performing agar disk diffusion found 47% (WEGENER & SCHWARZ, 1993), 31% (AARESTRUP et al., 1998a), and 100% (KEHRENBURG et al., 2007) of resistance isolates. AARESTRUP & JENSEN (2002)

observed variations in resistance through time. This drug should be used for the treatment of EE only following antimicrobial susceptibility testing of isolates from the affected herd (WEGENER et al., 1994).

The remaining antimicrobials were the less active against both groups, with the highest MIC<sub>90</sub> values. Significant increase in MIC values ( $P < 0.05$ ) was observed for lincomycin and tilmicosin. Macrolides and lincosamides are structurally distinct classes of antibiotics with a common site of action, and resistance to macrolides is associated with resistance to lincosamides in *S. hyicus* and other bacteria (DEVRIESE, 1980; AARESTRUP & FRIIS, 1998). Previous studies found high MIC values for macrolides in *S. hyicus* (AARESTRUP & JENSEN, 2002). Using disk diffusion, Aarestrup et al. (1998b) found 41% of resistant *S. hyicus* to lincomycin. The lowest activity of lincomycin could be explained by results found in a study conducted by Wegener et al. (1994), where it was found that lincomycin without addition of spectinomycin was inactive against *S. hyicus* strains, probably due a lack of synergic interaction without association of drugs.

Despite the high MIC values observed for sulfamethoxazole, there was no difference ( $P > 0.05$ ) between historical and recent isolates. Resistance to sulfonamides is disseminated (FRIENDSHIP & PRESCOTT, 2006), and this may be related to the frequent use of this drug in pig farms (SCHWARZ & BLOBEL, 1989). However, currently, the use of sulfonamides in Brazil has restrictions, with the aim to prevent residues in pork. In *S. hyicus*, studies reported 17% of resistance to sulfonamides in disk diffusion (AARESTRUP et al., 1998a) and high MIC values for sulfamethoxazole (AARESTRUP & JENSEN, 2002).

Studies have shown that resistance in *S. hyicus* is mainly mediated by genes within extra-chromosomal DNA (WEGENER & SCHWARZ, 1993) and bacteria can share these determinants in a population (FUGATAWA-SAITO et al., 2009). *S. hyicus* was previously found to carry plasmids with resistance genes for different antimicrobial classes, for instance, genes for macrolides and lincosamides resistance (WEGENER & SCHWARZ, 1993; AARESTRUP & JENSEN, 2002; LUTHJE & SCHWARZ, 2007), as well as tetracyclines (SCHWARZ & BLOBEL, 1990; WEGENER & SCHWARZ, 1993; ARESTRUP & JENSEN, 2002) and florfenicol (KEHRENBERG et al., 2007). Further studies are in course with the strains used in the present work to determine the genetic basis of resistance, as well as virulence among them.



Overall, we found an increase in resistance between historical and recent isolates for six out of nine antimicrobial agents (amoxicillin, enrofloxacin, florfenicol, lincomycin, tilmicosin and tiamulin), in particular with enrofloxacin and tiamulin. Three antimicrobials did not change MIC values along the time; two of them (tetracycline and sulfamethoxazole) were widely used at the time of collection of historic isolates, and ceftiofur was introduced in 1996. Beta-lactam was the most active class of antimicrobials tested, being ceftiofur the most efficient drug for isolates, whereas tilmicosin, lincomycin and sulfamethoxazole showed poor efficacy in the test. There are no suggestion of breakpoints for animal *S. hyicus* strains in CLSI. Through research on EUCAST database, there is scarce information about susceptibility of this microorganism, which is based on few studies and samples. The information provided by this study which analyzed 171 strains from clinical cases of exsudative epidermitis can greatly contribute to improve the background about resistance of this pathogen and contribute to form a database and establish cut-off values for veterinary strains of *S. hyicus*.

**REFERENCES**

AARESTRUP, F. M.; BAGER, E.; JENSEN, N. E.; MADSEN, M.; MEYLING, A.; WEGENER, H. C. Resistance to antimicrobial agents used for animal therapy in pathogenic, zoonotic and indicator bacteria isolated from different food animals in Denmark: a baseline study for the Danish Integrated Antimicrobial Resistance Monitoring Program (DANMAP). **Acta Pathologica Microbiologica et Immunologica Scandinavica**, v. 106, p. 745-770, 1998a.

AARESTRUP, F. M.; BAGER, F.; JENSEN, N. E.; MADSEN, M.; MEYLING, A.; WEGENER, H.C. Surveillance of antimicrobial resistance in bacteria isolated from food animals to antimicrobial growth promoters and related therapeutic agents in Denmark. **Acta Pathologica Microbiologica et Immunologica Scandinavica**, v. 106, p. 606-422, 1998b.

AARESTRUP, F. M.; FRIIS, N. F. Antimicrobial susceptibility testing of *Mycoplasma hyosynoviae* isolates from pigs during 1968 to 1971 and during 1995 and 1996. **Veterinary Microbiology**, v. 61, p. 33-39, 1998.

AARESTRUP, F. M.; JENSEN, L. B. Trends in antimicrobial susceptibility in relation to antimicrobial usage and presence of resistance genes in *Staphylococcus hyicus* isolated from exudative epidermitis in pigs. **Veterinary Microbiology**, v. 89, p. 83-94, 2002.

CLSI, Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance standards for antimicrobial disk and dilution susceptibility tests for bacteria isolated from animals; Approved Standard – 3. ed. **CLSI/NCCLS document M31-A3**. CLSI, Wayne, 2008.

DEVRIESE, L. A. Isolation and identification of *Staphylococcus hyicus*. **American Journal of Veterinary Research**, v. 38, p. 787-792, 1977.

DEVRIESE, L. A. Sensitivity of staphylococci from farm animals to antibacterial agents used for growth promotion and therapy: a ten year study. **Annales de Recherches Vétérinaires**, v. 11, p. 399-408, 1980.

FRIENDSHIP, R. M.; PRESCOTT, J. F. Drug therapy and prophylaxis. In: STRAW, B. E.; ZIMMERMAN, J. J.; D'ALLAIRE, S.; TAYLOR, D. J. (Eds.). **Diseases of Swine**. Ames, Iowa: Iowa University Press, p. 1134-1136, 2006.

FUTAGAWA-SAITO, K.; BA-THEIN, W.; FUKUYASU, T. Antimicrobial susceptibilities of exfoliative toxigenic and non-toxigenic *Staphylococcus hyicus* strains in Japan. **Journal of Veterinary Medicine Science**, v. 71, p. 681-684, 2009.

KEHRENBERG, C.; AARESTRUP, F. M.; SCHWARZ, S. IS21-558 Insertion sequences are involved in the mobility of the multiresistance gene *cfr*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 51, p 483-487, 2007.

LUTHJE, P. L.; SCHWARZ, S. Molecular basis of resistance to macrolides and lincosamides among staphylococci and streptococci from various animal sources

collected in the resistance monitoring program BfT-GermVet. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 29, p. 528–535, 2007.

PARK, J. **Investigation of exudative epidermitis and ear necrosis in pigs**. PhD thesis. University of Guelph, Ontario, Canada, 2011, 135 p.

PENNY, R. H. C.; MUIRHEAD, M. R. Exudative epidermitis. In: LEMAN, A. D.; STRAW, B.; GLOCK, R. D.; MENGELING, W. L.; PENNY, R. H. C.; SCHOLL, E. (Eds.). **Diseases of swine**. Ames, Iowa: Iowa State University Press, p. 87-88, 1986.

QUINN, P. J.; MARKEY, B. K.; LEONARD, F. C.; FITZPATRICK, E. S.; FANNING, S.; HARTIGAN, P. J. **Veterinary Microbiology and Microbial Disease**. Iowa: Wiley-Blackwell, p. 1231, 2011.

ROBERTS, M. C. Tetracycline resistance determinants: mechanisms of action, regulation of expression, genetic mobility, and distribution. **Microbiology Reviews**, v. 19, p. 1-24, 1996.

SALMON, S. A.; WATTS, J. L.; CASE, C. A.; HOFFMAN, L. J.; WEGENER, H. C.; YANCEY, JR., R. J. Comparison of MICs of ceftiofur and other antimicrobial agents against bacterial pathogens of swine from the United States, Canada, and Denmark. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 33, p. 2435-2444, 1995.

SCHWARZ, S.; BLOBEL, H. Isolation and restriction endonuclease analysis of a tetracycline resistance plasmid from *Staphylococcus hyicus*. **Veterinary Microbiology**, v. 24, p. 113-122, 1990.

SCHWARZ, S.; BLOBEL, H. Plasmids and resistance to antimicrobial agents and heavy metals in *Staphylococcus hyicus* from pigs and cattle. **Journal of Veterinary Medicine**, v. 36, p. 669-673, 1989.

SCHWARZ, S.; CHASLUS-DANCLA, E. Use of antimicrobials in veterinary medicine and mechanisms of resistance. **Veterinary Research**, v. 32, p. 201-225, 2001.

SCHWARZ, S.; KEHRENBERG, C.; DOUBLET, B.; CLOECKAERT, A. Molecular basis of bacterial resistance to chloramphenicol and florfenicol. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 28, p. 519-542, 2004.

SCHWARZ, S.; ROBERTS, M. C.; WERCKENTHIN, C.; PANG, Y.; LANGE, C. Tetracycline resistance in *Staphylococcus* spp. from domestic animals. **Veterinary Microbiology**, v. 63, p. 217-227, 1998.

TERANISHI, H.; SHIMIZU, A.; KAWANO, J.; KIMURA, S. Antibiotic resistance of *Staphylococcus hyicus* subsp. *hyicus* strains isolated from pigs, cattle and chickens. **Japanese Journal of Veterinary Science**, v. 49, p. 427–432, 1987.

WEGENER, H. C.; SCHWARZ, S. Antibiotic resistance and plasmids in *Staphylococcus hyicus* isolated from pigs with exudative epidermitis and from healthy pigs. **Veterinary Microbiology**, v. 35, p. 363-372, 1993.

WEGENER, H. C.; SKOV-JENSEN, E. W. Exudative epidermitis. In: STRAW, B. E.; D'ALLAIRE, S.; MENGELING, W. L.; TAYLOR D. J. (Eds.). **Diseases of Swine**. Ames, Iowa: Iowa University Press, p. 469-474, 1999.

WEGENER, H. C.; SKOV-JENSEN, E. W. Exudative epidermitis. In: STRAW, B. E.; ZIMMERMAN, J. J.; D'ALLAIRE, S.; TAYLOR, D. J. **Diseases of Swine**. Ames, Iowa: Iowa University Press, p. 675-679. 2006.

WEGENER, H. C. ***Staphylococcus hyicus* Epidemiology and Virulence in Relation to Exudative Epidermitis in Pigs**. Ph.D. Thesis. National Veterinary Laboratory and Royal Veterinary Agricultural University, Denmark, 1992.

WEGENER, H. C.; WATTS, J. L.; SALMON, S. A.; YANCEY, R. J. Antimicrobial susceptibility of *Staphylococcus hyicus* isolated from exudative epidermitis in pigs. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 32, p. 793-795, 1994.

Table 1. Distribution of isolates in % according to MICs (Minimal Inhibitory Concentration) of nine antimicrobials tested for 80 historical (H) and 91 recent (R) *Staphylococcus hyicus* isolates

Anti-microbial agent	Strain group	Frequency (%) of isolates with MIC ( $\mu\text{g/ml}$ )																MIC range (mg/ml)		MIC	MIC
		$\leq 0.125$	0.25	0.5	1	2	4	8	16	32	64	128	256	$> 256$	$> 512$	$> 512$	$>$	50	90		
Ceftiofur	H	10.0	22.5	60.0 <sup>a</sup>	0 <sup>a</sup>	0 <sup>a</sup>	7.5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	$\leq 0.125$ -4	0.5	0.5	
	R	12.0	34.0	34.0 <sup>b</sup>	7.6 <sup>b</sup>	8.7 <sup>b</sup>	3.3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	$\leq 0.125$ -4	0.5	2	
Amoxicillin <sup>c</sup>	H	72.5 <sup>a</sup>	5.0	15.0	2.5 <sup>a</sup>	5.0 <sup>a</sup>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	$\leq 0.125$ -2	$\leq 0.125$	0.5	
	R	36.2 <sup>b</sup>	4.4	17.5	16.4 <sup>b</sup>	28.8 <sup>b</sup>	0	2.2	1.1	0	0	0	1.1	1.1	1.1	1.1	1.1	$\leq 0.125$ ->256	0.5	2	
Enrofloxacin <sup>c</sup>	H	95.0 <sup>a</sup>	1.2	2.5	1.2	0 <sup>a</sup>	0 <sup>a</sup>	0 <sup>a</sup>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	$\leq 0.125$ -1	$\leq 0.125$	$\leq 0.125$	
	R	19.7 <sup>b</sup>	4.4	2.2	5.4	29.6 <sup>b</sup>	8.7 <sup>b</sup>	7.6 <sup>b</sup>	8.7 <sup>b</sup>	3.3	0	4.4	0	5.4	5.4	5.4	5.4	$\leq 0.125$ ->256	2	32	
Lincomycin <sup>c</sup>	H	25.0 <sup>a</sup>	13.7 <sup>a</sup>	8.7 <sup>a</sup>	1.2	1.2	1.2	5.0 <sup>a</sup>	3.7	1.2	3.7 <sup>a</sup>	2.5 <sup>a</sup>	3.7	28.7 <sup>a</sup>	28.7 <sup>a</sup>	28.7 <sup>a</sup>	28.7 <sup>a</sup>	$\leq 0.125$ ->256	2	>256	
	R	1.1 <sup>b</sup>	0 <sup>b</sup>	0 <sup>b</sup>	1.1	0	0	0 <sup>b</sup>	0	1.1	27.4 <sup>b</sup>	28.5 <sup>b</sup>	8.7	31.8 <sup>b</sup>	31.8 <sup>b</sup>	31.8 <sup>b</sup>	31.8 <sup>b</sup>	$\leq 0.125$ ->256	128	>256	
Tetracycline	H	28.7	0	2.5	5.0	7.5	3.7	5.0	10.0	35.0	2.5	0	0	0	0	0	0	$\leq 0.125$ -64	8	32	
	R	41.7	5.4	4.4	1.1	3.3	3.3	5.4	3.3	24.1	6.5	1.1	0	0	0	0	0	$\leq 0.125$ -128	0.5	32	
Tilmicosin <sup>c</sup>	H	72.5 <sup>a</sup>	1.2 <sup>a</sup>	1.2	6.2 <sup>a</sup>	0	0	1.2	0	0	0	7.5 <sup>a</sup>	10 <sup>a</sup>	10 <sup>a</sup>	10 <sup>a</sup>	10 <sup>a</sup>	10 <sup>a</sup>	$\leq 0.125$ -256	$\leq 0.125$	128	
	R	45.0 <sup>b</sup>	13.1 <sup>b</sup>	4.4	0 <sup>b</sup>	0	2.2	1.1	3.3	4.4	0	0 <sup>b</sup>	26.3 <sup>b</sup>	26.3 <sup>b</sup>	26.3 <sup>b</sup>	26.3 <sup>b</sup>	26.3 <sup>b</sup>	$\leq 0.125$ -256	0.25	256	
Tiamulin <sup>c</sup>	H	2.5	28.7 <sup>a</sup>	42.5 <sup>a</sup>	5.0 <sup>a</sup>	1.2	0	2.5	0	6.25	2.5	8.7 <sup>a</sup>	0 <sup>a</sup>	0	0	0	0	$\leq 0.125$ -128	0.5	64	
	R	2.2	0 <sup>b</sup>	1.1 <sup>b</sup>	0 <sup>b</sup>	0	1.1	0	2.2	1.1	8.7	25.2 <sup>b</sup>	58.2 <sup>b</sup>	58.2 <sup>b</sup>	58.2 <sup>b</sup>	58.2 <sup>b</sup>	58.2 <sup>b</sup>	$\leq 0.125$ -256	256	256	
Sulfamethoxazole	H	0	0	0	0	0	16.2 <sup>a</sup>	1.0	13.7 <sup>a</sup>	21.2	12.5	6.2	0	0	0	0	0	4->512	32	512	
	R	0	0	0	1.1	0 <sup>b</sup>	2.2	28.5 <sup>b</sup>	23.0	14.2	6.5	4.4	4.4	4.4	4.4	4.4	4.4	2-512	32	512	
Florfenicol <sup>c</sup>	H	1.2	1.2	13.7	67.5 <sup>a</sup>	15.0 <sup>b</sup>	0	0	1.2 <sup>a</sup>	0 <sup>a</sup>	0	0	0	0	0	0	0	$\leq 0.125$ -16	1	2	
	R	1.1	1.1	7.6	6.5 <sup>b</sup>	0 <sup>a</sup>	3.3	4.4	26.3 <sup>b</sup>	48.3 <sup>b</sup>	0	1.1	0	0	0	0	0	$\leq 0.125$ -128	16	32	

<sup>a, b</sup> Significant difference ( $p < 0.05$ ) in percentages of historical and recent isolates within MIC categories through Chi-square analysis.

<sup>c</sup> Significant difference ( $p < 0.05$ ) between historical and recent isolates through Wilcoxon test.

#### 4. CONSIDERAÇÕES FINAIS

A epidermite exsudativa é uma doença de importância sanitária na suinocultura industrial, com reflexo negativo na produtividade dos leitões. O uso de antimicrobianos é essencial para o controle dessa enfermidade e a falta de conhecimento sobre quais antimicrobianos são de fato potencialmente ativos para as cepas de campo pode influenciar no sucesso terapêutico.

Informações sobre susceptibilidade *in vitro* são importantes para o monitoramento do comportamento de resistência de bactérias patogênicas, tanto na saúde pública quanto na medicina veterinária. No Brasil, ainda há falta de conhecimento sobre a susceptibilidade de isolados do campo do agente etiológico da epidermite exsudativa. O presente estudo proporcionou evidências do aumento da resistência do *S. hyicus* as várias classes de antimicrobianos que são atualmente utilizados na suinocultura e no controle da infecção. As principais conclusões do presente trabalho evidenciam o aumento dos valores de CIM necessários para inibição do agente em seis de nove antimicrobianos testados. Os beta-lactâmicos foram os agentes mais eficientes, representados pelo ceftiofur e amoxicilina, embora este último tenha apresentado redução da efetividade. Utilizando este estudo *in vitro* como referência para recomendação na escolha terapêutica a campo, o ceftiofur é droga mais recomendada, embora se saiba atualmente da possibilidade de haver diferenças na susceptibilidade de bactérias *in vivo* quando comparadas a *in vitro*.

Adicionalmente, é importante ter conhecimento dos genes determinantes da resistência nas cepas circulantes em nosso país. Isso fundamenta estudos moleculares no futuro com os isolados utilizados nesse trabalho e com futuras amostras que ainda podem ser coletadas.

## REFERÊNCIAS

AARESTRUP, F. M.; BAGGER, E.; JENSEN, N. E.; MADSEN, M.; MEYLING, A.; WEGENER, H. C. Resistance to antimicrobial agents used for animal therapy in pathogenic, zoonotic and indicator bacteria isolated from different food animals in Denmark: a baseline study for the Danish Integrated Antimicrobial Resistance Monitoring Programm (DANMAP). **Acta Pathologica Microbiologica et Immunologica Scandinavica**, v. 106, p. 745-770, 1998a.

AARESTRUP, F. M.; BAGGER, F.; JENSEN, N. E.; MADSEN, M.; MEYLING, A.; WEGENER, H.C. Surveillance of antimicrobial resistance in bacteria isolated from food animals to antimicrobial growth promoters and related therapeutic agents in Denmark. **Acta Pathologica Microbiologica et Immunologica Scandinavica**, v. 106, p. 606-422, 1998b.

AARESTRUP, F. M.; FRIIS, N. F. Antimicrobial susceptibility testing of *Mycoplasma hyosynoviae* isolates from pigs during 1968 to 1971 and during 1995 and 1996. **Veterinary Microbiology**, v. 61, p. 33-39, 1998.

AARESTRUP, F. M.; JENSEN, L. B. Trends in antimicrobial susceptibility in relation to antimicrobial usage and presence of resistance genes in *Staphylococcus hyicus* isolated from exudative epidermitis in pigs. **Veterinary Microbiology**, v. 89, p. 83-94, 2002.

AHRENS, P.; ANDRESEN, L. O. Cloning and sequence analysis of genes encoding *Staphylococcus hyicus* exfoliative toxin types A, B, C, and D. **Journal of Bacteriology**, v. 186, p. 1833-1837, 2004.

ALEKSHUN, M. N.; LEVY, S. B. Molecular mechanisms of antibacterial multidrug resistance. **Cell**, v. 128, p. 1037-50, 2007.

ALLAKER, R. P.; WHITLOCK, M.; LLOYD, D. H. Cytotoxic activity of *Staphylococcus hyicus*. **Veterinary Microbiology**, v. 26, p. 161-166, 1991.

ANDRESEN, L. O.; AHRENS, P. A multiplex PCR for detection of genes encoding exfoliative toxins from *Staphylococcus hyicus*. **Journal of Applied Microbiology**, v. 96, p. 1265-1270, 2004.

ANDRESEN, L. O.; AHRENS, P.; DAUGAARD, L.; BILLE-HANSEN, V. Exudative epidermitis in pigs caused by toxigenic *Staphylococcus chromogenes*. **Veterinary Microbiology**, v. 105, p. 291-300, 2005.

ANDRESEN, L. O.; BILLE-HANSEN, V.; WEGENER, H. C. *Staphylococcus hyicus* exfoliative toxin: purification and demonstration of antigenic diversity among toxins from virulent strains. **Microbial Pathogenesis**, v. 22, p. 113-122, 1997.

ANDRESEN, L. O. Development and evaluation of an indirect ELISA for detection of exfoliative toxin ExhA, ExhB or ExhC produced by *Staphylococcus hyicus*. **Veterinary Microbiology**, v. 68, p. 285-292, 1999.

ANDRESEN, L. O. Differentiation and distribution of three types of exfoliative toxin produced by *Staphylococcus hyicus* from pigs with exudative epidermitis. **Immunology and Medical Microbiology**, v. 20, p. 301-310, 1998.

ANDRESEN, L. O. Production of exfoliative toxin by isolates of *Staphylococcus hyicus* from different countries. **The Veterinary Record**, v. 157, p. 376-378, 2005.

ANDRESEN, L. O.; WEGENER, H. C.; BILLE-HANSEN, V. Isolation and characterization of a *Staphylococcus hyicus* toxin that causes exfoliation of the skin in exudative epidermitis in piglets. In: 12th International Pig Veterinary Society Congress. **Proceedings...** The Netherlands, p. 239, 1992.

ANDRESEN, L. O.; WEGENER, C. H.; BILLE-HANSEN, V. *Staphylococcus hyicus*-skin reactions in piglets caused by crude extracellular products and by partially purified exfoliative toxin. **Microbial Pathogenesis**, v. 15, p. 217-225, 1993.

ANDREWS, J. J. Ulcerative glossitis and stomatitis associated with exudative epidermitis in suckling swine. **Veterinary Pathology**, v. 16, p. 432-437, 1979.

ANGULO, F. J.; NARGUND, V. N.; CHILLER, T. C. Evidence of an association between use of anti-microbial agents in food animals and anti-microbial resistance among bacteria isolated from humans and the human health consequences of such resistance. **Journal of Veterinary Medicine**, v. 51, p. 374-379, 2004.

BAIRD-PARKER, A. C. The classification of staphylococci and micrococci from world-wide sources. **Journal of General Microbiology**, v. 38, p. 363-387, 1965.

BARBOSA, T. M.; LEVY, S. B. The impact of antibiotic use on resistance development and persistence. **Drug Resistance Updates**, v. 3, p. 303-311, 2000.

BARCELLOS, D. E. S. N.; ALBERTON, G. C.; SOBESTIANSKY, J.; DONIN, D. G.; CARVALHO, L. F. O. S.; MORÉS, N. Doenças da pele. In: SOBESTIANSKY, J.; BARCELLOS, D. E. S. N. (Eds.). **Doenças dos Suínos**. Goiania: Canone Editorial, p. 475-478, 2012a.

BARCELLOS, D. E. S. N.; BOROWSKI, S. M.; STEPAN, A. L.; RODRIGUES, N. C. Epidermite exsudativa em reprodutoras suínas. **Pesquisa Agropecuária Gaúcha**, v. 4, p. 15-17, 1998.

BARCELLOS D. E. S. N.; OLIVEIRA, S. J.; BOROWSKI, S. M. Epidermite exsudativa dos suínos: pesquisa de portadores do *Staphylococcus hyicus* no Rio Grande do Sul. **Arquivos Brasileiros de Veterinária e Zootecnia**, v. 36, p. 533-537, 1984.

BARCELLOS, D. E. S. N.; PIFFER, I. A.; SÁ e SILVA, A. Epidermite exsudativa dos suínos: isolamento do *Staphylococcus hyicus* e reprodução experimental da doença. **Boletim do Instituto de Pesquisas Veterinárias "Desidério Finamor"**, v. 3, p. 133-138, 1975.

BARCELLOS, D. E. S. N.; SOBESTIANSKY, J.; LINHARES, D.; SOBESTIANSKY, T. B. Uso de antimicrobianos. In: SOBESTIANSKY, J.; BARCELLOS, D. E. S. N. (Eds.) **Doenças dos Suínos**. Goiania: Canone Editorial, p. 855-871, 2012b.



BARCELLOS, D. E. S. N.; SOBESTIANSKY, J.; SOBESTIANSKY, T. P. Uso de antimicrobianos na suinocultura. In: SOBESTIANSKY, J.; BARCELLOS, D. E. S. N. (Eds.). **Doenças dos Suínos**. Goiânia: Canone editorial, p. 683-718, 2007.

BARCELLOS, D. E. S. N.; SOBESTIANSKY, J. **Uso de antimicrobianos na suinocultura**. Goiânia: Canone Editorial, p. 11-50, 1998.

BENNETT, P. M.; CHOPRA, I. Molecular basis of 3-lactamase induction in bacteria. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 37, p. 153-158, 1993.

BJÖRKLUND, C. **Prevalence of toxin-producing strains and antimicrobial resistance in isolates of *Staphylococcus hyicus* from pigs with exudative epidermitis and from healthy pigs**. 2011. 13p. Självständigt arbete i veterinärmedicin (Trabalho independente em medicina veterinária, em sueco) – Swedish University of Agricultural Science - Uppsalla, Suécia, 2011.

BLOOD, D. C.; JUBB, K. V. Exudative epidermitis in pigs. **The Australian Veterinary Journal**, v. 1, p. 126-127, 1957.

BRASIL. Instrução Normativa MAA 9/2003. **Proíbe a fabricação, a importação e a comercialização de cloranfenicol, de nitrofuranos e de produtos que contenham estes princípios ativos, para uso em preparação de insumos utilizados na pecuária nacional**. Disponível em: [www.agricultura.gov.br](http://www.agricultura.gov.br). 2003.

BUTAYE, P.; CLOECKAERT, A.; SCHWARZ, S. Mobile genes coding for efflux-mediated antimicrobial resistance in Gram-positive and Gram-negative bacteria. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 22, p. 205-210, 2003.

CAIN, C. L. Antimicrobial resistance in staphylococci in small animals. **Veterinary Clinic of Small Animals**, v. 43, p. 19-40, 2013.

CARVALHO, L. F. O. S.; MORENO, A. M.; SOBESTIANSKY, J.; BARCELLOS, D. E. S. N. Epidermite exsudativa. In: SOBESTIANSKY, J.; BARCELLOS, D. E. S. N. (Eds.). **Doenças dos Suínos**. Goiânia: Canone editorial, p. 395-399, 2007.

CASANOVA, C.; ISELIN, L.; STEIGER, N.; DROZ, S.; SEND, P. *Staphylococcus hyicus* bacteremia in a farmer. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 49, p. 4377-4378, 2011.

CHEN, S.; WANG, Y.; CHEN, F.; YANG, M.; GAN, M.; ZHENG, S. J. Highly pathogenic strain of *Staphylococcus sciuri* caused fatal exudative epidermitis in piglets. **PLoS ONE**, v. 2, p. 1-2, 2007.

CHEVILLE, N. F.; TAPPE, J.; ACKERMANN, M.; JENSEN, A. Acute fibrinopurulent blepharitis and conjunctivitis associated with *Staphylococcus hyicus*, *Escherichia coli*, and *Streptococcus sp.* in chickens and turkeys. **Veterinary Pathology**, v. 25, p. 369-375, 1988.

CLSI, Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance standards for antimicrobial disk and dilution susceptibility tests for bacteria isolated from animals. Approved Standard – 3. ed. **CLSI/NCCLS document M31-A3**. CLSI, Wayne, 2008.

CHANDER, Y.; OLIVEIRA, S.; GOYAL, S. M. Characterisation of ceftiofur resistance in swine bacterial pathogens. **The Veterinary Journal**, v. 187, p. 139-141, 2011.

CORREA, F. R.; FREITAS, A.; PUIGNAU, M. V. R. Exudative epidermitis of pigs: isolation and pathogenicity of the causal agent. In: 4th International Pig Veterinary Society Congress. **Proceedings...** Iowa, p. 2, 1976.

DEVRIESE, L. A.; DEKESEL, A. Successful treatment of a case of osteomyelitis caused by *Staphylococcus hyicus* in a heifer. **Vlaams Diergeneesk Tijdschr**, v. 51, p. 222-225, 1982.

DEVRIESE, L. A. Isolation and identification of *Staphylococcus hyicus*. **American Journal of Veterinary Research**, v. 38, p. 787-792, 1977.

DEVRIESE, L. A. Sensitivity of staphylococci from farm animals to antibacterial agents used for growth promotion and therapy: a ten year study. **Annales de Recherches Vétérinaires**, v. 11, p. 399-408, 1980.

DEVRIESE, L. A.; SCHLEIFER, K. H.; ADEGOKE, G. O. Identification of coagulase-negative staphylococci from farm animals. **The Journal of Applied Bacteriology**, v. 58, p. 45-55, 1985.

DEVRIESE, L. A.; VLAMINCK, K.; NUYTTEN, J.; DE KEERSMAECKER, P. *Staphylococcus hyicus* in skin lesions of horses. **Equine Veterinary Journal**, v. 15, p. 263-5, 1983.

DOSTER, A. R. Skin diseases of swine. Diagnostic Notes. **Swine Health and Production**, v. 3, p. 256, 1995.

DUNKAN, M.; SMITH, D. Isolation of *Staphylococcus hyicus* from aborted piglets. **Canadian Veterinary Journal**, v. 33, p. 75-76, 1992.

DZIDIC, S.; SUSKOVIC, J.; KOS, B. Antibiotic resistance mechanisms in bacteria: biochemical and genetic aspects **Food Technology and Biotechnology**, v. 46, p. 11-21, 2008.

FOSTER, A. P. Staphylococcal skin disease in livestock. **Veterinary Dermatology**, v. 23, p. 342-63, 2012.

FRIENDSHIP, R. M.; PRESCOTT, J. F. Drug therapy and prophylaxis. In: STRAW, B. E.; ZIMMERMAN, J. J.; D'ALLAIRE, S.; TAYLOR, D. J. (Eds.). **Diseases of Swine**. Ames, Iowa: Iowa University Press, p. 1134-1136, 2006.

FUDABA, Y.; NISHIFUJI, K.; ANDRESEN, L. O.; YAMAGUCHI, T.; KOMATSUZAWA, H.; AMAGAI, M.; SUGAI, M. *Staphylococcus hyicus* exfoliative toxins selectively digest porcine desmoglein 1. **Microbial Pathogenesis**, v. 39, p. 171-176, 2005.

FUTAGAWA-SAITO, K.; BA-THEIN, W.; FUKUYASU, T. Antimicrobial susceptibilities of exfoliative toxigenic and non-toxigenic *Staphylococcus hyicus* strains in Japan. **Journal of Veterinary Medicine Science**, v. 71, p. 681-684, 2009.

- FUTAGAWA-SAITO, K.; BA-THEIN, W.; HIGUCHI, T.; SAKURAI, N.; FUKUYASU, T. Nationwide molecular surveillance of exfoliative toxigenic *Staphylococcus hyicus* on pig farms across Japan. **Veterinary Microbiology**, v. 124, p. 370-374, 2007.
- GIANNEECHINI, R.; CONCHA, C.; RIVERO, R.; DELUCCI, I.; LÓPEZ, J. M. Occurrence of clinical and sub-clinical mastitis in dairy herds in the west littoral region in Uruguay. **Acta Veterinaria Scandinavica**, v. 43, p. 221-230, 2002.
- GNANOU, J.C.; SANDERS, P. Antibiotic resistance in bacteria of animal origin: methods in use to monitor resistance in EU countries. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 15, p. 311-322, 2000.
- HAZARIKA, R. A.; MAHANTA, P. N.; DUTTA, G. N.; DEVRIESE, L. A. Cutaneous infection associated with *Staphylococcus hyicus* in cattle. **Research in Veterinary Science**, v. 50, p. 374-5, 1991.
- HILL, B. D.; CORNEY, B. G.; WAGNER, T. M. Importance of *Staphylococcus hyicus* ssp. *hyicus* as a cause of arthritis in pigs up to 12 weeks of age. **Australian Veterinary Journal**, v. 73, p. 179-81, 1996.
- ISAACSON, P. G. Defense mechanisms. In: MCGEE, J. O. D.; ISAACSON, P. G.; WRIGHT, N. A. (Eds.). **Oxford Textbook of Pathology**. New York: Oxford University Press, p. 197-266, 1992.
- JONES, L. D. Exudative epidermitis of pigs. **American Journal of Veterinary Research**, v. 17, p. 179-193, 1956.
- KANBAR, T.; VOYTENKO, A. V.; ALBER, J.; LÄMMLER, C.; WEISS, R.; SKVORTZOV, V. N. Distribution of the putative virulence factor encoding gene *sheta* in *Staphylococcus hyicus* strains of various origins. **Journal of Veterinary Science**, v. 9, p. 327-329, 2008.
- KANBAR, T.; VOYTENKO, A. V.; ALBER, J.; LAMMER, C.; WEISS, R.; ZSCHOCK, M.; SHILOV, I. A.; DMITRENKO, O. A.; GINTBURG, A. L. Prevalence of genes encoding exfoliative toxins among *Staphylococcus hyicus* isolated in Russia and Germany. **Journal of Veterinary Medicine**, v. 53, p. 429-433, 2006.
- KAYE, K. S.; ENGEMANN, J. J.; FRAIMOW, H. S.; ABRUTYN, E. Pathogens resistant to antimicrobial agents: epidemiology, molecular mechanisms, and clinical management. **Infectious Disease Clinics of North America**, v.18, p. 467-511, 2004.
- KEHRENBERG, C.; AARESTRUP, F. M.; SCHWARZ, S. IS21-558 Insertion sequences are involved in the mobility of the multiresistance gene *cfr*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 51, p 483-487, 2007.
- KIM, J.; CHAE, C. Concurrent presence of porcine circovirus type 2 and porcine parvovirus in retrospective cases of exudative epidermitis in pigs. **The Veterinary Journal**, v. 167, p. 104-106, 2004.
- LADHANI, S.; JOANNOU, C. L.; LOCHRIE, D. P.; EVANS, R. W.; POSTON, S. M. Clinical, microbial, and biochemical aspects of the exfoliativetoxins causing

staphylococcal scalded-skin syndrome. **Clinical Microbiology Reviews**, V. 12, p. 224–242, 1999.

LAMBERT, P. A. Bacterial resistance to antibiotics: modified target sites. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 57, p. 1471-1485, 2005.

L'ECUYER, C.; ALEXANDER, D. C. Exudative epidermitis in pigs. Treatment trials. **The Canadian Veterinary Journal**, v. 10, p. 227-233, 1969.

L'ECUYER, C. Exudative epidermitis in pigs. Clinical studies and preliminary transmission trials. **Canadian Journal of Comparative Medicine Veterinary Science**, v. 30, p. 9-16, 1966.

L'ECUYER, C. Exudative epidermitis in pigs. Bacteriological studies on the causative agent *Staphylococcus hyicus*. **Canadian Journal of Comparative Medicine Veterinary Science**, v. 31, p. 243-247, 1967.

LUTHJE, P. L.; SCHWARZ, S. Molecular basis of resistance to macrolides and lincosamides among staphylococci and streptococci from various animal sources collected in the resistance monitoring program BfT-GermVet. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 29, p. 528–535, 2007.

MEBUS, C. A.; UNDERDAHL, N. R.; TWIEHAUS, M. J. Exudative epidermitis: pathogenesis and pathology. **Veterinary Pathology**, v. 5, p. 146-163, 1968.

MEINCKE, W.; WENTZ, I. O eczema umido em suínos. **Suinocultura Industrial**, v. Setembro-Outubro, 1975.

NISHIFUJI, K.; FUDABA, Y.; YAMAGUCHI, T.; IWASAKI, T.; SUGAI, M.; MAGAI, M. Cloning of swine desmoglein 1 and its direct proteolysis by *Staphylococcus hyicus* exfoliative toxins isolated from pigs with exudative epidermitis. **Veterinary Dermatology**, v. 16, p. 315-323, 2005.

NISHIFUJI, K.; SUGAI, M.; AMAGAI, M. Staphylococcal exfoliative toxins: “molecular scissors” of bacteria that attack the cutaneous defense barrier in mammals. **Journal of Dermatological Science**, v. 49, p. 21-31, 2008.

NOBLE, W. C.; RAHMAN, M.; KARADEK, T.; SCHWARZ, S. Gentamicin resistance gene transfer from *Enterococcus faecalis* and *E. faecium* to *Staphylococcus aureus*, *S. intermedius* and *S. hyicus*. **Veterinary Microbiology**, v. 52, p. 143-152, 1996.

ONUMA, K.; UOYA, Y.; KOIDE, T.; SHIBATA, A.; TANABE, T.; SATO, H. Detection of *Staphylococcus hyicus* exfoliative toxin genes by dot blot hybridization and multiplex polymerase chain reaction. **Microbiology Immunology**, v. 55, p. 168-73, 2011.

PARK, J. **Investigation of exudative epidermitis and ear necrosis in pigs**. 2011. 135p. PhD thesis. University of Guelph, Ontario, Canada, 2011.

PENNY, R. H. C.; MUIRHEAD, M. R. Exudative epidermitis. In: LEMAN, A. D.; STRAW, B.; GLOCK, R. D.; MENGELING, W. L.; PENNY, R. H. C.; SCHOLL, E. (Eds.). **Diseases of swine**. Ames, Iowa: Iowa State University Press, p. 87-88, 1986.

PEPPER, T. A.; TAYLOR, D. J. The effect of exudative epidermitis on weaner production in a small pig herd. **Veterinary Record**, v. 101, p. 204-205, 1977.

PHILLIPS, W. E.; KING, R. E.; KLOOS, W. E. Isolation of *Staphylococcus hyicus* subsp. *hyicus* from a pig with septic polyarthrititis. **American Journal of Veterinarian Research**, v. 41, 1980.

PORTUGAL, M. A. S. C.; LOCATELLI, J. C.; SALIBA, A. M.; RODRIGUES, A. J.; CALIL, E. M. B. Epidermite exsudativa dos leitões. **Boletim do Instituto de Pesquisas Veterinárias “Desidério Finamor”**, v. 45, p. 89-96, 1979.

PRESCOTT, J. F.; BAGGOT, J. D.; WALKER, R. D. **Antimicrobial therapy**. Ames, Iowa: Iowa State University Press, p. 27-615, 2000.

QUINN, P. J.; CARTER, M. E.; MARKEY, B.; CARTER, G. R. *Staphylococcus* species. In: **Clinical Veterinary Microbiology**. Edinburgh: Mosby Elsevier, p. 118, 1994.

QUINN, P. J.; MARKEY, B. K.; LEONARD, F. C.; FITZPATRICK, E. S.; FANNING, S.; HARTIGAN, P. J. **Veterinary Microbiology and Microbial Disease**. Iowa: Wiley-blackwell, p. 1231, 2011.

ROBERTS, M. C. Epidemiology of tetracycline-resistance determinants. **Trends in Microbiology**, v. 2, p. 353-7, 1994.

ROBERTS, M. C. Tetracycline resistance determinants: mechanisms of action, regulation of expression, genetic mobility, and distribution. **Microbiology Reviews**, v. 19, p. 1-24, 1996.

ROBERTS, M. C.; SUTCLIFFE, J.; COURVALIN, P.; JENSEN, L. B.; ROOD, J.; SEPPALA, H. Nomenclature for macrolide and macrolide-lincosamide-streptogramin b resistance determinants. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 43, p. 2823-2830, 1999.

SAGA, T.; YAMAGUCHI, K. History of antimicrobial agents and resistant bacteria. **JMAJ**, v. 52, p.103-108, 2009.

SALMON, S. A.; WATTS, J. L.; CASE, C. A.; HOFFMAN, L. J.; WEGENER, H. C.; YANCEY, JR., R. J. Comparison of MICs of ceftiofur and other antimicrobial agents against bacterial pathogens of swine from the United States, Canada, and Denmark. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 33, p. 2435-2444, 1995.

SALYERS, A. S.; WHITT, D. D. **Bacterial Pathogenesis: a molecular approach**. Washington: ASM Press, p. 5, 1994.

SATO, H.; KURAMOTO, M.; TANABE, T.; SAITO, H. Susceptibility of various animals and cultured cells to exfoliative toxin produced by *Staphylococcus hyicus* subsp. *hyicus*. **Veterinary Microbiology**, v. 28, p. 157-169, 1991a.

SATO, H.; TANABE, T.; KURAMOTO, M.; TANAKA, K.; HASHIMOTO, T.; SAITO, H. Isolation of exfoliative toxin from *Staphylococcus hyicus* subsp. *hyicus* and

its exfoliative activity in the piglet. **Veterinary Microbiology**, v. 27, p. 263-275, 1991b.

SATO, H.; WATANABE, T.; HIGUCHI, K.; TERUYA, K.; OHTAKE, A.; MURATA, Y.; SAITO, H.; AIZAWA, C.; DANBARA, H.; MAEHARA, N. N. D. Chromosomal and extrachromosomal synthesis of exfoliative toxin from *Staphylococcus hyicus*. **Journal of Bacteriology**, v. 182, p. 4096-4100, 2000.

SATO, H.; WATANABE, T.; MURATA, Y.; OHTAKE, A.; NAKAMURA, M.; AIZAWA, C.; SAITO, H.; MAEHARA, N. New exfoliative toxin produced by a plasmid-carrying strain of *Staphylococcus hyicus*. **Infection and Immunity**, v. 67, p. 4014-4018, 1999.

SCHEIBER, A. R. Endemic ringworm and *Staphylococcus hyicus* infections: a case report. **Swine Health and Production**, v. 3, p. 165-167, 1995.

SCHMIDT, C. B. Veterinarians on call. **National Hog Farmer**, v. 6, p. 15, 1983.

SCHWARZ, S.; BLOBEL, H. A new streptomycin-resistance plasmid from *Staphylococcus hyicus* and its structural relationship to other staphylococcal resistance plasmids. **Journal of Medical Microbiology**, v. 32, p. 201-205, 1990a.

SCHWARZ, S.; BLOBEL, H. Plasmids and resistance to antimicrobial agents and heavy metals in *Staphylococcus hyicus* from pigs and cattle. **Journal of Veterinary Medicine**, v. 36, p. 669-673, 1989.

SCHWARZ, S.; BLOBEL, H. Isolation and restriction endonuclease analysis of a tetracycline resistance plasmid from *Staphylococcus hyicus*. **Veterinary Microbiology**, v. 24, p. 113-122, 1990b.

SCHWARZ, S.; CARDOSO, M.; BLOBEL, H. Plasmid-mediated chloramphenicol resistance in *Staphylococcus hyicus*. **Journal of General Microbiology**, v. 135, p. 3329-3336, 1989.

SCHWARZ, S.; CARDOSO, C.; WEGENER, H. C. Nucleotide sequence and phylogeny of the *tet(L)* tetracycline resistance determinant encoded by plasmid pSTE1 from *Staphylococcus hyicus*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 6, p. 580-588, 1992.

SCHWARZ, S.; CHASLUS-DANCLA, E. Use of antimicrobials in veterinary medicine and mechanisms of resistance. **Veterinary Research**, v. 32, p. 201-225, 2001.

SCHWARZ, S. Emerging chloramphenicol resistance in *Staphylococcus lentus* from mink following chloramphenicol treatment: characterization of the resistance genes. **Veterinary Microbiology**, v. 41, p. 51-61, 1994.

SCHWARZ, S.; KEHRENBERG, C.; DOUBLET, B.; CLOECKAERT, A. Molecular basis of bacterial resistance to chloramphenicol and florfenicol. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 28, p. 519-542, 2004.

- SCHWARZ, S.; LANGE, C.; WERCKENTHIN, C. Molecular analysis of the macrolide-lincosamide resistance gene region of a novel plasmid from *Staphylococcus hyicus*. **Journal of Medical Microbiology**, v. 47, p. 63-70, 1998a.
- SCHWARZ, S., NOBLE, W. C.: Structure and putative origin of a plasmid from *Staphylococcus hyicus* that mediates chloramphenicol and streptomycin resistance. **Letters of Applied Microbiology**, v. 18, p. 281-284, 1994.
- SCHWARZ, S.; ROBERTS, M. C.; WERCKENTHIN, C.; PANG, Y.; LANGE, C. Tetracycline resistance in *Staphylococcus* spp. from domestic animals. **Veterinary Microbiology**, v. 63, p. 217-227, 1998b.
- SCHWARZ, S.; SILLEY, P.; SIMJEE, S.; WOODFORD, N.; VAN DUIJKEREN, E.; JOHNSON, A. P.; GAASTRA, W. Editorial: Assessing the antimicrobial susceptibility of bacteria obtained from animals. **Veterinary Microbiology**, v. 141, p. 1-4, 2010.
- SIMEONI, D.; RIZZOTTI, L.; COCCONCELLI, P.; GAZZOLAB, S.; DELLAGLIOA, F. TORRIANI, S. Antibiotic resistance genes and identification of staphylococci collected from the production chain of swine meat commodities. **Food Microbiology**, v. 25, p. 196-201, 2008.
- SKOV-JENSEN, E. W.; WEGENER, H. C. A longitudinal study of *Staphylococcus hyicus* colonization of vagina of gilts and transmission to piglets. In: 12th International Pig Veterinary Society Congress. **Proceedings...**The Netherlands, p. 2, 1992.
- SOMPOLINSKY, D. De l'impetigo contagiosa suis et du *Micrococcus hyicus* n. sp. **Schweiz. Arch. Tierhilk**, v. 95, p. 302-309, 1953.
- SOBESTIANSKY, J.; MORES, N.; MORI, A. Epidermite exsudativa associada a deficiência de zinco em leitões de crescimento. **Comunicado Técnico Embrapa Suínos e Aves**, v. 144, p. 1-3, 1989.
- SPINDOLA, J. Die Krankheiten der Schweine. **Verlag Hirschwald**. Berlin, 1842. Original não disponível.
- STREILEIN, J. W. Skin associated lymphoid tissue. In: Norris, D. A. **Immune Mechanisms in Cutaneous Disease**. New York: Marcel Dekker Inc, p. 73-94, 1989.
- SWITALSKY, L. M.; RYDÉN, C.; RUBIN, K.; LJUNGH, A.; HÖÖK, M.; WADSTRÖM, T. Binding of fibronectin to *Staphylococcus* strains. **Infection and Immunity**, v. 42, p. 628-633, 1983.
- TAKEUCHI, S.; KOBAYASHI, Y.; MORI, Y. Assay of protein A in *Staphylococcus hyicus* subsp. *hyicus* by ELISA and immunoelectron microscopy. **Veterinary Microbiology**, v. 25, p. 297-302, 1990.
- TAKEUCHI, S.; KOBAYASHI, Y.; MOROSUMI, T.; MORI, Y. Protein A in *Staphylococcus hyicus* subsp. *hyicus* isolated from pigs, chickens and cows. **Japanese Journal of Veterinary Science**, v. 50, p. 153-157, 1988.

TAKEUCHI, S.; KOBAYASHI, Y.; MOROSUMI, T. Proteolytic zymograms of *Staphylococcus hyicus* subsp. *hyicus* isolated from pigs, chickens and cows. **Veterinary Microbiology**, v. 14, p. 47-52, 1987.

TAKEUCHI, S.; MURASE, K.; KAIDOH, T.; MAEDA, T. A metalloprotease is common to swine, avian and bovine isolates of *Staphylococcus hyicus*. **Veterinary Microbiology**, v. 71, p. 169-174, 2000.

TANABE, T.; SATO, H.; WATANABE, K.; HIRANO, M.; HIROSE, K.; KUROKAWA, S.; NAKANO, K.; SAITO, H.; MAEHARA, N. Correlation between occurrence of exudative epidermitis and exfoliative toxin-producing ability of *Staphylococcus hyicus*. **Veterinary Microbiology**, v. 48, p. 9-17, 1996.

TENOVER, F. C. Mechanisms of antimicrobial resistance in bacteria. **The American Journal of Medicine**, v. 119, p. 3-10, 2006.

TERANISHI, H.; SHIMIZU, A.; KAWANO, J.; KIMURA, S. Antibiotic resistance of *Staphylococcus hyicus* subsp. *hyicus* strains isolated from pigs, cattle and chickens. **Japanese Journal of Veterinary Science**, v. 49, p. 427-432, 1987.

TOKURA, Y.; YAGI, J.; O'MALLEY, M.; LEWIS, J.; TAKIGAWA, M.; EDELSON, R.; TIGELAAR, R. E. Superantigenic staphylococcal exotoxins induce T cell proliferation in the presence of Langerhan cells or class II-bearing keratinocytes to produce T cell activating cytokines. **Investigative Dermatology**, v. 102, p. 31-38, 1994.

TOLLEFSON, L.; KARP, B. E. Human health impact from antimicrobial use in food animals. **Médecine et maladies infectieuses**, v. 34, p. 514-521, 2004.

UNDERDAHL, N. R.; GRACE, O. D.; YOUNG, G. A. Experimental transmission of exudative epidermitis of pigs. **Journal of American Veterinary Medicine A**, v. 142, p. 754-762, 1963.

UNDERDAHL, N. R.; TWIEHAUS, M. J. Exudative Epidermitis. In: DUNNE, H. W.; LEMAN, A. D. **Diseases of swine**. Ames, Iowa: Iowa State University Press, p. 965-969, 1975.

VALLE, J.; PIRIZ, S.; DE LA FUENTE, R.; VADILLO, S. Staphylococci isolated from healthy goats. **Zentralbl Veterinarmed**, v. 38, p. 81-9, 1991 .

WEGENER, H. C.; ANDRESEN, L. O.; BILLE-HANSEN, V. *Staphylococcus hyicus* virulence in relation to exudative epidermitis in pigs. **Canadian Journal of Veterinary Research**, v. 57, p. 119-125, 1993.

WEGENER, H. C. Development of a phage typing system for *Staphylococcus hyicus*. **Research in Microbiology**, v. 144, p. 237-244, 1993a.

WEGENER, H. C. Diagnostic value of phage typing, antibiogram typing and plasmid profiling of *Staphylococcus hyicus* from piglets with exudative epidermitis. **Journal of Veterinary Medicine**, v. 40, p. 13-20, 1993b.



WEGENER, H. C.; SCHWARZ, S. Antibiotic resistance and plasmids in *Staphylococcus hyicus* isolated from pigs with exudative epidermitis and from healthy pigs. **Veterinary Microbiology**, v. 35, p. 363-372, 1993.

WEGENER, H. C.; SKOV-JENSEN, E. W. A longitudinal study of *Staphylococcus hyicus* colonization of vagina of gilts and transmission to piglets. **Epidemiology and Infection**, v. 109, p. 433-444, 1992.

WEGENER, H. C.; SKOV-JENSEN, E. W. Exudative epidermitis. In: STRAW, B. E.; D'ALLAIRE, S.; MENGELING, W. L.; TAYLOR D. J. (Eds.). **Diseases of Swine**. Ames, Iowa: Iowa University Press, p. 469-474, 1999.

WEGENER, H. C.; SKOV-JENSEN, E. W. Exudative epidermitis. In: STRAW, B. E.; ZIMMERMAN, J. J.; D'ALLAIRE, S.; TAYLOR, D. J. **Diseases of Swine**. Ames, Iowa: Iowa University Press, p. 675-679. 2006.

WEGENER, H. C. ***Staphylococcus hyicus* Epidemiology and Virulence in Relation to Exudative Epidermitis in Pigs**. Ph.D. Thesis. National Veterinary Laboratory and Royal Veterinary Agricultural University, Denmark, 1992a.

WEGENER, H. C. Typing of *Staphylococcus hyicus* strains for diagnosis and epidemiological investigation of exudative epidermitis in piglets. In: 12th International Pig Veterinary Society Congress. **Proceedings...**The Netherlands, p. 330, 1992b.

WEGENER, H. C.; WATTS, J. L.; SALMON, S. A.; YANCEY, R. J. Antimicrobial susceptibility of *Staphylococcus hyicus* isolated from exudative epidermitis in pigs. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 32, p. 793-795, 1994.

WERCKENTHIN, C.; CARDOSO, M.; MARTEL, J. L.; SCHWARZ, S. Antimicrobial resistance in staphylococci from animals with particular reference to bovine *Staphylococcus aureus*, porcine *Staphylococcus hyicus*, and canine *Staphylococcus intermedius*. **Veterinary Research**, v. 32, p. 341-362, 2001.

YOSHIDA, K.; ICHIMAN, Y.; UMEDA, A.; TAKEUCHI, S. Demonstration of capsule in a strain of *Staphylococcus hyicus* by an electron microscope. **Journal of Applied Bacteriology**, v.64, p. 483-6, 1988.