

Universidade Federal de Minas Gerais

Escola de Veterinária

Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal

Isolamento e caracterização de *Staphylococcus* spp em cães com diferentes enfermidades atendidos em Belo Horizonte, Minas Gerais

Flávia Mello Viegas

Belo Horizonte

2022

Flávia Mello Viegas

Isolamento e caracterização de *Staphylococcus* spp em cães com diferentes enfermidades atendidos em Belo Horizonte, Minas Gerais

Dissertação apresentada ao Colegiado de Pós-Graduação em Ciência Animal na Escola de Veterinária da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Ciência Animal.

Área: Medicina Veterinária Preventiva

Orientador: Prof. Dr. Rodrigo Otávio Silveira Silva

Coorientador: Prof. Dr. Carlos Augusto de Oliveira Júnior

Belo Horizonte

2022

V656i

Viegas, Flávia Mello, 1995-

Isolamento e caracterização de *Staphylococcus spp.* em cães com diferentes enfermidades atendidos em Belo Horizonte, Minas Gerais / Flávia Mello Viegas.- 2022.
80.:il.

Orientador: Rodrigo Otávio Silveira Silva

Coorientador: Carlos Augusto de Oliveira Junior

Dissertação (Mestrado) apresentada à Escola de Veterinária da Universidade Federal de Minas Gerais para obtenção do título de Mestre em Ciência animal.

Bibliografia: f. 59 a 68.

1. Cão - Doenças - Teses – 2. Staphylococcus - Teses -3. Veterinária - Teses – I. Silva, Rodrigo Otávio Silveira – II. Oliveira Júnior, Carlos Augusto - II. Universidade Federal de Minas Gerais, Escola de Veterinária - IV. Título.

CDD – 636.089



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
ESCOLA DE VETERINÁRIA
COLEGIADO DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL

FOLHA DE APROVAÇÃO

FLÁVIA MELLO VIEGAS

Dissertação submetida à banca examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em CIÊNCIA ANIMAL, como requisito para obtenção do grau de MESTRE em CIÊNCIA ANIMAL, área de concentração Medicina Veterinária Preventiva.

Aprovado(a) em 25 de fevereiro de 2022, pela banca constituída pelos membros:

Dr.(a). Rodrigo Otavio Silveira Silva - Presidente - Orientador(a)

Dr.(a). Guilherme Guerra Alves

Dr.(a). Larissa Silveira Botoni



Documento assinado eletronicamente por **Rodrigo Otavio Silveira Silva, Professor do Magistério Superior**, em 25/02/2022, às 16:50, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Guilherme Guerra Alves, Usuário Externo**, em 26/02/2022, às 16:51, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Larissa Silveira Botoni de Andrade, Usuário Externo**, em 07/03/2022, às 20:41, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site https://sei.ufmg.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador **1266043** e o código CRC **6407663E**.

Dedico este trabalho aos pesquisadores brasileiros que, em tempos tão obscuros, ainda buscam perseverar e contribuir com o desenvolvimento da ciência.

AGRADECIMENTOS

Agradeço aos meus pais e ao meu irmão, que, além de me fornecerem tudo que sempre precisei para crescer, ainda se adaptaram à minha rotina, para que pudessem me proporcionar todo o suporte e apoio necessários para minha caminhada até aqui. O que sou hoje devo muito a vocês.

Ao Henrique, que esteve sempre ao meu lado, dando amor, carinho e cuidado. Que me incentivou a dar cada passo dessa trajetória e me acolheu quando precisei de pausa. Você com certeza é o melhor companheiro que alguém pode desejar.

Agradeço aos professores Rodrigo e Francisco, que me acolheram e orientaram por todos esses anos, sendo de extrema importância para meu crescimento profissional e pessoal. Ao Laboratório de Anaeróbios / Bacterioses e Pesquisa, por tornar possível a realização deste trabalho, que espero poder contribuir um pouco mais com a construção do conhecimento científico na veterinária.

Aos amigos e colegas de laboratório Carolina, Amanda, Brendhal, Jordana, Rafael, Gabriela, Diogo, Isabella, Rafaella, Giulia e Isadora, pela parceria e por tornarem o trabalho diário tão prazeroso.

Aos amigos, em especial Rossana, Thalita, Raíssa, Gustavo Canesso e Gustavo Xaulim, que, mesmo de longe, se fizeram presente e me deram apoio por todo esse tempo.

Ao Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal, cuja excelência possibilitou a execução desse e de diversos outros estudos, graças à grande dedicação de seus coordenadores e funcionários.

Às instituições de apoio e fomento à pesquisa, CNPq, CAPES, FAPEMIG e PRPq, por possibilitarem a realização dos experimentos.

Por fim, mas não menos importante, agradeço imensamente à banca examinadora por aceitar o convite para participar da avaliação do presente trabalho.

“Em algum lugar, algo incrível está esperando para ser descoberto”

Carl Sagan

RESUMO

O gênero *Staphylococcus* apresenta grande relevância para a medicina humana e medicina veterinária, sendo composto por mais de 40 espécies. Pode ser encontrado como parte da microbiota natural de animais e humanos, mas também como agente oportunista em processos infecciosos. Entre as espécies encontradas em cães, destaca-se *S. pseudintermedius* – uma importante bactéria comensal da pele e mucosas, que também pode ser responsável por infecções clínicas como piodermites, otites e infecções de sítio cirúrgico (SSIs). O surgimento de estirpes de *S. pseudintermedius* resistentes à meticilina (MRSP) tornou-se um problema de importante de saúde pública, uma vez que estas são multirresistentes e podem infectar também seres humanos. O objetivo deste estudo foi identificar e caracterizar estirpes de *S. pseudintermedius* isoladas de diferentes sítios infecciosos em cães quanto à sua diversidade genética e resistência a antimicrobianos de uso em medicina humana e medicina veterinária. As amostras foram obtidas em duas clínicas veterinárias diferentes de Belo Horizonte; colônias sugestivas foram identificadas por MALDI-TOF e confirmadas por PCR ou sequenciamento dos genes *16S rRNA* ou *rpoB*. Foi realizado teste de susceptibilidade antimicrobiana e detecção por PCR do gene *mecA* em todas as amostras. Os isolados de MRSP foram submetidos ainda à técnica de *multilocus sequence typing*. Cerca de 74,8% dos isolados clínicos eram *S. pseudintermedius*. Multirresistência (MDR) foi observada em 63,2% dos isolados de *S. pseudintermedius* e cerca de 24,5% foram MRSP. Metade dos isolados MRSP foi encontrado em SSIs. Entre os dez *sequence types* (ST) identificados, nove foram identificados pela primeira vez na literatura. O complexo clonal (CC) 71 foi o CC mais frequente e foi associado à resistência a fluorquinolonas. Tratamento antimicrobiano prévio, hospitalização e SSIs foram identificados como fatores de risco para aquisição da MRSP. O presente trabalho confirmou que *S. pseudintermedius* é a principal espécie de estafilocócica isolada em partir de cachorros infectados em Belo Horizonte, além de identificar uma alta taxa de estirpes MDR. SSIs foram responsáveis pela maior taxa de estirpes MRSP. Além disso, este é o primeiro que investigou a estrutura populacional de MRSP em Minas Gerais, revelando a dispersão de um CC bem consolidado, além de novas linhagens. Os resultados encontrados são de relevância para a saúde pública, uma vez que a bactéria apresenta importante potencial zoonótico e as opções terapêuticas disponíveis são limitadas.

Palavras-chave: MRSP, MLST, ST71, infecções de sítio cirúrgico.

ABSTRACT

Staphylococcus pseudintermedius is a major commensal bacterium of the skin and mucosae of dogs and an opportunistic agent responsible for several clinical infections, such as pyoderma, otitis, and surgical wound infections. The emergence of methicillin-resistant *S. pseudintermedius* (MRSP) has become a problem of great concern in veterinary and human medicine because it is multidrug resistant (MDR) and can also infect humans. This study aimed to identify the occurrence of *S. pseudintermedius* strains in infected patients and investigate the antimicrobial resistance profiles and molecular structure of MRSP isolates. Samples were obtained from two different veterinary clinics; suggestive colonies were submitted to matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight (MALDI-ToF) mass spectrometry and confirmed at the species level by polymerase chain reaction (PCR) or sequencing of the 16S rRNA and *rpoB* genes. Antimicrobial susceptibility and PCR detection of *mecA* were performed. MRSP isolates were subjected to multilocus sequence typing. Of all the clinical staphylococci (n=131), 98 (74.8%) were identified as *S. pseudintermedius*. Multidrug resistance (resistance to ≥ 3 classes of antimicrobials) was observed in 63.2% of *S. pseudintermedius* isolates, and 24.5% of *S. pseudintermedius* isolates were MRSP. Half of the MRSP isolates were isolated from surgical site infections. Among the ten sequence types (ST) identified, nine were novel. ST71 was the most prevalent and associated with resistance to fluoroquinolones. Prior antimicrobial therapy, hospitalization, and surgical site infections seemed to be risk factors for MRSP acquisition. The present study showed a high rate of MDR staphylococci in infected dogs. MRSP was isolated from different clinical conditions, mainly surgical site infections. Additionally, this is the first study to extensively investigate the population structure of MRSP in Minas Gerais, which revealed the dispersion of CC71 and nine novel STs. These findings raise concerns for both animal and human health due to the zoonotic potential of this species and limited therapeutic options available for MRSP infections.

Keywords: MRSP, MLST, ST71, surgical site infections

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Prevalência média reportada por diversos estudos de <i>S. pseudintermedius</i> em diferentes sítios anatômicos de cães saudáveis. Imagem adaptada de Bannoehr e Guardabassi, 2012.	21
Figura 2 – Taxas média de isolamento de <i>S. pseudintermedius</i> e MRSP de diferentes sítios infecciosos em cães. Imagem adaptada de Lynch e Helbig, 2021.	24
Figura 3 – Estrutura populacional de <i>Staphylococcus pseudintermedius</i> mediante análise eBURST. Os complexos clonais de maior relevância são indicados em azul e amarelo. Imagem adaptada de Pires dos Santos et al., 2016.	30
Figura 4 – Fluxograma de etapas de processamento realizadas durante o estudo. Em caixas retangulares têm-se os processos, enquanto losangos indicam os isolados.	36
Figura 5 – Distribuição e proporção de espécies de estafilococos isoladas em diferentes sítios infecciosos de 116 cães atendidos em duas diferentes clínicas veterinárias de Belo Horizonte, entre 2017 e 2020.	44
Figura 6 – Resistência antimicrobiana entre isolados clínicos de <i>S. pseudintermedius</i> obtidos de cães atendidos em duas diferentes clínicas de Belo Horizonte, entre 2017 e 2020. a) Prevalência de acordo com o antimicrobiano; b) de acordo com o tipo de infecção.	47
Figura 7 – Porcentagem de isolados SIG de acordo com o número de classes antimicrobianas resistentes.	48
Figura 8 – Prevalência de resistência antimicrobiana entre isolados clínicos não-SIG obtidos de cães doentes atendidos em duas diferentes clínicas de Belo Horizonte, entre 2017 e 2020.	49
Figura 9 – Relação genética de estirpes MRSP de cães de Belo Horizonte (2017-2020). a) Snapshot da população de STs encontrados no presente estudo, utilizando-se a análise goeBURST full MST. Linhas e sombras indicam o número de variações alélicas entre os STs, e cores indicam o tipo de infecção relacionado a cada ST. b) Uma árvore filogenética baseada no alinhamento da sequência concatenada dos genes do MLST foi inferida utilizando-se o programa iqTree; probabilidades posteriores são mostradas em vermelho. Colunas com símbolos de triângulos, círculo e estrela indicam a apresentação clínica relacionada a cada isolado; colunas de quadrados coloridos indicam presença ou ausência de resistência a antimicrobianos de diferentes classes de não-beta-lactâmicos.	51
Figura 10 – Snapshot da população de <i>S. pseudintermedius</i> considerando-se variação de apenas um locus. A cor azul representa strain types de todo o mundo já encontrados e depositados no banco de dados do PubMLST e vermelho indica os STs MRSP identificados no presente estudo; a) Estrutura populacional principal de <i>S. pseudintermedius</i> . Clusters de isolados ligados indicam complexos clonais (CCs); singletons não demonstrados na figura. Caixas cinzas indicam a localizam dos STs identificados neste estudo. b) Snapshot do CC2166, ST2124 em vermelho. c) Snapshot do CC1758, com STs 2129 and 2164 em vermelho. d) Snapshot do CC781 e adjacentes, com STs 2125, 2126, 2127, 2128 e 2131 em vermelho. e) Snapshot do CC71 com STs 71 e 2130 em vermelho.	52
Figura 11 – Certidão de cadastro de isolados de <i>Staphylococcus</i> sp. no SISGEN.	80

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Sequência de iniciadores utilizados para identificação de espécies do grupo SIG, tamanho do produto amplificado e referência utilizada.	37
Tabela 2 - Sequência de iniciadores utilizados para identificação de espécies do grupo SIG, tamanho do produto amplificado e referência utilizada.	39
Tabela 3 - Iniciadores utilizados para amplificação dos sete genes de estirpes MRSP no MLST, tamanho do produto amplificado (pb) e referência utilizada.....	40
Tabela 4 - Distribuição e proporção de espécies de estafilococos isoladas em diferentes sítios infecciosos de 116 cães atendidos em duas diferentes clínicas veterinárias de Belo Horizonte, entre 2017 e 2020.	43
Tabela 5 – Perfil de resistência antimicrobiana de estafilococos isolados de cães atendidos em duas diferentes clínicas de Belo Horizonte, entre 2017 e 2020.....	45
Tabela 6 - Perfil de resistência antimicrobiana das estirpes MRSP de acordo com os STs e locais de infecção.....	50
Tabela 7 - Relação de isolados de cães incluídos no estudo, de acordo com idade, sexo, raça, sítio de infecção, ano e local de coleta.	69
Tabela 8 - Identificação das espécies dos isolados do SIG, de acordo com as técnicas de MALDI-TOF, PCR, sequenciamento do gene 16S rRNA e sequenciamento do gene rpoB. ..	74
Tabela 9 - Identificação das espécies dos isolados não-SIG, de acordo com as técnicas de MALDI-TOF, PCR, sequenciamento do gene 16S rRNA e sequenciamento do gene rpoB. ..	78

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

°C	Graus Celsius
AMR	Resistência antimicrobiana
CC	Complexo clonal
CFO	Cefoxitina
CIP	Ciprofloxacina
CLI	Clindamicina
CLO	Cloranfenicol
CLSI	Clinical and Laboratory Standards Institute
CoNS	Estafilococos coagulase negativo
CoPS	Estafilococos coagulase positivo
DNA	Ácido desoxirribonucleico
eBURST	Based Upon Related Sequence <i>Types</i>
ERI	Eritromicina
EUCAST	European Committee on Antimicrobial Suceptibility Testing
GEN	Gentamicina
HV-UFGM	Hospital Veterinário da Universidade Federal de Minas Gerais
IC	Intervalo de confiança
ITU	Infecção de trato urinário
L	Litro
MALDI-TOF	Espectrometria de massas por meio de ionização por dessorção a laser assistida por matriz
MDR	Multirresistência antimicrobiana
mg	Miligramas
MGE	Elemento genético móvel
MH	Müller-Hinton
mm	Milímetros
MLST	Multilocus sequence typing
MRS	<i>Staphylococcus</i> resistente à meticilina
MRSA	<i>Staphylococcus aureus</i> resistente à meticilina
MRSP	<i>Staphylococcus pseudintermedius</i> resistente à meticilina
MS	Manitol salgado
MSSP	<i>Staphylococcus pseudintermedius</i> suscetível à meticilina
nBLAST	<i>Nucleotide Basic Local Aligment Search Tool</i>
NCBI	<i>National Center for Biotechnology Information</i>
NIT	Nitrofurantoína
OIE	Organização Mundial de Saúde Animal
OMS	Organização Mundial da Saúde
OR	Razão de chances
OXA	Oxacilina
PCR	Reação em cadeia da polimerase
PEN	Penicilina
RIF	Rifampicina
rRNA	Ácido ribonucleico ribossômico
SCCmec	Cassete cromossômico estafilocócico mec
SIG	Grupo <i>Staphylococcus intermedius</i>
SISGEN	Sistema Nacional de Gestão do Patrimônio Genético e Conhecimento Tradicional Associado
SSI	Infecção de sítio cirúrgico

ST	<i>Sequence type</i>
SXT	Sulfametoxazol/trimetoprima
TET	tetraciclina
UFMG	Universidade Federal de Minas Gerais

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	15
2. OBJETIVOS	16
2.1 Objetivos Gerais	16
2.2 Objetivos específicos	16
3. REVISÃO DE LITERATURA	17
3.1 Gênero <i>Staphylococcus</i>	17
3.1.1 Gênero <i>Staphylococcus</i> em cães	17
3.2 Grupo <i>Staphylococcus intermedius</i>	18
3.2.1 Evolução	18
3.3 <i>Staphylococcus pseudintermedius</i>	20
3.3.1 <i>Staphylococcus pseudintermedius</i> em cães saudáveis	20
3.3.2 Infecções causadas por <i>S. pseudintermedius</i>	22
3.3.3 Patogenicidade e virulência	24
3.3.4 Estirpes multirresistentes	25
3.4 <i>Staphylococcus pseudintermedius</i> resistente à meticilina	26
3.4.1 Epidemiologia	26
3.4.2 Diagnóstico	27
3.4.3 Perfis de resistência antimicrobiana	28
3.5 Diversidade genética	29
3.6 Potencial zoonótico e impacto na saúde pública	31
3.7 Controle e prevenção	32
3.7.1 Tratamento	32
3.7.2 Medidas de prevenção	33
4. MATERIAL E MÉTODO	35
4.1 Amostragem e local de execução	35
4.2 Dados epidemiológicos	37
4.3 Isolamento e identificação	37
4.4 Diferenciação de espécies do SIG	37
4.5 Sequenciamento do gene <i>16S rRNA</i>	38
4.6 Sequenciamento do gene <i>rpoB</i>	38
4.7 Sensibilidade antimicrobiana	39
4.8 Pesquisa de <i>Staphylococcus</i> resistente à meticilina	39
4.9 Caracterização molecular por MLST	40
4.10 Análise estatística	41

5. RESULTADOS	41
5.1 Coleta de dados	41
5.2 Identificação das espécies	42
5.3 Suscetibilidade antimicrobiana	44
5.4 Estafilococos resistente à meticilina	49
5.5 MRSP	49
5.6 Fatores de risco para aquisição de MRSP	53
6. DISCUSSÃO	53
7. CONCLUSÃO	58
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	59
APÊNDICE A	69
APÊNDICE B	74
ANEXO	80

1. INTRODUÇÃO

Os estafilococos são bactérias de grande relevância para a medicina humana e medicina veterinária, sendo o gênero *Staphylococcus* composto por mais de 40 diferentes espécies (Griffeth *et al.*, 2008; Ma *et al.*, 2020). Podem ser encontrados como parte da microbiota natural de animais e seres humanos, mas também atuam como agentes patogênicos oportunistas em processos infecciosos (Morris *et al.*, 2006; Ma *et al.*, 2020). Dentro do gênero, destacam-se os estafilococos coagulase-positivos (CoPS), sobretudo *Staphylococcus aureus*, microrganismo comensal da microbiota cutânea de seres humanos, que está associado a quadros de infecção e intoxicação em diferentes espécies animais (Algammal *et al.*, 2020).

O *Staphylococcus pseudintermedius*, também considerado um CoPS, é um dos principais microrganismos comensais da pele e mucosas de cães e integra o grupo *Staphylococcus intermedius* (SIG) junto com outras três espécies – *S. intermedius*, *S. delphini* e *S. cornubiensis* (Bannoehr e Guardabassi, 2012; Murray *et al.*, 2018). Embora seja comumente encontrado em narinas e ânus de indivíduos saudáveis, *S. pseudintermedius* pode atuar como agente oportunista e causar variados quadros de infecção, de forma análoga ao *S. aureus* em humanos (Bannoehr e Guardabassi, 2012; Gagetti *et al.*, 2019). Essa bactéria é uma das principais causas de piodermite canina, otite, infecções de feridas cirúrgicas e infecções do trato urinário (Weese e van Duijkeren, 2010; Bannoehr e Guardabassi, 2012; Duim *et al.*, 2016; Bergot *et al.*, 2018).

Na última década, a emergência de estirpes de *S. pseudintermedius* resistentes à meticilina (MRSP) tornou-se um problema de grande preocupação para a medicina veterinária, devido à sua capacidade de aquisição de um elemento genético móvel (MGE) denominado cassete cromossômico estafilocócico mec (SCCmec), que abriga o gene *mecA* – gene este capaz de conferir resistência a todos os antimicrobianos beta-lactâmicos (Duim *et al.*, 2016; Wegener *et al.*, 2018; Gagetti *et al.*, 2019; Krapf *et al.*, 2019). Estirpes MRSP são, ainda, comumente resistentes a outras classes de antimicrobianos, como aminoglicosídeos, macrolídeos e fluorquinolonas, o que representa um desafio para as abordagens terapêuticas (van Duijkeren *et al.*, 2011; Kadlec e Schwarz, 2012; Duim *et al.*, 2016; Morris *et al.*, 2017). Ademais, o SCCmec e/ou outros genes de resistência antimicrobiana podem ser transferidos entre diferentes espécies de estafilococos, o que pode levar a um sério problema de saúde pública, especialmente quando envolve MRSP e *S. aureus* resistente à meticilina (MRSA) (van Duijkeren *et al.*, 2011; Pomba *et al.*, 2016; Kang e Hwang, 2021). Semelhante ao MRSP em cães, MRSA é um importante patógeno associado a infecções em humanos, sendo responsável por casos graves de infecção de tecidos moles (Pomba *et al.*, 2016; Morris *et al.*, 2017).

Relatos de casos de humanos colonizados ou infectados por *S. pseudintermedius* aumentaram nos últimos anos – principalmente aqueles causados por cepas MRSP – ainda que este não seja considerado um hospedeiro natural para a espécie (van duijkeren *et al.*, 2011; Guardabassi *et al.*, 2013). Assim como em cães, *S. pseudintermedius* pode causar uma variedade de infecções de pele e tecidos moles em humanos, e estudos mostram que há uma alta similaridade entre cepas isoladas de pacientes humanos e cães tutelados pelos mesmos (Somayaji *et al.*, 2016; Lozano *et al.*, 2017; Ference *et al.*, 2019; Blondeau *et al.*, 2020; Gagetti *et al.*, 2020). Estudos mostram que o contato prolongado com cães pode ser um fator de risco importante para adquirir a bactéria, sendo veterinários e tutores de animais os grupos mais afetados (Stegamann *et al.*, 2010; Paul *et al.*, 2011; Van Duijkeren *et al.*, 2011; Guardabassi *et al.*, 2013). Nesse contexto, a circulação de MRSP é um considerável problema para a saúde humana e animal, devido ao seu potencial risco zoonótico e às opções limitadas de tratamento atualmente disponíveis.

Apesar de sua importância, ainda existem poucos estudos sobre MRSP no Brasil. Até o presente momento, pouco se sabe sobre padrões de resistência e, principalmente, sobre a estrutura populacional da espécie (Penna *et al.*, 2010; Bourguignon *et al.*, 2016; Botoni *et al.*, 2016; Scherer *et al.*, 2018). Além disso, em um contexto mundial, poucos trabalhos investigaram a possível relação entre as diferentes manifestações clínicas causadas por *S. pseudintermedius* em cães, os padrões de resistência antimicrobiana (AMR) e estrutura populacional das mesmas.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivos Gerais

Identificar e caracterizar estirpes de *S. pseudintermedius* isoladas de diferentes sítios infecciosos em cães quanto à sua diversidade genética e resistência a antimicrobianos de uso em medicina humana e medicina veterinária.

2.2 Objetivos específicos

- a) Identificar e caracterizar *Staphylococcus* em cães com diferentes quadros infecciosos;
- b) Avaliar fenotipicamente a resistência antimicrobiana de isolados do gênero *Staphylococcus* a diferentes classes de antimicrobianos de uso na medicina veterinária e medicina humana;

- c) Comparar estirpes MRSP quanto ao perfil de resistência a antimicrobianos e à diversidade genética
- d) Identificar possíveis fatores de risco para a aquisição de MRSP

3. REVISÃO DE LITERATURA

3.1 Gênero *Staphylococcus*

O gênero *Staphylococcus* é composto por bactérias cocoides imóveis, gram-positivas, anaeróbias facultativas, e engloba cerca de 71 espécies e 30 subespécies (Griffeth *et al.*, 2008; Jaradat *et al.*, 2020; Ma *et al.*, 2020; Suepaul *et al.*, 2021). Essas bactérias são de grande relevância para a medicina humana e a medicina veterinária, tanto por serem parte da microbiota cutânea de diversos animais, quanto pela capacidade de agirem como agentes oportunistas em processos infecciosos (Morris *et al.*, 2006; Ma *et al.*, 2020). Podem ser classificados quanto à presença da enzima coagulase em dois grupos: os estafilococos coagulase-positivos (CoPS) e estafilococos coagulase-negativos (CoNS), sendo as espécies do primeiro grupo comumente consideradas de maior patogenicidade e associadas a quadros de infecção, enquanto o segundo grupo é considerado de menor patogenicidade e associado a hospedeiros saudáveis (Griffeth *et al.*, 2008; Ma *et al.*, 2020; Suepaul *et al.*, 2021). Dentre as espécies já conhecidas, destaca-se *Staphylococcus aureus*, um CoPS comensal da microbiota cutânea de seres humanos, com potencial para causar quadros de infecção e/ou intoxicação em humanos e demais espécies animais, seja em ambientes comunitários, quanto hospitalares (Algammal *et al.*, 2020; Jaradat *et al.*, 2020).

3.1.1 Gênero *Staphylococcus* em cães

Cães saudáveis podem carrear estafilococos em diversos sítios muco-epiteliais como narinas e boca, faringe, virilha, vagina, prepúcio, ânus, axilas e orelhas (Griffeth *et al.*, 2008). A principal espécie a acometer estes hospedeiros é o *Staphylococcus pseudintermedius*, integrante comensal da microbiota cutânea, sendo comumente isolado de narinas e ânus (Bannoehr e Guadabassi, 2012). Em condições favoráveis, *S. pseudintermedius* pode se tornar um agente infeccioso oportunista, levando a diferentes manifestações clínicas, destacando-se os quadros dermatológicos – nos quais esse agente é responsável por cerca de até 90% dos casos de piodermite secundária em cães (Morris *et al.*, 2006; Bannoehr *et al.*, 2009; Larsen *et al.*, 2018). Além de afecções de pele, *S. pseudintermedius* também pode ser agente causador de

otites externas, quadros de infecções do trato geniturinário, como piometra, prostatites e cistites, além de infecções de feridas cirúrgicas (Weese e van Duijkeren, 2010; Pomba *et al.*, 2016; Bergot *et al.*, 2018). Em casos raros, pode haver ainda a ocorrência de sepse e morte em animais muito jovens (Headley *et al.*, 2016; Zakošek Pipan *et al.*, 2019).

Ainda que menos relevantes, *S. aureus* e estafilococos coagulase negativos – em especial *S. schleiferi* subs. *schleiferi* – também podem ser encontrados em animais saudáveis, e são cada vez mais importantes em quadros infecciosos (Griffeth *et al.*, 2008; Frosini *et al.*, 2019; Ma *et al.*, 2019; Ma *et al.*, 2020).

3.2 Grupo *Staphylococcus intermedius*

3.2.1 Evolução

Identificada pela primeira vez na década de 1970 (Hàjek, 1976), *Staphylococcus intermedius* foi considerada por mais de 30 anos a principal espécie do gênero isolada em espécimes de cães com infecções de pele e tecidos moles (Bannoehr e Guadabassi, 2012). Entretanto, devido à alta diversidade fenotípica observada, constatou-se por meio de técnicas moleculares que amostras previamente classificadas como *S. intermedius* pertenciam a uma nova espécie – nomeada *S. pseudintermedius* (Devriese *et al.*, 2005). Essa nova espécie passou então a integrar o grupo *Staphylococcus intermedius* (do inglês *Staphylococcus intermedius group*) que, atualmente, é composto por quatro bactérias do gênero – *S. intermedius*, *S. pseudintermedius*, *S. delphini* e *S. cornubiensis* (van Duijkeren *et al.*, 2011; Murray *et al.*, 2018).

Diante de técnicas convencionais de identificação bacteriana, *S. pseudintermedius* pode ser caracterizada macroscopicamente por colônias de tamanho médio, elevadas e não pigmentadas, com padrões de β -hemólise incompleta, δ -hemólise completa ou dupla hemólise em ágar sangue ovino ou bovino (Bannoehr e Guadabassi, 2012). Pode-se realizar a diferenciação para outras espécies do gênero por meio de testes bioquímicos de coagulase, produção de acetoina, pirrolidonil arilamidase, β -galactosidase, resistência à polimixina B e acidificação de D-mannitol (Bannoehr e Guadabassi, 2012). Já em se tratando apenas do SIG, pode-se diferenciar *S. intermedius* das demais espécies por meio dos testes de arginina dihidrolase, fermentação de β -gentiobiose em condições aeróbicas e de D-manitol em condições anaeróbicas, entretanto não há possibilidade de diferenciação com segurança entre *S. pseudintermedius* e *S. delphini* (Sasaki *et al.*, 2007; van Duijkeren *et al.*, 2011; Bannoehr e Guadabassi, 2012).

Assim, devido à ausência de marcadores bioquímicos singulares, o desenvolvimento de testes moleculares se fez necessário para a identificação rápida e adequada destes microrganismos (Sasaki *et al.*, 2010; van Duijkeren *et al.*, 2011). Atualmente, métodos como a identificação por espectrometria de massas por meio de ionização por dessorção a laser assistida por matriz (do inglês *matrix assisted laser desorption ionization - time of flight mass spectrometry* – MALDI-TOF) e diferentes técnicas de reação em cadeia da polimerase (PCR) estão disponíveis para identificação (van Duijkeren *et al.*, 2011; Bannoehr e Guadabassi, 2012).

O MALDI-TOF baseia-se na produção de um espectro de impressões digitais de peptídeos e proteínas, de acordo com a massa das mesmas, para identificação dos microrganismos avaliados (Decristophoris *et al.*, 2011). Os bancos de dados são qualificados inicialmente por identificações baseadas na sequência principalmente 16S e 18S e subsequentemente servem como substitutos para a abordagem de sequenciamento (Bannoehr e Guadabassi, 2012). É uma técnica considerada promissora, devido ao seu custo-benefício, facilidade de uso, necessidade de baixos volumes de amostras e alta acurácia (Decristophoris *et al.*, 2011; van Duijkeren *et al.*, 2011; Morris *et al.*, 2017). Todavia, devido à alta heterogeneidade de isolados do SIG, é recomendado que haja um banco de dados vasto, diversificado e atualizado, o que pode se tornar um fator limitante para a acurácia da técnica (Decristophoris *et al.*, 2011; Silva *et al.*, 2015).

Dentre os principais alvos de métodos de PCR, tem-se o gene codificador da termonuclease (*nuc*). A termonuclease é uma enzima termoestável responsável pela degradação de DNA, comumente encontrada em espécies de *Staphylococcus* coagulase-positivos (Cannin *et al.*, 2020). Sua identificação por meio de testes bioquímicos ou imunológicos podem levar a erros (Becker *et al.*, 2005); entretanto, através da técnica de PCR multiplex desenvolvida por Sasaki *et al.* (2010), pode-se identificar polimorfismos presentes no gene *nuc*, possibilitando a diferenciação entre espécies. Tendo apresentado ótimos resultados de sensibilidade e especificidade, a técnica se mostra como uma opção rápida e segura para a identificação de CoPs de relevância na medicina veterinária (Sasaki *et al.* 2010; Bannoehr e Guadabassi, 2012).

Levando em consideração as particularidades das metodologias descritas, pode-se associar o uso das mesmas para a obtenção de resultados ainda mais confiáveis no diagnóstico de estafilococos pertencentes ao SIG. De qualquer forma, uma vez consolidada a reclassificação de amostras do SIG por meio do avanço das técnicas moleculares, provou-se que amostras isoladas de cães não pertenciam à espécie *S. intermedius*, mas sim à *S. pseudintermedius* (Devriese *et al.*, 2005). Dessa maneira, propôs-se que todas as amostras de estafilococos oriundas de cães e fenotipicamente identificadas como pertencentes ao SIG, sejam classificadas

como *S. pseudintermedius*, a menos que se prove diferente por análises genotípicas (Devriese *et al.*, 2009). Em sequência, estudos confirmaram a crescente relevância dessa espécie que, além de integrante da microbiota muco-cutânea canina, também age como agente infeccioso oportunista, causando as mais variadas enfermidades ao hospedeiro (Weese e van Duijkeren, 2010; Bannoehr e Guadabassi, 2012).

3.3 *Staphylococcus pseudintermedius*

Conforme citado anteriormente, *S. pseudintermedius* é um microrganismo natural da microbiota cutânea de cães saudáveis, sendo comumente encontrado na pele, folículos pilosos e em regiões mucocutâneas como nariz, boca e ânus (Bannoehr e Guadabassi, 2012). É um agente com distribuição mundial e pesquisas mostram que a taxa de carreamento de *S. pseudintermedius* pode variar de acordo com a população estudada e localização geográfica, havendo índices de ocorrência entre aproximadamente 40% a até mais de 90% (Bannoehr e Guadabassi, 2012; Smith *et al.*, 2020). Por outro lado, diversos estudos, incluindo de grupos brasileiros, apontam a ocorrência de *S. pseudintermedius* em diversos quadros infecciosos, principalmente piodermite, otite e quadros de infecção do trato urinário (Penna *et al.*, 2010; van Duijkeren *et al.*, 2011).

3.3.1 *Staphylococcus pseudintermedius* em cães saudáveis

Em cães saudáveis, é natural encontrar *S. pseudintermedius* na mucosa nasal, mucosa oral, virilha, períneo/ânus, conjuntiva, axila, faringe e folículos pilosos, sendo os 4 primeiros sítios anatômicos os mais selecionados para isolamento (Griffeth *et al.*, 2008; Bannoehr e Guardabassi, 2012; Paul *et al.*, 2012).

Rubin e Chirino-Trejo (2011) relataram o isolamento de *S. pseudintermedius* em aproximadamente 88% dos cães amostrados, atendidos em um hospital de Saskatoon, Canadá. As amostras foram colhidas das narinas, reto e faringe dos cães, sendo os dois últimos sítios responsáveis pela detecção de 99% dos animais positivos. De acordo com Paul *et al.* (2012), cães saudáveis atendidos em um hospital veterinário universitário de Copenhague, na Dinamarca apresentaram uma prevalência de 69% de *S. pseudintermedius*. Diversos animais foram positivos em múltiplos sítios anatômicos e os locais com maior número de isolados foram o períneo e a mucosa oral; quando amostrados juntos, resultaram na detecção de 90% dos animais carreadores. Já MA *et al.* (2020) encontraram uma prevalência de 46,2% de *S.*

pseudintermedius em cães na Austrália, e o sítio de predileção para isolamento do agente também foi o períneo, seguido por narinas e orofaringe. Schmidt *et al.* (2014) reportaram prevalência de 44% de *S. pseudintermedius* em labradores do Reino Unido, taxa semelhante à relatada por MA *et al.* (2020). Foram colhidas amostras da mucosa nasal e região de períneo e não houve diferença na taxa de isolamento entre ambos os sítios. No estudo de Lee *et al.* (2019), 31% dos cães saudáveis foram positivos, entretanto é importante ressaltar que o sítio de amostragem escolhido foi o conduto auditivo. Já no Japão, Onuma, Tanabe e Sato (2012) observaram uma prevalência de 34,8% em cães entre 2000 e 2002, e de 69,6% em 2009, indicando um possível crescimento na população de cães colonizados por *S. pseudintermedius*. No Brasil não há dados recentes sobre a prevalência de *S. pseudintermedius* em cães saudáveis.

Percebe-se que há uma grande variação de prevalência, que pode ser influenciado pelo local amostrado, número de sítios amostrados por animal, região e metodologia do estudo (ver Figura 1). De maneira geral, o períneo parece ser o melhor local para isolamento do agente, entretanto, recomenda-se a amostragem de mais de um sítio anatômico sempre que possível, para aumento do sucesso no isolamento de *S. pseudintermedius* (Rubin e Chirino-Trejo, 2011; Ma *et al.*, 2019).

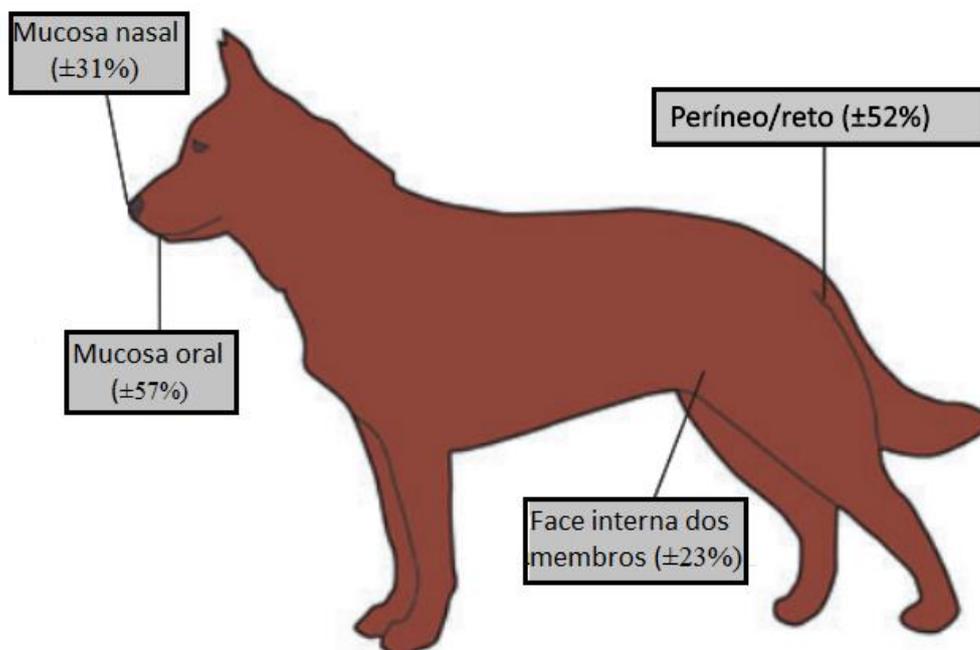


Figura 1 – Prevalência média reportada por diversos estudos de *S. pseudintermedius* em diferentes sítios anatômicos de cães saudáveis. Imagem adaptada de Bannoehr e Guardabassi, 2012.

3.3.2 Infecções causadas por *S. pseudintermedius*

Piodermites são as principais manifestações relacionadas à infecção por *S. pseudintermedius* em cães. Podem ser classificadas como superficiais ou profundas e, frequentemente, são secundárias a alergias, endocrinopatias, ectoparasitas ou outras doenças dermatológicas (Bloom, 2014; Lynch and Helbig, 2021). Dentre as doenças de causa base para a piodermite bacteriana secundária, destaca-se a dermatite atópica, por se tratar de uma síndrome multifatorial de caráter inflamatório e pruriginoso, associada à disfunção da barreira epitelial e consequente desequilíbrio da microbiota cutânea canina (Fazakerley *et al.*, 2010; Marsella, 2021).

A foliculite superficial bacteriana é a forma mais comum de piodermites em cães, e os sinais clínicos dermatológicos mais encontrados são alopecia circular, eritema, pústulas, colaretas, crostas e prurido (Hiller *et al.*, 2014; Botoni *et al.*, 2016; Carroll, Burnham e Westblade, 2021). Altas taxas de prevalência de *S. pseudintermedius* em cães com piodermites são relatadas, podendo corresponder a mais de 90% dos casos, a depender do grupo estudado (Griffeth *et al.*, 2008; Onuma, Tanabe e Sato, 2012; Larsen *et al.*, 2018; Lynch and Helbig, 2021). Estudos demonstram que pode haver uma variação na taxa de isolamento de acordo com o tipo de lesão selecionada para amostragem, e pústulas parecem ser o melhor tipo de lesão para diagnóstico (Larsen *et al.*, 2018). Apesar de ainda ser controverso, alguns estudos apontam para alta similaridade de estirpes de *S. pseudintermedius* obtidas de sítios anatômicos e sítios infecciosos de cães doentes, apontando para a possibilidade de que a doença seja de fato causada por um agente comensal (Lynch and Helbig, 2021).

Assim como as piodermites, otites são manifestações clínicas comuns em cães e a infecção causada por *S. pseudintermedius* geralmente é secundária a outras doenças (Bourély *et al.*, 2019; Lynch e Helbig, 2021). *S. pseudintermedius* está relacionado principalmente a otites externas – que podem ser caracterizadas por alopecia, escoriação, eritema, crostas, hiperemia e secreção ceruminosa ou purulenta – e é considerado um fator perpetuante da doença (Bajwa, 2019). Estudos relatam taxas de prevalência variando de 20 a mais de 90%, geralmente sendo comuns valores em torno de 30% (Dziva *et al.*, 2015; Borély *et al.*, 2019; Lee *et al.*, 2019; Lynch e Helbig, 2021).

Infecções de trato urinário (ITU) de origem bacteriana são uma causa comum de morbidade em cães e estima-se que cerca de 14% destes animais irão apresentar pelo menos um quadro de ITU ao longo da vida (Windahl *et al.*, 2014; Weese *et al.*, 2019). A principal causa das ITUs é a bactéria *Escherichia coli*, mas *S. pseudintermedius* figura entre os agentes mais relevantes deste tipo de problema, sendo a principal bactéria gram positiva isolada (Lynch

e Helbig, 2021). Estudos apontam taxas de prevalência que podem variar de 9% a até 94% em certos casos, apesar dessa ocorrência tão alta não ser o mais comum (Windahl *et al.*, 2014; Lynch e Helbig, 2021). Este estafilococo é comumente associado a quadros de cistite, que são caracterizados pela inflamação da bexiga, com conseqüente polaciúria, disúria, estrangúria e/ou hematúria; *S. pseudintermedius* pode ainda favorecer a formação de urólitos de estruvita, por ser uma bactéria capaz de hidrolisar ureia em amônia e dióxido de carbono, o que aumenta o pH urinário e favorece a formação de cristais de fosfato de amônia e magnésio (Weese *et al.*, 2019).

Staphylococcus pseudintermedius é capaz ainda de causar diversos outros quadros clínicos (ver Figura 2), como infecções do trato respiratório, infecções de trato reprodutor – como piometras e prostatites – infecções de feridas cirúrgicas, especialmente após procedimentos ortopédicos, doenças oftálmicas e, em casos mais raros, pode haver ainda a ocorrência de sepse e morte (Nazarali *et al.*, 2015; Headley *et al.*, 2016; Weese *et al.*, 2019; Zakošek Pipan *et al.*, 2019; Soimala *et al.*, 2020; Lynch e Helbig, 2021).

Em concordância com a literatura internacional, estudos brasileiros apontam a ocorrência de *S. pseudintermedius* em mais de 90% de quadros piodermite acompanhados (Bourguignon *et al.*, 2016; Botoni *et al.*, 2016). Também se detectou variações de 30% a 60% em quadros de otite (Penna *et al.*, 2010; Scherer *et al.*, 2018) e aproximadamente 30% em quadros de infecção do trato urinário causados por bactérias do gênero *Staphylococcus* (Penna *et al.*, 2010).

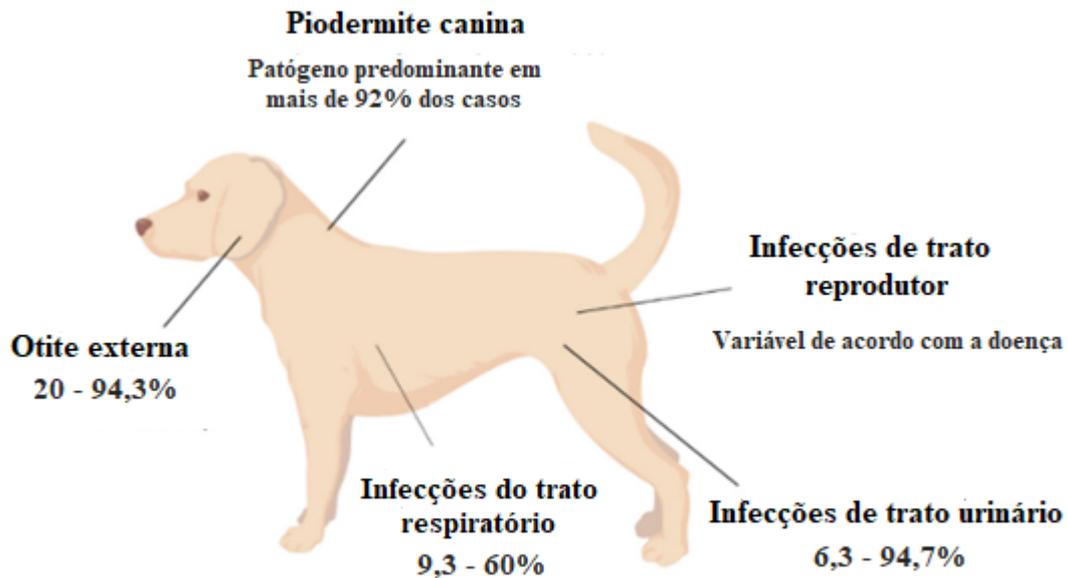


Figura 2 – Taxas média de isolamento de *S. pseudintermedius* e MRSP de diferentes sítios infecciosos em cães. Imagem adaptada de Lynch e Helbig, 2021.

3.3.3 Patogenicidade e virulência

A patogênese e importância clínica de *S. pseudintermedius* é determinada principalmente pelos fatores de virulência e de resistência que possui ou pode adquirir através de processos de co-colonização (Hricu *et al.*, 2020). Muitos destes fatores de virulência produzidos são similares àqueles encontrados em *S. aureus*, e estão envolvidos em quase todos os processos de colonização e disseminação da bactéria; entretanto, pouco se sabe ainda sobre estes fatores e, conseqüentemente, sobre a patogênese de *S. pseudintermedius* (van Duijkeren *et al.*, 2011; Bannoehr e Guardabassi, 2012).

Dentre os fatores de virulência encontra-se enzimas – coagulase, proteases e termonuclease – toxinas (hemolisinas, toxinas exfoliativas e enterotoxinas), fatores de adesão como proteína A e a capacidade de formação de biofilme (Futagawa-Saiko *et al.*, 2006; Hricu *et al.*, 2020).

Acredita-se que as toxinas exfoliativas sejam um dos principais fatores envolvidos na ocorrência de quadros de piodermite, visto que essa é comumente encontrada em amostras de pele (van Duijkeren *et al.*, 2011; Bannoehr e Guardabassi, 2012). Dentre estas, estão as toxinas codificadas pelos genes *SIET*, *expA* e *expB*. Não há ainda um consenso sobre a relevância da primeira, mas sabe-se que as duas últimas são comprovadamente capazes de gerar lesões

erosivas e alterações histopatológicas em análises dermatológicas (Bannoehr e Guardabassi, 2012).

De forma similar à leucocidina de Panton-Valentine produzida por *S. aureus*, *S. pseudintermedius* é capaz de produzir leucotoxina – codificada pelos genes *lukF* e *lukS* – que é comumente relacionada à destruição de células polimorfonucleares, modulando assim a resposta do sistema imune do hospedeiro (van Duijkeren *et al.*, 2011; Bannoehr e Guardabassi, 2012). No Brasil, Pitchenin *et al.* (2017) reportaram a ocorrência de pelo menos um gene codificador dessas toxinas em amostras de *S. pseudintermedius* isoladas de animais domésticos e selvagens, sendo as maiores taxas encontradas para os genes *lukF* e *lukS* (91% e 95%, respectivamente).

Ademais, *S. pseudintermedius*, assim como outros estafilococos, é capaz de produzir biofilmes, podendo chegar a uma prevalência de mais de 90% nas estirpes (Meroni *et al.*, 2019). Pouco se sabe ainda sobre os mecanismos do mesmo, mas é conhecido que há a presença do sistema regulador do gene acessório (*agr*), que é ativado com base na densidade populacional e regula a expressão de outros fatores de virulência para facilitar os processos de colonização e infecção (Futagawa-Saito *et al.*, 2006; van Duijkeren *et al.*, 2011; Bannoehr e Guardabassi, 2012).

Diante da grande quantidade de fatores de virulência encontrados em *S. pseudintermedius* e do pouco que se conhece acerca da patogênese deste microrganismo, mais estudos são necessários para melhor compreensão dos processos de colonização e infecção.

3.3.4 Estirpes multirresistentes

Sabe-se que o gênero *Staphylococcus*, de uma maneira geral, pode carrear mecanismos de resistência a todos os antimicrobianos disponíveis para uso clínico em medicina veterinária (Morris *et al.*, 2017). Assim como é observado para outras bactérias, há uma crescente expansão de estirpes de *S. pseudintermedius* multirresistentes a drogas (MDR) (Nisa *et al.*, 2019; Meroni *et al.*, 2019). A aquisição de transposons carreadores de genes de resistência é apontada como uma das principais razões para o sucesso na dispersão de estirpes MDR de *S. pseudintermedius*, sendo a transferência horizontal destes elementos um evento comum à espécie (McCarthy *et al.*, 2015).

Estirpes *S. pseudintermedius* meticilina-suscetíveis (MSSP) comumente apresentam fenótipo de susceptibilidade a uma ampla variedade de antimicrobianos (McCarthy *et al.*, 2015). Resistência a penicilinas lábeis como penicilina G, ampicilina e amoxicilina é

frequentemente observada devido à produção de beta-lactamase nessas estirpes, entretanto, a suscetibilidade a cefalosporinas pode ser um achado frequente (Frank e Loeffler, 2012; Kadlec e Schwarz, 2012); além disso, MSSP é comumente sensível a antimicrobianos como clindamicina, sulfonamidas em formulações de associação, gentamicina, amicacina e fluorquinolonas, respondendo bem ao tratamento com os mesmos (Frank e Loeffler, 2012; Moodley, Damborg e Nielsen, 2014; McCarthy *et al.*, 2015).

É de particular preocupação, entretanto, o aumento de reportes acerca de *Staphylococcus pseudintermedius* meticilina-resistente, que são capazes de evadir do mecanismo de penicilinas estáveis à ação da penicilinase; além disso, estirpes MRSP são, em sua maioria, multirresistentes, limitando ainda mais as possibilidades de um tratamento eficaz (McCarthy *et al.* 2015; Meroni *et al.*, 2019).

3.4 *Staphylococcus pseudintermedius* resistente à meticilina

3.4.1 Epidemiologia

De acordo com van Duijkeren *et al* (2011), isolados de *S. pseudintermedius* eram, de uma maneira geral, susceptíveis a antimicrobianos beta-lactâmicos estáveis à penicilinase, entretanto, a partir de meados de 2006, o aumento de estirpes MRSP tornou-se um problema de grande relevância para a medicina veterinária. Antimicrobianos como a meticilina e a oxacilina pertencem à categoria de penicilinas semissintéticas resistentes à penicilinase e foram desenvolvidas como forma de resposta a bactérias resistentes a penicilinas de primeira geração (Morris *et al.*, 2006). Sua ação se dá através da ligação à proteína ligadora da penicilina (PBP) presente nas bactérias, impedindo a formação da parede celular (van Duijkeren *et al.*, 2011). Sabe-se atualmente, contudo, que mecanismos de adaptação tornaram possível que algumas estirpes de *S. pseudintermedius* sejam resistentes a esses fármacos. Esta resistência está associada à aquisição do gene *mecA*, que está presente em um elemento móvel denominado cassete cromossômico estafilocócico mec (SCCmec), podendo ser transferido de forma horizontal entre bactérias do gênero *Staphylococcus* (van Duijkeren *et al.*, 2011, McCarthy *et al.*, 2015). Este gene modifica a conformação da proteína ligadora de penicilina 2a (PBP-2a), reduzindo a afinidade ao antimicrobiano, promovendo, assim, resistência a todos os antimicrobianos beta-lactâmicos, com exceção das cefalosporinas de quinta geração (Frank e Loeffler, 2012; Kadlec e Schwarz, 2012; CLSI, 2020).

Similarmente aos isolados susceptíveis, estirpes MRSP podem ser encontradas na pele e mucosas de cães saudáveis ou não, sendo responsáveis por quadros de infecção relacionados

à pele, ao trato urinário e a infecções cirúrgicas (van Duijkeren *et al.*, 2011; Pomba *et al.*, 2016). A prevalência de MRSP é altamente variável de acordo com a população em estudo, sendo encontrado taxas de prevalência entre 1,5% e 4,5% na comunidade, enquanto em clínicas veterinárias essa taxa varia entre 2,1% a 30% (van Duijkeren *et al.*, 2011; Laarhoven *et al.*, 2011). Em países asiáticos, as taxas de isolamento de MRSP podem ser ainda mais altas, chegando-se a 66% – fato que pode ser explicado por uma regulamentação menos severa quanto ao uso de antimicrobianos em animais de companhia, quando comparado à América do Norte e Europa (Guardabassi *et al.*, 2013).

No Brasil, estudos apontam prevalência de MRSP em até cerca de 40% dos casos de infecção causadas por *S. pseudintermedius* (Holmström *et al.*, 2020), sendo estes valores variados de acordo com o quadro infeccioso avaliado. Relata-se que estirpes MRSP sejam responsáveis por 30% dos quadros piodermite (Botoni *et al.*, 2016), variações de 14% a 30% nos casos de otite (Penna *et al.*, 2009; Scherer *et al.*, 2018), e aproximadamente 8% em quadros de infecção do trato urinário (Penna *et al.*, 2010) causados por *S. pseudintermedius*.

Diferentes índices de prevalência podem ser observados nos estudos, de acordo com a população, região geográfica e sítios de infecção analisadas, sendo os quadros de piodermite e otite aqueles com maiores taxas de frequência de MRSP (van Duijkeren *et al.*, 2011; Krapf *et al.*, 2019). Pouco ainda se sabe sobre os fatores de risco que podem levar a uma infecção por MRSP mas, acredita-se que, histórico prévio de antibioticoterapia, realização de procedimentos cirúrgicos e/ou admissão a áreas de internação hospitalar sejam fatores de grande relevância (Weese *et al.*, 2012; Shoen *et al.*, 2019).

3.4.2 Diagnóstico

Segundo Moodley, Damborg e Nielsen (2014), as primeiras estirpes de MRSP caracterizadas fenotipicamente foram isoladas na França, em meados de 1980, a partir de cães saudáveis e também cães com quadros de piodermite, enquanto as primeiras caracterizadas genotipicamente foram encontradas em 1999 nos Estados Unidos e em 2005 na Europa.

O diagnóstico fenotípico é realizado por meio de testes de sensibilidade antimicrobiana, utilizando-se a oxacilina como preditor da resistência, devido à sua maior sensibilidade e estabilidade (Bemis *et al.*, 2009; Kadlec e Schwarz, 2012). As principais metodologias usadas são a de disco difusão e de microdiluição. Para tanto, considera-se que uma zona de diâmetro ≤ 17 mm em torno de um disco de oxacilina na concentração 1 mg e/ou uma concentração inibitória mínima ≥ 0.5 mg/L sejam apropriados para determinar resistência *in vitro* (CLSI,

2021) e estão altamente correlacionados à detecção do gene *mecA* em *S. pseudintermedius* (van Duijkeren *et al.*, 2011).

Apesar da resistência fenotípica observada à oxacilina, segundo Kadlec e Schwarz (2012), é necessário que o gene *mecA* esteja presente para que um isolado seja classificado como MRSP. Sendo assim, para o diagnóstico genotípico, preconiza-se a realização de técnicas de PCR para a detecção do gene *mecA* nas amostras isoladas. Ainda que esta seja considerada a forma mais adequada de diagnóstico, muitos laboratórios veterinários ainda não disponibilizam o serviço na rotina, devido ao maior custo de execução (Badger *et al.*, 2019; CLSI, 2021).

3.4.3 Perfis de resistência antimicrobiana

Além de *mecA*, MRSP pode apresentar diversos outros genes de resistência e elementos regulatórios acessórios também carregados por MGE, que determinarão resistência à maioria das classes de antimicrobianos utilizados na rotina (van Duijkeren *et al.*, 2011; Wegener *et al.*, 2018; Krapf *et al.*, 2019). Em geral, essas estirpes apresentam maior frequência de resistência a outras classes de antimicrobianos, como tetraciclinas, fluorquinolonas, aminoglicosídeos e macrolídeos (Kadlec e Schwarz, 2012; Morris *et al.*, 2017). Sabe-se que na Europa e na América do Norte, o perfil de resistência inclui resistência a todos os antimicrobianos orais de uso comum na rotina de tratamento de pequenos animais (van Duijkeren *et al.*, 2011; Pomba *et al.*, 2016).

Estudos mostram que estirpes MRSP isoladas na Europa e nos Estados Unidos apresentam taxas de prevalência de mais de 90% para antimicrobianos como ciprofloxacina, clindamicina, eritromicina, canamicina e estreptomicina, cerca de 70% para tetraciclina, sulfametoxazol/trimetoprim, enrofloxacina e gentamicina, entre 40% e 50% de resistência para cloranfenicol e apenas 5% para amicacina (Frank e Loeffler, 2012; Dos Santos *et al.*, 2016).

Ao avaliar marcadores de resistência, estudos de Kadlec e Schwarz (2012) e Wegener *et al.* (2018) mostraram que isolados de MRSP, em sua grande maioria, também carregam o gene *blaZ*, responsável por codificar uma betalactamase de amplo espectro, podendo chegar a taxas de prevalência de quase 100%. Além disso, essas estirpes podem apresentar taxas de 70% a 80% de resistência às tetraciclinas (sendo determinado principalmente pela presença dos genes *tetM* e *tetK*); cerca de 70% de resistência a macrolídeos (comumente associada a presença do gene *ermB*); de 80% a 90% de resistência aos aminoglicosídeos (gene *aph(3')-III*); de 40% a 60% de resistência ao cloranfenicol (gene *cat*); e uma variação de 90% e 60% de resistência

às fluorquinolonas, (respectivamente determinadas por mutações no gene *gyrA* ou *glrA*). Em contrapartida, resistência à rifampicina, ácido fusídico e mupirocina foram incomuns.

No Brasil, diversos estudos apontam a ocorrência de isolados de MRSP multirresistentes a 6 ou mais classes de antimicrobianos (Penna *et al.*, 2010; Botoni *et al.*, 2016; Scherer *et al.*, 2018), com destaque para as sulfonamidas e tetraciclina, classes amplamente utilizadas na medicina veterinária e classificadas como altamente importante para medicina humana (Morris *et al.*, 2017; OMS, 2018).

Ademais, sabe-se que estirpes MRSP tendem a apresentar um padrão de susceptibilidade a poucos antimicrobianos, em geral amicacina, rifampicina, vancomicina e linezolida (Morris *et al.*, 2017). Por essa razão, o tratamento de infecções causadas por MRSP representa um sério dilema terapêutico, pois as opções de antimicrobianos disponíveis para tratamento são limitadas e muitas vezes apresentam potencial de toxicidade mais alto para o paciente ou, ainda, são classificadas como criticamente importantes para a medicina humana pela OMS (Weese e van Duijkeren, 2010; Morris *et al.*, 2017; OMS, 2018).

3.5 Diversidade genética

Sabe-se que *S. pseudintermedius* apresenta grande variedade genética na população canina, sendo possível que mais de um tipo de estirpe colonize ou infecte um mesmo animal (Bannoehr e Guadabassi, 2012; Larsen *et al.*, 2018). A técnica de sequenciamento de múltiplos locus (*Multilocus Sequence Typing* – MLST) possibilita avaliar o grau de diversidade genética dos isolados circulantes, podendo assim, entender-se melhor a estrutura da população e suas possíveis relações de ancestralidade (Solyman *et al.*, 2013; Dos Santos *et al.*, 2016). A técnica baseia-se na análise de genes conservados presentes no microrganismo (em geral sete ou oito genes), para a detecção de variação de sequências nos loci destes (Solyman *et al.*, 2013). Isto resulta em diferentes perfis alélicos, denominados também de *sequence types* (STs) (Bannoehr e Guadabassi, 2012). Uma vez definidos os STs, por meio de análises de variação dos loci, é possível inferir o grau de similaridade entre as mesmas e agrupá-las em *clusters*, denominados complexos clonais (CC) – que, de maneira geral, são formados por STs que compartilham no mínimo cinco ou seis alelos (Pires dos Santos *et al.*, 2016).

Comparativamente, estirpes MSSP apresentam maior diversidade genética do que estirpes MRSP que, em boa parte, estão classificadas dentro de um número limitado de complexos clonais (Weese e van Duijkeren, 2010; Pires dos Santos *et al.*, 2016; Haenni *et al.*, 2020). Acredita-se, ainda, que haja uma associação entre linhagens bem-sucedidas e origem

geográfica, sendo os CC71 e CC258 os principais complexos clonais de MRSP circulantes já relatados na Europa; CC68 o principal da América do Norte e; CC45 e CC112 os principais da Ásia (Perreten *et al.*, 2010; Pires dos Santos *et al.*, 2016; Meroni *et al.*, 2019). Pouco se sabe sobre os demais continentes, devido ao número limitado de estudos, mas CC71 parece ser importante também na Oceania (Worthing *et al.*, 2018; Nisa *et al.*, 2019). A figura 3 traz os principais CCs já relatados na literatura. No Brasil, Quitoco *et al.* (2013) demonstraram, pela primeira vez, a existência de um clone ST71 no Rio de Janeiro, isolado da microbiota nasal de um cão saudável. Entretanto, este é o único estudo publicado e revisado por pares até o presente momento acerca da diversidade genética e estrutura populacional de *S. pseudintermedius* no país.

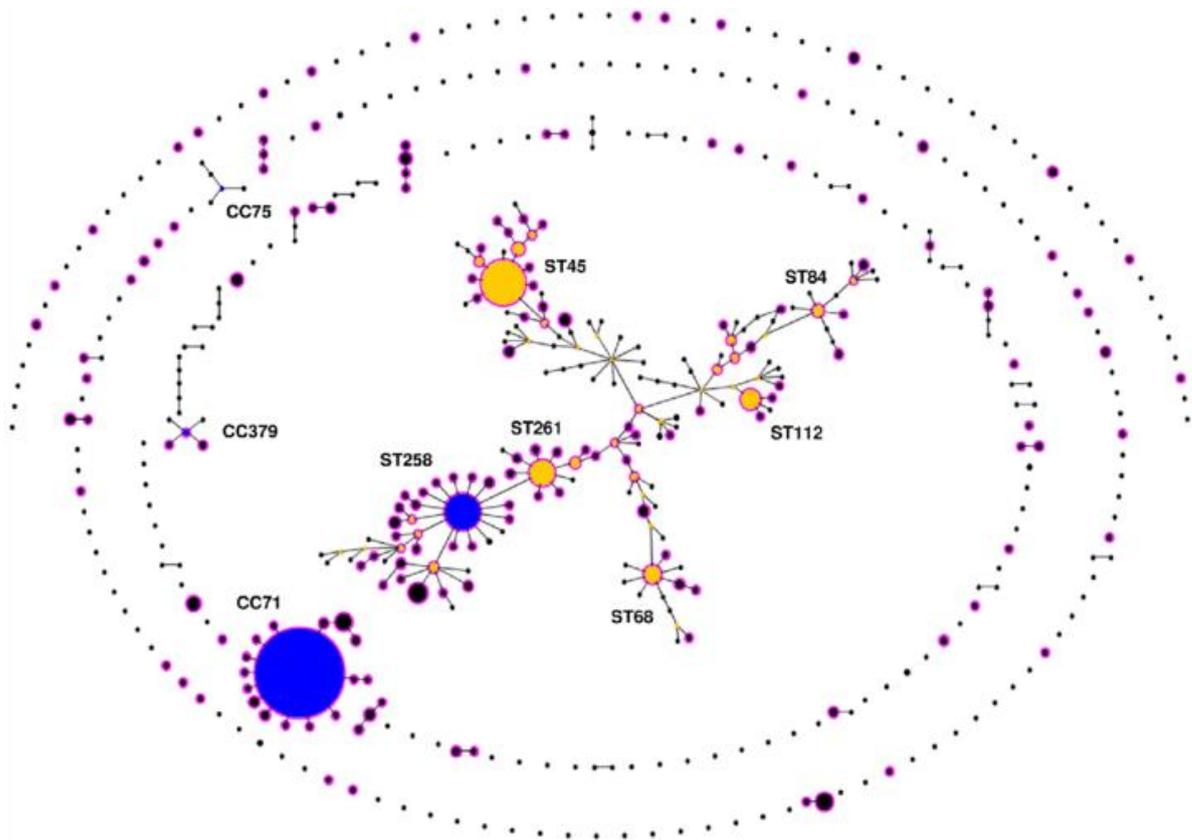


Figura 3 – Estrutura populacional de *Staphylococcus pseudintermedius* mediante análise eBURST. Os complexos clonais de maior relevância são indicados em azul e amarelo. Imagem adaptada de Pires dos Santos *et al.*, 2016.

Estudos mostram que pode haver ainda uma associação entre a linhagem da estirpe e os padrões de resistência antimicrobianas encontradas na mesma. O CC71, tende a apresentar resistência a todos os antimicrobianos de uso na rotina de pequenos animais (Paul *et al.*, 2011) e, no que tange aos beta-lactâmicos, apresenta maiores taxas de resistência à oxacilina,

ampicilina, amoxicilina com ácido clavulânico e cefalotina, o que pode explicar parte de sua eficiência na dispersão global (Wegener *et al.*, 2020). Já o CC45 apresenta maiores taxas de resistência para o cloranfenicol, quando comparado aos CC71 e CC258, enquanto o CC258 apresenta maiores taxas de resistência para sulfametoxazol/trimetoprim e maior susceptibilidade à enrofloxacin e gentamicina, quando comparado aos dois CCs anteriores (Pires dos Santos *et al.*, 2016).

Apesar da linhagem ST71 ser uma das mais relevantes no contexto mundial, nota-se que a prevalência da mesma tem reduzido, enquanto a frequência de outras linhagens, como o ST258 e ST496 aumentam (Duum *et al.*, 2016; Bergot *et al.*, 2018; Grönthal *et al.*, 2017; Meroni *et al.*, 2019). Esta mudança na dinâmica populacional, com aumento na ocorrência de “novas” linhagens, incluindo diversos *singletons* (estirpes que não se agrupam em complexos clonais já definidos), indicam que a dispersão clonal talvez não seja tão mais relevante frente a eventos de transferência horizontal de resistência (Bannoehr & Guardabassi, 2012; Pires dos Santos *et al.*, 2016; Grönthal *et al.*, 2017). Além disso, o fato de haver mudanças no perfil de resistência de acordo com as linhagens identificadas aponta para a necessidade de se definir protocolos terapêuticos de acordo com a estirpe isolada (Pires dos Santos *et al.*, 2016), dificultando ainda mais o controle da disseminação de estirpes resistentes à meticilina.

3.6 Potencial zoonótico e impacto na saúde pública

S. pseudintermedius não é um agente comensal de seres humanos, sendo incomum, portanto, os casos de colonização pelo mesmo (van duijkeren *et al.*, 2011; Guardabassi *et al.*, 2013). Entretanto, é crescente o número de relatos referentes ao carregamento de MRSP por pessoas, em especial veterinários (Guardabassi *et al.*, 2013). Morris *et al.* (2010) demonstraram que veterinários dermatologistas de pequenos animais dos Estados Unidos apresentaram taxas de carregamento de MRSP de, aproximadamente, 5%, com achados de estirpes altamente similares entre alguns dos participantes e seus respectivos animais de estimação. De maneira similar, Paul *et al.* (2011) encontraram cerca de 4% de veterinários positivos para MRSP, sendo dois participantes deste grupo positivos novamente um mês após a primeira coleta, sugerindo a possibilidade de colonização persistente ou reinfecção. Apesar destes valores parecerem baixos, o fato de se encontrar taxas de isolamento de MRSP maiores que isolamento de MRSA neste grupo populacional alerta para a relevância do agente e de seu potencial zoonótico (Paul *et al.*, 2011; Guardabassi *et al.*, 2013).

É notório, também, o aumento de relatos de quadros de infecção de pele e tecidos moles em humanos causados por *S. pseudintermedius*, que estão, em sua grande maioria, associados à ocorrência de contato dos pacientes com cães (Somayaji *et al.*, 2016; Ference *et al.*, 2019). Diversos relatos de casos evidenciam, a alta similaridade entre estirpes isoladas dos pacientes humanos e cães pertencentes ao ambiente domiciliar dos mesmos, indicando estes animais como possível origem dos quadros infecciosos (Lozano *et al.*, 2017; Blondeau *et al.*, 2020; Gagetti *et al.*, 2020). Deve-se ressaltar também a possibilidade de que infecções em pacientes humanos causadas por *S. pseudintermedius* sejam subdiagnosticadas, uma vez que há, ainda, erros de identificação de espécies, confundindo-se a mesma com *S. aureus* (Gagetti *et al.*, 2020).

Acredita-se, portanto, que o contato recorrente e a longo prazo com cães seja um fator de risco para a aquisição de *S. pseudintermedius* – em especial estirpes MRSP – em humanos, colocando assim, profissionais de medicina veterinária e tutores de cães como grupos de maior risco (Stegamann *et al.*, 2010; van Duijkeren *et al.*, 2011). Dessa forma, é essencial então entender e tratar infecções por *S. pseudintermedius* como um problema de saúde pública. Antimicrobianos como mupirocina, linezolida, quinupristina/dalfopristina, rifampicina e vancomicina, que são comumente usados como último recurso para tratamento em humanos, nunca devem, portanto, ser utilizados para tratamento de animais (Stegamann *et al.*, 2010). Ademais, hospitais e clínicas veterinárias devem ser entendidas como parte importante na dispersão de MRSP, devendo ser adotadas medidas rigorosas para um controle eficiente do microrganismo (van Duijkeren *et al.*, 2011).

3.7 Controle e prevenção

3.7.1 Tratamento

Frente ao desafio da crescente taxa de multirresistência antimicrobiana e o dilema do uso indiscriminado de antimicrobianos sistêmicos na medicina veterinária, é urgente a busca por alternativas de tratamento que reduzam a necessidade dos mesmos (van Duijkeren *et al.*, 2011; Guardabassi *et al.*, 2013). Neste contexto, o uso de produtos tópicos pode ser uma alternativa factível para o tratamento de determinados casos de infecções por *S. pseudintermedius*. Borio *et al.* (2015) demonstraram que o uso de clorexidina 4% em formulações tópicas (xampu e spray) mostrou-se tão eficaz quanto o tratamento com uso oral de amoxicilina com ácido clavulânico. Ademais, formulações de associação de clorexidina e miconazol, ácido fusídico, mupirocina e soluções de hipoclorito de sódio mostram-se eficazes

para o tratamento de lesões superficiais relacionadas à *S. pseudintermedius*. (Godbeer, Gold e Lawhon, 2014; Clark, Loeffler e Bond, 2015; Clark *et al.*, 2016; Fadok e Irwin, 2019).

Outras opções ainda em estudo envolvem o uso de bacteriófagos e seus produtos (Moodley *et al.*, 2019), óleos essenciais e produtos derivados de mel contra infecções por *S. pseudintermedius* (Song *et al.*, 2013; Meroni *et al.*, 2020), podendo vir a ser alternativas factíveis para o uso no futuro.

Em casos em que o uso de produto sistêmico é indispensável, deve-se considerar a realização de antibiograma para adequação da conduta terapêutica e, sempre que possível, deve-se associar a um produto tópico, para redução do tempo de tratamento (Morris *et al.*, 2017). A escolha deverá levar em consideração o antimicrobiano que, além de se mostrar eficiente, traga menos efeitos colaterais ao paciente e, principalmente, não seja de uso crítico para a medicina veterinária ou humana (Morris *et al.*, 2017).

Seguindo as normas do CLSI (2021) e EUCAST (2020), todas as estirpes meticilina-resistentes devem ser reportadas como resistentes também a todos os beta-lactâmicos. Entretanto, estudos vêm apontando que algumas linhagens de MRSP podem possuir taxas de resistência inferiores para cefalotina e amoxicilina com ácido clavulânico, hipotetizando-se que o aumento na dose ou na frequência diária de administração dessas drogas pode apresentar resultados eficientes frente a infecções por MRSP (Wegener *et al.*, 2020), mas são necessários mais estudos.

3.7.2 Medidas de prevenção

Diante do desafio de se estabelecer condutas terapêuticas eficientes frente a quadros de infecção causados por estirpes MRSP, é necessário que haja foco em medidas de prevenção e controle para redução da disseminação do agente. Como se sabe, MRSP pode ser carreado por animais saudáveis, porém não há na literatura estudos a longo prazo que acompanhem estes animais, sendo difícil determinar se a colonização acontece de forma permanente ou transiente (van duijkeren *et al.*, 2011; Laarhoven *et al.*, 2011). Além disso, não há estratégias específicas que sejam altamente eficazes para a eliminação destes agentes quando são apenas comensais (Nisa *et al.*, 2019). Por isso, as principais medidas a serem adotadas são focadas em práticas de higiene, tanto para limpeza do animal, quanto do ambiente em que o mesmo vive (van duijkeren *et al.*, 2011; Morris *et al.*, 2017). Similarmente, em clínicas e hospitais veterinários, deve-se preconizar o uso de equipamento de proteção individual, como luvas descartáveis para cada animal atendido; boas práticas de higiene – como lavar as mãos antes e depois de cada

atendimento; práticas regulares de sanitização de equipamentos e desinfecção ambiental – para gram-positivos os melhores agentes são à base de álcoois, aldeídos, biguanidas, compostos fenólicos ou amônia quaternária; além da instituição de procedimentos operacionais padrão e fluxos de atendimento, para se reduzir a contaminação do ambiente e possível transmissão por meio de fômites/iatrogênica (Grönthal *et al.*, 2014; Morris *et al.*, 2017; Stull *et al.*, 2018).

Ademais todas as medidas citadas anteriormente, uma das ferramentas mais essenciais para prevenção e controle de *S. pseudintermedius*, especialmente quando se trata de estirpes MRSP, é a instituição de programas de vigilância epidemiológica – seja ela realizada de forma passiva ou ativa – para a obtenção de dados que permitam análises de incidência e prevalência do agente, além de permitir identificar mudanças epidemiológicas ao longo do tempo (Morris *et al.*, 2017). Além disso, é necessário que no processo de vigilância haja o monitoramento quanto ao uso de antimicrobianos, pois assim se torna possível entender a prevalência e tendência de estirpes resistentes, permitindo a adequação de políticas nacionais quanto ao uso dos mesmos (Moodley, Damborg e Nielsen, 2014; Nisa *et al.*, 2019).

Em suma, para que se tenha uma boa política nacional que guie o uso racional de antimicrobianos frente a quadros de infecção por MRSP, é necessário sempre levar em consideração as recomendações fornecidas por *guidelines* internacionais, mas, mais do que isso, deve-se também conhecer as particularidades geográficas de cada local quanto à dispersão de estirpes multirresistentes, os antimicrobianos disponíveis e permitidos pela legislação, e a formulação de políticas de uso racional de antimicrobianos contra MRSP (Guardabassi *et al.*, 2013); ademais, deve haver um trabalho inclusivo entre medicina humana e medicina veterinária, para que a instauração de programas assim seja eficaz (Weese e van Duijkeren, 2010; McCarthy *et al.*, 2015).

S. pseudintermedius tem-se tornado cada vez mais relevante para a medicina veterinária – em especial devido à crescente prevalência de estirpes MRSP que, além de resistentes a todas as classes de beta-lactâmicos, são comumente resistentes à grande maioria de antimicrobianos usados na rotina. Além disso, com o aumento de relatos de infecção em humanos decorrentes do contato com cães, é particularmente preocupante o impacto na saúde pública em decorrência da dispersão dessas estirpes. Sabendo-se que o sucesso da distribuição global de algumas estirpes pode estar associado a mecanismos adquiridos por determinadas linhagens, é importante que se conheça não só a prevalência do agente, mas também suas características moleculares.

No Brasil, apesar de trabalhos em medicina veterinária já trazerem informações a respeito de ocorrência e perfis de resistência, pouco se sabe sobre como se dá a distribuição

num cenário nacional em quesito de linhagens dominantes e consequente características das mesmas. Assim, para que possa se pensar em medidas eficazes tanto para controle de casos rotineiros, quanto para a prevenção de surtos, é necessário que mais estudos sejam conduzidos.

4. MATERIAL E MÉTODO

4.1 Amostragem e local de execução

Foi realizada uma amostragem não probabilística de conveniência, entre os anos de 2017 e 2020, de espécimes de cães atendidos no Hospital Veterinário da Universidade Federal de Minas Gerais (HV-UFMG) e na Clínica Veterinária VetMaster (Belo Horizonte, MG). No total, 131 amostras foram coletadas com suabe estéril e enviadas sob refrigeração para processamento imediato. Foram obtidas amostras de quadros de infecções de pele, otites, infecções de trato geniturinário, feridas cirúrgicas e outros sítios infecciosos – como amostras provenientes de cavidade abdominal.

O processamento e as análises de todas as amostras foram realizados no Laboratório de Bacterioses e Pesquisa da Escola de Veterinária da UFMG, localizado no Campus Pampulha, no município de Belo Horizonte, MG. Este projeto foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais da UFMG, sob o protocolo nº 287/2019. Os isolados obtidos no estudo foram cadastrados no Sistema Nacional de Gestão do Patrimônio Genético e do Conhecimento Tradicional Associado (SISGEN) sob código AE5577D (ver Anexo). O fluxograma de trabalho adotado no presente estudo pode ser visualizado conforme a Figura 4.

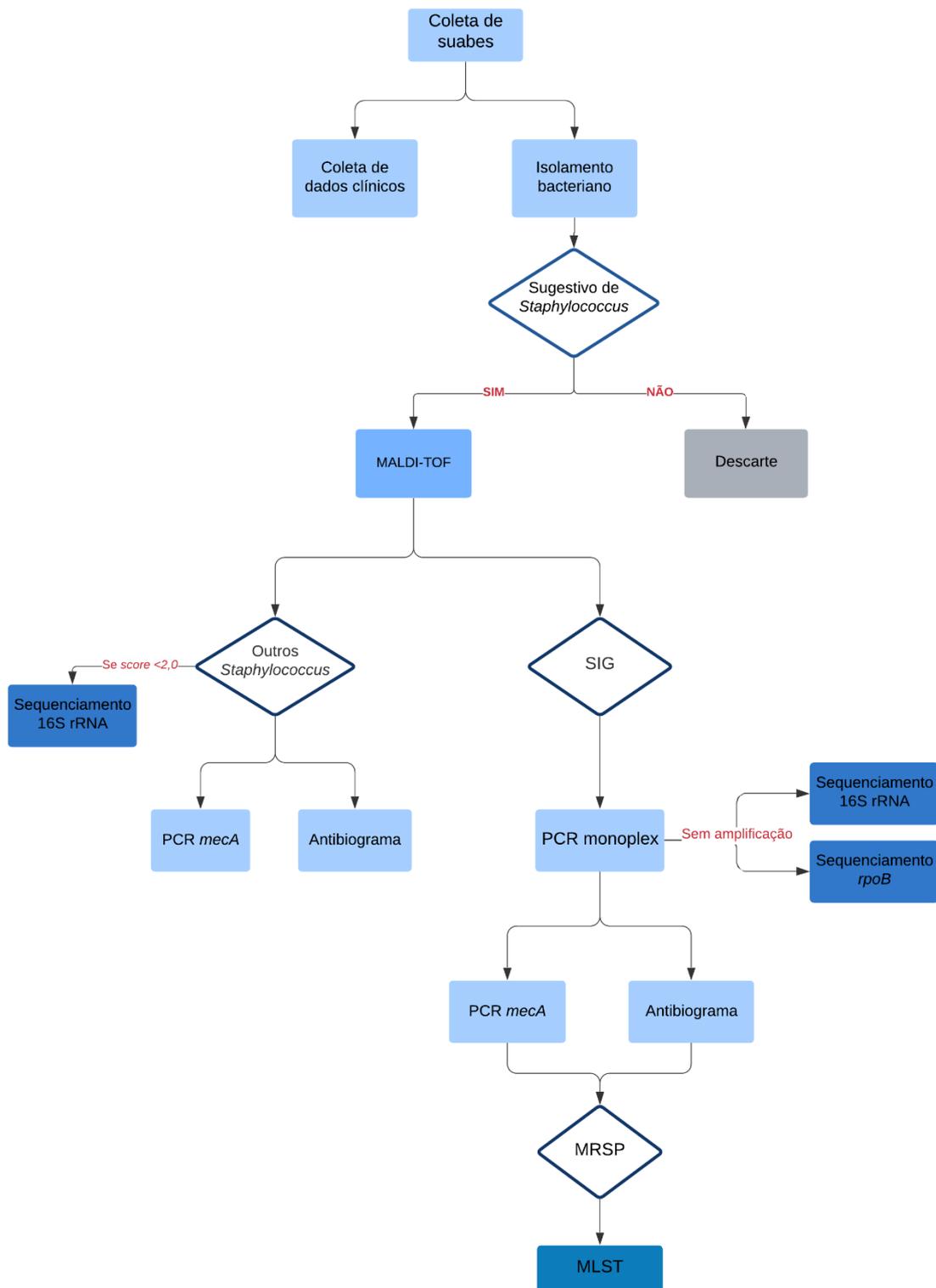


Figura 4 – Fluxograma de etapas de processamento realizadas durante o estudo. Em caixas retangulares têm-se os processos, enquanto losangos indicam os isolados.

4.2 Dados epidemiológicos

As fichas clínicas dos animais submetidos à coleta foram avaliadas para levantamento de dados referentes à: idade, sexo, raça e porte do animal; convivência com outros animais dentro da residência; data e motivo do atendimento clínico inicial; histórico clínico – uso prévio de antimicrobianos, presença de comorbidades, procedimentos cirúrgicos ou internação; e evolução do quadro clínico (desfecho).

4.3 Isolamento e identificação

Os suabes coletados foram plaqueados em ágar Manitol Salgado (MS – KASVI, Brasil) e incubados a 37° C durante 24 horas, sob condições de aerobiose, para triagem de amostras sugestivas de *Staphylococcus* sp. Estirpes sugestivas foram subcultivadas em ágar Müeller Hinton (MH – Difco, EUA) sob as mesmas condições e em seguida, armazenadas em caldo *Brain Heart Infusion* (HIMEDIA, Índia) adicionado de 15% de glicerina a -20° C. Todos os isolados sugestivos de *Staphylococcus* coletados foram submetidos à técnica de MALDI-ToF MS para identificação da espécie. As estirpes identificadas como pertencentes ao grupo SIG foram submetidas a protocolos de PCR para diferenciação entre as espécies pertencentes ao grupo (*S. pseudintermedius*, *S. intermedius* e *S. delphini*), conforme descrito a seguir. Quando necessário, as amostras foram ainda submetidas às técnicas de sequenciamento do gene *16S rRNA* e gene *rpoB*. Todos os isolados foram submetidos à extração de DNA pelo método da guanidina (Pitcher, Saunders e Owen, 1989); o grau de pureza e concentração de DNA foram avaliados por espectrofotometria (Sambrook, Fritsch e Maniatis, 1989).

4.4 Diferenciação de espécies do SIG

As estirpes identificadas como pertencentes ao SIG pela técnica de MALDI-TOF foram submetidas a protocolos de PCR monoplex para detecção do gene *nuc (pse)*, conforme Sasaki *et al* (2010) modificado. A tabela 1 apresenta as sequências de nucleotídeos dos iniciadores utilizados para a reação, os tamanhos de fragmentos amplificados esperados e a referência utilizada. Foram utilizados como controles positivos estirpes de referência de *S. pseudintermedius*, *S. intermedius*, *S. delphini* grupo A e *S. delphini* grupo B, enquanto água ultrapura e os reagentes da reação de PCR foram selecionados como controles negativos.

Tabela 1 - Sequência de iniciadores utilizados para identificação de espécies do grupo SIG, tamanho do produto amplificado e referência utilizada.

Iniciador	Sequência (5'– 3')	Produto (pb)	Referência
<i>pse</i>	TRGGCAGTAGGATTCGTAA(F)	926	Sasaki <i>et al.</i> (2010)
	CTTTGTGCTYCMTTTTGG (R)		
<i>In</i>	CATGTCATATTATTGCGAATGA (F)	430	
	AGGACCATCACCATTGACATATTGAAACC (R)		
<i>dea</i>	TGAAGGCATATTGTAGAACAA (F)	661	
	CGRTACTTTTCGTTAGGTCG (R)		
<i>deb</i>	GGAAGRTTCGTTTTTCCTAGAC (F)	1.135	
	TATGCGATTCAAGAACTGA (R)		

*pb = pares de base.

4.5 Sequenciamento do gene *16S rRNA*

Para as amostras SIG que apresentaram problemas de amplificação do gene *nuc*, ou amostras não-SIG com score inferior a 2,000 no MALDI-TOF, sucedeu-se à técnica de sequenciamento do gene *16S rRNA*, conforme previamente descrito por Fox *et al.* (2011). Os produtos de PCR foram purificados usando um sistema de purificação de DNA Wizard PCR Preps (Promega) e sequenciados usando primers direto e reverso. As reações de sequenciamento foram realizadas usando um kit de sequenciamento de ciclo BigDye Terminator v3.1 (ThermoFisher) e executados em um analisador genético ABI 3730XL (ThermoFisher). As sequências geradas foram comparadas com as sequências de cepas de referência no banco de dados GenBank do *National Center for Biotechnology Information* (NCBI, disponível em <http://ncbi.nlm.nih.gov>), usando a ferramenta computacional *Nucleotide Basic Local Alignment Search Tool* (nBLAST). Para confirmação das espécies, foi utilizado como critério que as sequências apresentassem identidade $\geq 98\%$ e cobertura $>90\%$.

4.6 Sequenciamento do gene *rpoB*

Em caso de as técnicas de MALDI-TOF, PCR e sequenciamento do gene *16S rRNA* serem insuficientes para a determinação da espécie bacteriana, realizou-se PCR para detecção do gene *rpoB* e posterior sequenciamento do mesmo, segundo Mellmann *et al.* (2006). As sequências de *primers* podem ser visualizadas na tabela 2. Assim como realizado para o gene *16S rRNA*, os produtos foram sequenciados usando-se o 3730 XL DNA analyzer (*Applied Biosystems*) e o corte e alinhamento das sequências geradas foram realizados pelo programa BioEdit 7.2 (<https://bioedit.software.informer.com/>). As sequências geradas foram comparadas

com as sequências de cepas de referência no banco de dados GenBank do NCBI (disponível em <http://ncbi.nlm.nih.gov>), usando a ferramenta nBLAST. Para confirmação das espécies, foi utilizado como critério que as sequências apresentassem identidade $\geq 98\%$ e cobertura $>90\%$.

Tabela 2 - Sequência de iniciadores utilizados para identificação de espécies do grupo SIG, tamanho do produto amplificado e referência utilizada.

Iniciador	Sequência (5'– 3')	Produto (pb)*	Referência
<i>rpoB</i> 1418	CAATTCATGGACCAAGC (F)		
<i>rpoB</i> 3554 ^a	CCGTCCCAAGTCATGAAAC (R)	889	Mellmann <i>et al.</i> (2006)
<i>rpoB</i> 1876 ^b	GAGTCATCITYTCTAAGAATGG (R)		

*pb = pares de base

a = *primer* utilizado para amplificação em PCR

b = *primer* utilizado para sequenciamento

4.7 Sensibilidade antimicrobiana

Para caracterização de perfis de resistência a antimicrobianos, todas as estirpes de *Staphylococcus* sp. foram submetidas ao teste de difusão em disco, conforme o recomendado pelo *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI 2021), para os seguintes antimicrobianos: oxacilina (OXA – 1 μg) ou cefoxitina (CFO – 30 μg), para determinação de resistência à meticilina; penicilina (PEN – 10 U.I.), ciprofloxacina (CIP – 5 μg), cloranfenicol (CLO – 30 μg), clindamicina (CLI – 2 μg), eritromicina (ERI – 15 μg), gentamicina (GEN – 10 μg), nitrofurantoína (NIT – 300 μg), rifampicina (RIF – 5 μg), sulfametoxazol-trimetoprima (1,25/23,75 μg) e tetraciclina (TET – 30 μg). Os resultados interpretados de acordo com as diretrizes do CLSI para patógenos veterinários VET01S-Ed5 e, quando não houvesse dados de referência para o mesmo, utilizou-se as diretrizes para patógenos humanos M100-Ed31 (CLSI, 2020; CLSI 2021). Os isolados que apresentaram resistência a mais de três classes antimicrobianas foram considerados multirresistentes (Cohen *et al.*, 2008).

4.8 Pesquisa de *Staphylococcus* resistente à meticilina

Para a pesquisa de estirpes resistentes à meticilina, todas as amostras de *Staphylococcus* foram submetidas à PCR para detecção do gene *mecA* (*mecA* F, 5'- AAAATCGATGGT AAAGTTGG-3' e *mecA* R, 5'- AGTTCTGCAGTACCGGATTTGC-3'), segundo Murakami *et al.* (1991) modificado. Como controle positivo foi utilizada uma estirpe de referência de *S.*

pseudintermedius, positiva para o gene *mecA*, enquanto como controle negativo foram utilizados água ultrapura e demais reagentes que compõem a reação de PCR.

4.9 Caracterização molecular por MLST

Uma vez confirmadas, as estirpes MRSP foram submetidas à PCR para amplificação dos sete genes utilizados no MLST, conforme descrito por Solyman *et al.* (2013) e Gronthal *et al.* (2017). Os produtos foram sequenciados usando-se o 3730 XL DNA analyzer (*Applied Biosystems*) e o corte e alinhamento das sequências geradas foram realizados pelo programa BioEdit 7.2 (<https://bioedit.software.informer.com/>). Os alelos e STs foram identificados de acordo com a base de dados PubMLST de *S. pseudintermedius*, (disponível em <https://pubmlst.org/spseudintermedius/>). Para definição de complexos clonais, gerou-se uma árvore do tipo *minimum spanning tree* por meio da análise de *Based Upon Related Sequence Types* (eBURST), no programa PHYLOViZ (disponível para *download* em <http://www.phyloviz.net/>). Os complexos clonais foram definidos como agrupamentos de STs que compartilhassem, no mínimo, 6 alelos. Análise por sequências multilocus das estirpes foi realizada com base na sequência concatenada dos sete genes do MLST. Uma árvore filogenética foi construída por meio do programa IQ-TREE (Mihn *et al.*, 2020), utilizando o modelo de máxima verossimilhança, modelo de evolução nucleotídica de Hasegawa-Kishino-Yano e *bootstrap* de 1000 replicatas. A árvore gerada foi visualizada e anotada usando o iTOL v.4 (Letunic e Bork, 2019).

Tabela 3 - Iniciadores utilizados para amplificação dos sete genes de estirpes MRSP no MLST, tamanho do produto amplificado (pb) e referência utilizada.

Iniciador	Sequência (5'– 3')	Produto (pb)	Referência
<i>tuf19</i>	GTCCAATGCCACAACTCG CCAGCTTCAGCGTAGTCTA	500	Gronthal <i>et al.</i> (2017)
<i>cpn60</i>	GCGACTGTACTIONTGCACAAGCA AACTGCAACCGCTGTAAATG	552	
<i>pta</i>	GTGCGTATCGTATTACCAGAAGG GCAGAACCTTTTGTGAGAAGC	570	
<i>purA</i>	GATTACTTCCAAGGTATGTTT TCGATAGAGTTAATAGATAAGTC	490	Solyman <i>et al.</i> (2013)
<i>fdh</i>	TGCGATAACAGGATGTGCTT CTTCTCATGATTCACCGGC	408	
<i>ack</i>	CACCACTTCACAACCCAGCAAACCT	680	

	AACCTTCTAATACACGCGCACGCA	
<i>sar</i>	GGATTTAGTCCAGTTCAAATTT	521
	GAACCATTCGCCCCATGAA	

*pb = pares de base.

4.10 Análise estatística

Os dados foram sumarizados utilizando tabelas de frequência e percentagens para variáveis categóricas, e mediana para variáveis contínuas. As comparações entre grupos foram realizadas utilizando o teste exato de Fisher para variáveis qualitativas e o teste de Mann-Whitney para variáveis quantitativas. Para aquelas variáveis categóricas onde foi identificado significância estatística, foi aplicado o cálculo da razão de chances (OR). Variáveis onde existem células com zero animais, devido à impossibilidade do cálculo matemático, não foi realizada a razão de chances. Para as variáveis contínuas, quando identificado significância estatística, foi aplicado o teste de comparações múltiplas de Tukey. Foi utilizado o pacote estatístico R, versão 4.0.9. Para todas as análises foi considerado o nível de significância de 5%.

5. RESULTADOS

5.1 Coleta de dados

Cento e dezesseis cães foram incluídos neste estudo, o que proporcionou um total de 131 amostras de espécies de estafilococos. Quando dois isolados provenientes do mesmo animal eram obtidos do mesmo sítio infeccioso e apresentavam o mesmo perfil de resistência antimicrobiana, apenas uma era mantida no estudo. A grande maioria das amostras (96/131 - 72,5%) foi obtida no HV-UFMG, enquanto 27,5% (36/131) das amostras foram obtidas a partir de 27 animais atendidos na clínica VetMaster. Os animais eram das mais diferentes raças e as idades variaram de 12 a 204 meses, com uma média de 88 meses ($\pm 46,3$). Cinquenta e sete animais eram fêmeas, cinquenta e oito eram machos e um não foi informado do sexo (ver Apêndice A). Pelo menos 67 animais (57,3%) foram submetidos ao uso prévio de antimicrobianos, sendo que 54 receberam pelo menos um antimicrobiano sistêmico, seis haviam feito uso apenas de antimicrobianos tópicos e sete receberam tanto fármacos de uso sistêmico, quanto de uso tópico – sejam estes produtos relacionados ao problema de saúde apresentado no dia da amostragem ou não. Os principais antimicrobianos previamente prescritos foram cefalexina (29/67), amoxicilina (9/67) ou combinação de amoxicilina e ácido

clavulânico (16/67) e enrofloxacina (12/67). A maioria das amostras clínicas foi associada a condições dermatológicas, sendo 58 (44,3%) de infecções de pele, 28 (21,4%) de otite, 20 (15,3%) de infecções do trato urogenital, 15 (11,4%) de infecções de sítio cirúrgico (SSIs) e dez (7,6%) de outros sítios.

5.2 Identificação das espécies

Um total de 131 amostras foram obtidas e confirmadas como *Staphylococcus* sp. por MALDI-TOF. Cento e dois isolados (77,9%) foram identificados por MALDI-TOF como parte do SIG. Dentre estes, 78 foram identificados a nível de espécie como *S. pseudintermedius*, 20 como *S. intermedius* e quatro como *S. delphini*. Pela PCR do gene *nuc* identificou-se 97 (95,1%) dos 102 isolados como *S. pseudintermedius*, três (2,9%) como *S. delphini* e dois (2%) – BR96 e BR173 – não apresentaram amplificação adequada para o gene de nenhuma das três espécies. Todas as amostras *S. intermedius* do MALDI-TOF foram confirmadas como *S. pseudintermedius* pela PCR; uma amostra identificada como *S. pseudintermedius* no MALDI-TOF foi verificada como *S. delphini* à PCR; uma amostra identificada como *S. delphini* foi verificada como *S. pseudintermedius*. Para as amostras não amplificadas na PCR – uma *S. pseudintermedius* e uma *S. delphini* pelo MALDI-TOF – foi realizado o sequenciamento do gene *16S rRNA*. Ambas as amostras foram identificadas por esta técnica como *S. pseudintermedius*. A única amostra enviada para sequenciamento do gene *rpoB* foi identificada como *S. delphini*, contrariando o resultado do sequenciamento do *16S rRNA* e confirmando o resultado do MALDI-ToF (ver Apêndice B). Já para as amostras não SIG, a técnica de MALDI-TOF identificou oito espécies diferentes de estafilococos, incluindo *S. aureus*. O sequenciamento do *16S rRNA* confirmou todas as espécies identificadas pela técnica citada anteriormente.

A espécie mais frequentemente isolada dos animais foi *S. pseudintermedius* (98/131 - 74,8%), seguida por *S. schleiferi* (20/13 - 15,3%) (ver figura 5). Nove animais apresentavam piodermite e otite ao mesmo tempo, durante o momento da amostragem – em dois destes animais, ambas as infecções eram causadas por *S. pseudintermedius* e, em outros dois, ambas foram causadas por *S. schleiferi*; em todos os casos mencionados anteriormente, as estirpes apresentavam o mesmo perfil de resistência antimicrobiana. Os outros cinco animais apresentaram otite e piodermite causadas por diferentes espécies de estafilococo – sendo a maioria uma combinação de *S. pseudintermedius* e *S. schleiferi*. Além disso, dois cães apresentaram piodermite com a presença de duas cepas de MSSP com diferentes padrões de

resistência antimicrobiana, um cão com piodermite carregava MSSP e MRSP e outros dois cães eram portadores de *S. pseudintermedius* e *S. aureus* no momento da amostragem. Não houve diferença estatística quanto à espécie do agente causador e sexo, idade ou sítio de infecção do animal.

Tabela 4 - Distribuição e proporção de espécies de estafilococos isoladas em diferentes sítios infecciosos de 116 cães atendidos em duas diferentes clínicas veterinárias de Belo Horizonte, entre 2017 e 2020.

Sítio de infecção	Espécies
Pele (n=58 – 44,3 %)	<i>S. pseudintermedius</i> (n=45)
	<i>S. delphini</i> (n=1)
	<i>S. schleiferi</i> (n=10)
	<i>S. aureus</i> (n=2)
Orelhas (n=28 – 21,4%)	<i>S. pseudintermedius</i> (n=17)
	<i>S. delphini</i> (n=1)
	<i>S. schleiferi</i> (n=10)
Trato geniturinário (n=20 – 15,3%)	<i>S. pseudintermedius</i> (n=14)
	<i>S. delphini</i> (n=2)
	<i>S. aureus</i> (n=1)
	<i>S. capitis</i> (n=1)
	<i>S. epidermidis</i> (n=1)
Ferida cirúrgica (n=15 – 11,4%)	<i>S. warneri</i> (n=1)
	<i>S. pseudintermedius</i> (n=13)
	<i>S. simulans</i> (n=1)
	<i>S. capitis</i> (n=1)
Outros (n=10 – 7,6%)	<i>S. pseudintermedius</i> (n=9)
	<i>S. simulans</i> (n=1)

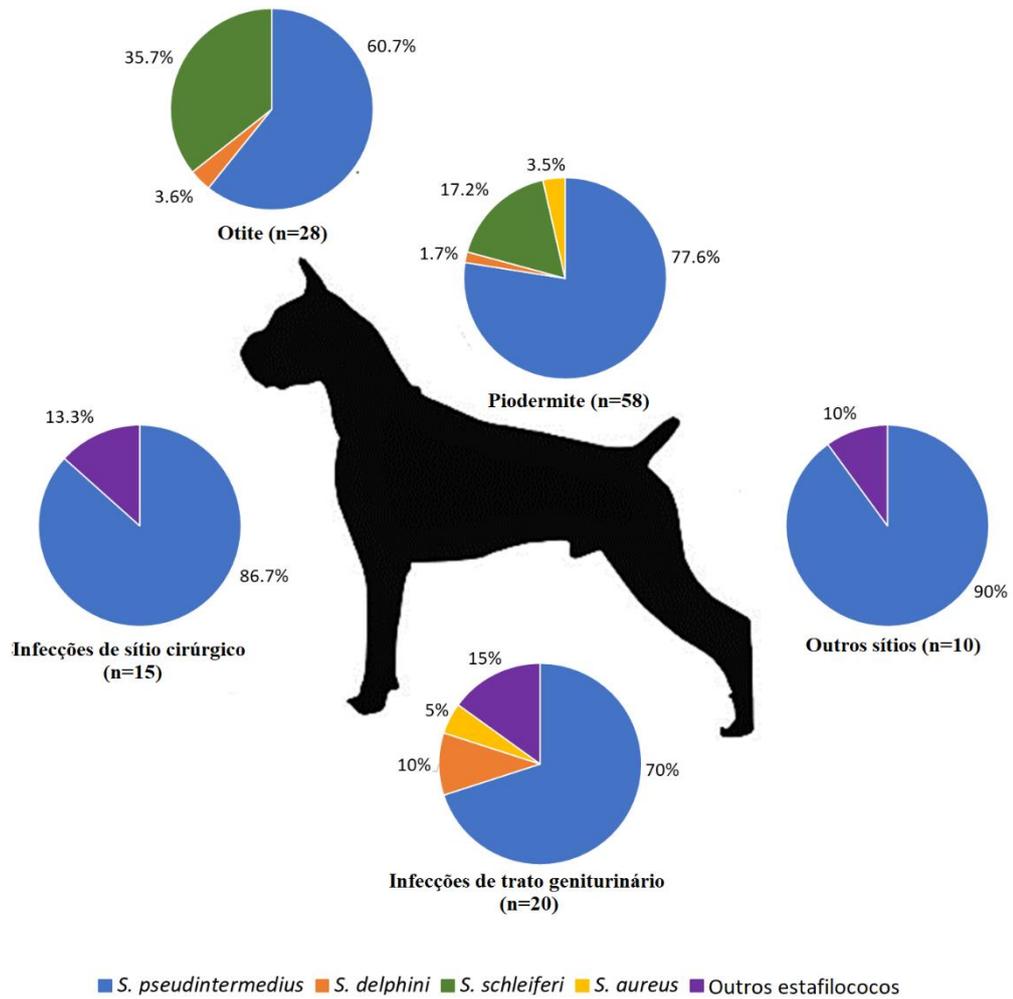


Figura 5 – Distribuição e proporção de espécies de estafilococos isoladas em diferentes sítios infecciosos de 116 cães atendidos em duas diferentes clínicas veterinárias de Belo Horizonte, entre 2017 e 2020.

5.3 Suscetibilidade antimicrobiana

Os resultados de resistência antimicrobiana para todos os estafilococos são mostrados na tabela 5.

Tabela 5 – Perfil de resistência antimicrobiana de estafilococos isolados de cães atendidos em duas diferentes clínicas de Belo Horizonte, entre 2017 e 2020.

Espécie	Total	OXA/FOX	PEN	ERY	CLI	STX	RIF	GEN	TET	CIP	CLO	NIT	MDR
<i>S. pseudintermedius</i>	98	24	85	42	42	58	35	28	57	34	8	0	62
<i>S. delphini</i>	4	0	1	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0
<i>S. schleiferi</i>	20	0	2	0	0	0	0	2	0	0	0	0	0
<i>S. aureus</i>	3	0	2	1	0	0	1	0	1	0	0	0	1
<i>S. capitis</i>	2	0	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>S. epidermidis</i>	1	1	1	0	1	1	0	0	0	0	0	0	1
<i>S. simulans</i>	2	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>S. warneri</i>	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

*OXA = oxacilina, CFO = cefoxitina, PEN = penicilina, SXT = sulfametoxazol/trimetoprima, ERI = eritromicina, CLI = clindamicina, RIF = rifamicina, TET = tetraciclina, CIP = ciprofloxacina, GEN = gentamicina, CLO = cloranfenicol, NIT = nitrofurantoína, MDR = multirresistente.

Dentre as espécies do SIG, noventa isolados (88,2%) foram resistentes a pelo menos um antimicrobiano. Em se tratando de *S. pseudintermedius*, penicilina foi o antimicrobiano com maior taxa de isolados resistentes – em torno de 86,7% (86/98); em sequência, 59,2% dos isolados (58/98) foram resistentes à sulfametoxazol/trimetoprima, 57,2% foram resistentes à tetraciclina (57/98), e 42,9% foram resistentes à clindamicina e à eritromicina (42/98), respectivamente (Figura 2). Aproximadamente 24,5% (24/98) dos isolados foram resistentes à oxacilina. Todos os isolados foram sensíveis à nitrofurantoína. Ao se comparar os quadros infecciosos, isolados de SSIs tiveram as taxas mais altas de resistência a nove dos antimicrobianos testados ($p < 0,05$).

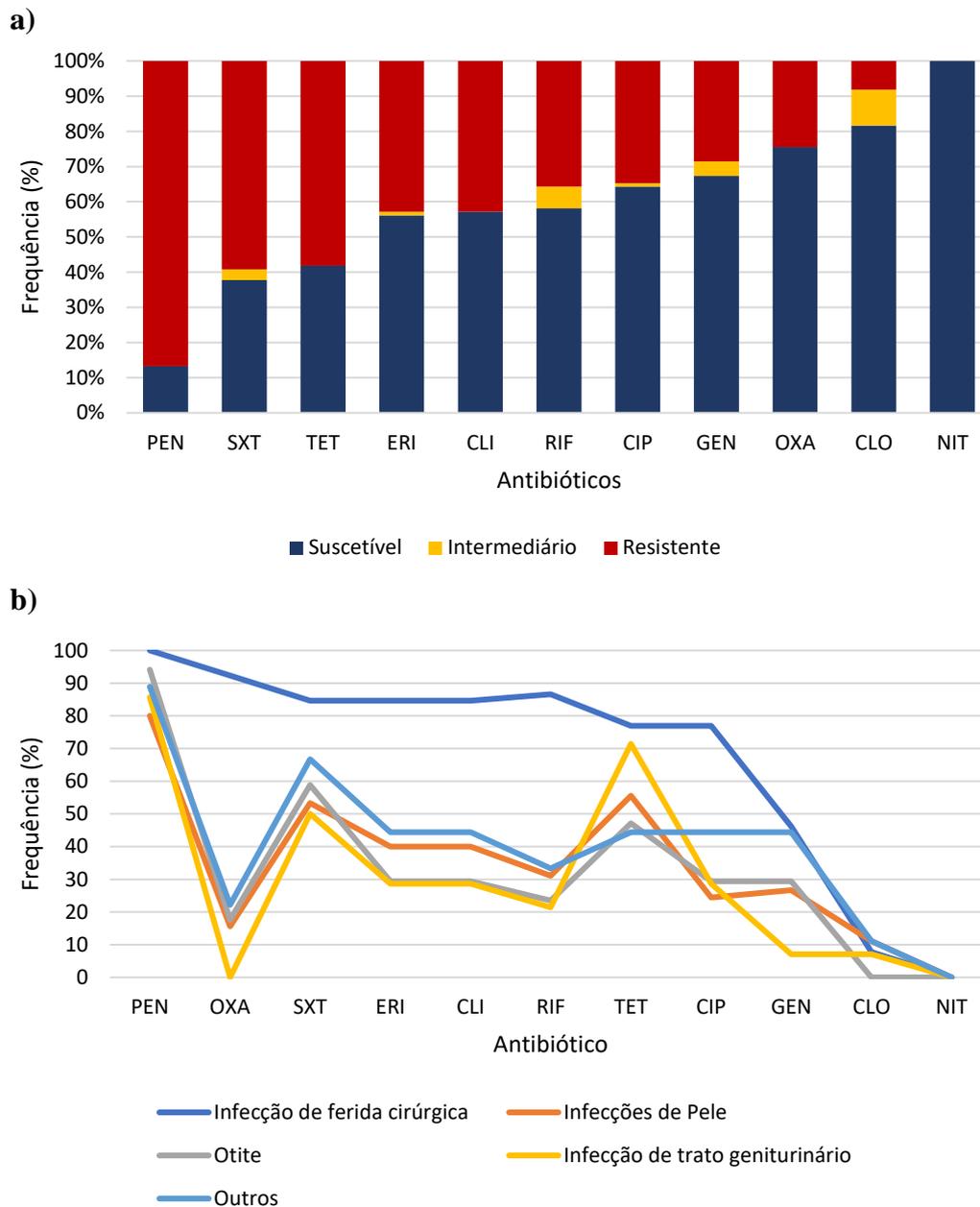


Figura 6 – Resistência antimicrobiana entre isolados clínicos de *S. pseudintermedius* obtidos de cães atendidos em duas diferentes clínicas de Belo Horizonte, entre 2017 e 2020. **a)** Prevalência de acordo com o antimicrobiano; **b)** de acordo com o tipo de infecção.

*PEN = penicilina, OXA = oxacilina, SXT = sulfametoxazol/trimetoprima, ERI = eritromicina, CLI = clindamicina, RIF = rifamicina, TET = tetraciclina, CIP = ciprofloxacina, GEN = gentamicina, CLO = cloranfenicol, NIT = nitrofurantóina

Sessenta e dois isolados de *S. pseudintermedius* (63,3%) foram considerados multirresistentes (Figura 7). Destes, 43,5% (27/62) foram isolados de quadros de infecção de pele, 21% (13/62) de infecções de sítio cirúrgico, 14,5% (9/62) de otites, 11,3% (7/62) de infecções de trato geniturinário e 9,7% (6/62) de outros sítios.

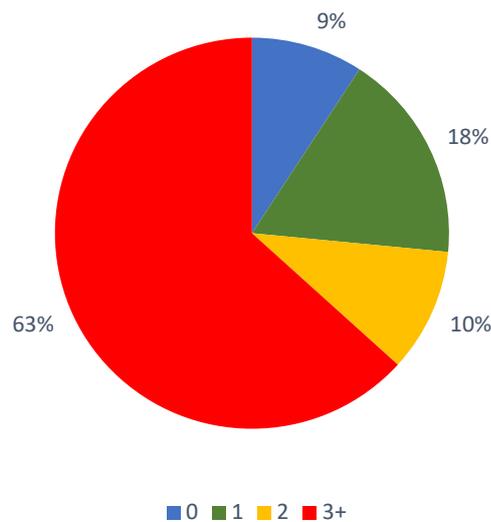


Figura 7 – Porcentagem de isolados SIG de acordo com o número de classes antimicrobianas resistentes.

S. pseudintermedius foi associado ($p < 0,05$) à resistência aos antimicrobianos RIF (OR 5,82), CIP (OR 5,83), CLI (OR 7,82) ERI (OR 7,82), PEN (OR 10,11), OXA (OR 13,11), SXT (OR 14,73) e TET (OR 14,73). As cepas de *S. pseudintermedius* foram, ainda, associadas a uma maior chance de ser multirresistente (OR 18,6, IC 95% 5,3-65,1), quando comparadas a outros estafilococos.

Metade dos isolados não-SIG foram sensíveis a todos os antimicrobianos (Figura 8). Assim como as amostras SIG, neste grupo a maior taxa de resistência também foi à penicilina, sendo um terço (9/29) dos isolados resistentes. Dois isolados (6,9%) foram resistentes à gentamicina e apenas um isolado foi resistente à CFO, CLI, ERI, SXT e RIF cada. Todos os isolados foram suscetíveis à CIP, CLO e NIT. Apenas dois isolados (6,9%), cada um pertencente a uma espécie diferente, foram considerados MDR, sendo apenas um deles resistentes à cefoxitina.

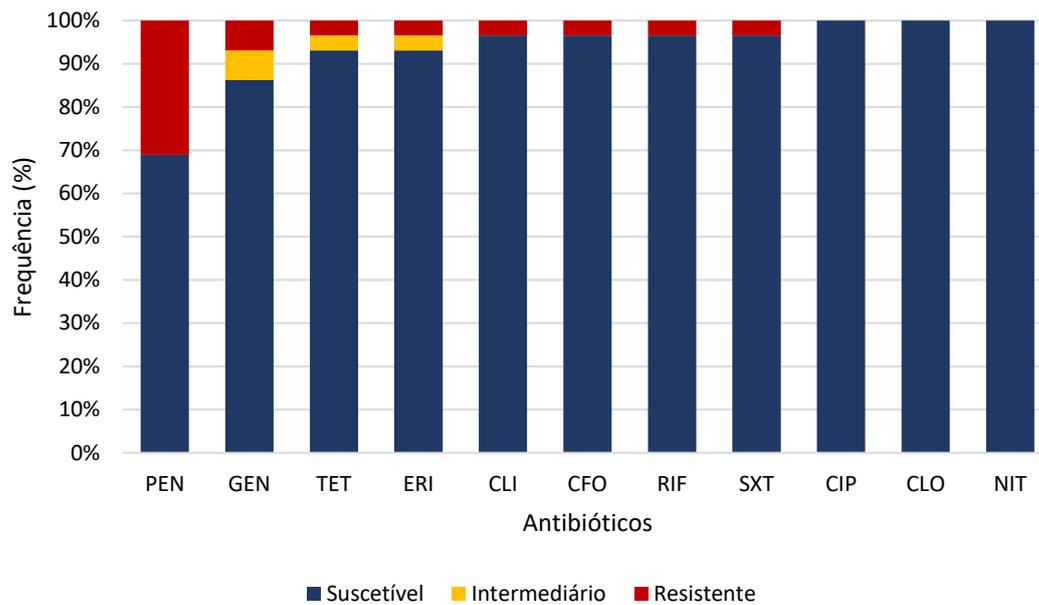


Figura 8 – Prevalência de resistência antimicrobiana entre isolados clínicos não-SIG obtidos de cães doentes atendidos em duas diferentes clínicas de Belo Horizonte, entre 2017 e 2020.

*PEN = penicilina, CFO = cefoxitina, SXT = sulfametoxazol/trimetoprima, ERI = eritromicina, CLI = clindamicina, RIF = rifamicina, TET = tetraciclina, CIP = ciprofloxacina, GEN = gentamicina, CLO = cloranfenicol, NIT = nitrofurantoina.

5.4 Estafilococos resistente à meticilina

Foi encontrada uma prevalência geral de aproximadamente 20,6% de isolados MRS. Dentre os isolados SIG, 23,5% foram positivos para o gene *mecA*, sendo todos eles pertencentes à espécie *S. pseudintermedius*, e todos resistentes fenotipicamente à meticilina. Já entre os isolados não-SIG, 10,3% (3/29) foram positivos – dois da espécie *S. schleiferi* e um *S. epidermidis* sendo somente este último fenotipicamente resistente à cefoxitina. Nenhum isolado MRSA foi identificado no presente trabalho.

5.5 MRSP

Conforme mencionado acima, 24 isolados de *S. pseudintermedius* foram resistentes à oxacilina e carregavam o gene *mecA*, sendo considerados, portanto, estirpes MRSP. Deste total, 50% (12/24) foram isoladas de infecções de feridas cirúrgicas, 29,2% (7/24) de lesões cutâneas, 12,5% (3/24) de otites e 8,3% (2/24) de outras localizações (tabela 6). Quando classificado por tipo de infecção, as taxas de MRSP são: 15,6% (7/45) em cães com infecções de pele; 17,6% (3/17) nas otites, 92,3% (13/14) nas SSI; e 22,2% (2/9) em outros sítios. Não houve amostras MRSP provenientes de infecções do trato geniturinário. Todos os isolados foram resistentes a

pelo menos três classes de antimicrobianos não-beta-lactâmicos. Os perfis de resistência antimicrobiana mais comuns foram OXA-PEN-ERI-CLI-SXT-RIF-CIP-TET-GEN (16,7%) e OXA-PEN-ERI-CLI-SXT-RIF-TET-GEN (16,7% dos isolados).

Tabela 6 - Perfil de resistência antimicrobiana das estirpes MRSP de acordo com os STs e locais de infecção.

ST	CC	Perfil de resistência antimicrobiana	Sítio de infecção
71 (n=9)	71	OXA, PEN, ERY, CLI, SXT, RIF, CIP, TET, GEN	Ferida cirúrgica (2) Pele (1)
		OXA, PEN, ERY, CLI, SXT, RIF, CIP, GEN	Ferida cirúrgica (1) Pele (1) Outros (1)
		OXA, PEN, ERY, CLI, SXT, RIF, CIP, TET	Ferida cirúrgica (3)
2124 (n=2)	NA	OXA, PEN, ERY, CLI, SXT, CIP, GEN	Orelhas (1)
		OXA, PEN, SXT, RIF, CIP, TET, GEN	Outros (1)
2125 (n=3)	NA	OXA, PEN, ERY, CLI, SXT, RIF, CIP, GEN	Ferida cirúrgica (1)
		OXA, PEN, ERY, CLI, SXT, CIP, GEN	Pele (1)
		OXA, PEN, ERY, CLI, SXT, CIP	Ferida cirúrgica (1) Pele (2)
2126 (n=4)	NA	OXA, PEN, ERY, CLI, SXT, RIF, TET, GEN	Ferida cirúrgica (1) Orelhas (1)
		OXA, PEN, SXT, RIF, TET	Pele (1)
2127 (n=1)	NA	OXA, PEN, SXT, RIF, TET	Pele (1)
2128 (n=1)	NA	OXA, PEN, SXT, RIF, CIP, TET	Ferida cirúrgica (1)
2129 (n=1)	NA	OXA, PEN, ERY, CLI, CHL, CIP, TET, GEN	Ferida cirúrgica (1)
2130 (n=1)	71	OXA, PEN, ERY, CLI, SXT, RIF, CIP, TET, GEN	Orelhas (1)
2131 (n=1)	NA	OXA, PEN, ERY, CLI, SXT, RIF, TET	Ferida cirúrgica (1)
2164 (n=1)	NA	OXA, PEN, ERY, CLI, SXT, RIF, CHL, CIP, TET, GEN	Pele (1)

* NA = não se aplica

Dez perfis de alélicos diferentes foram identificados com a técnica de MLST, sendo nove destes pertencentes a novos STs (ST2124 – ST2131 e ST2164) (ver Tabela 6 e Figura 9). À análise de eBURST, dez isolados (ST71 e ST2130) fazem parte do CC71 (Figura 10e); o ST2124 foi relacionado ao CC2166 (Figura 10b); os STs 2125 e 2128 pareciam estar relacionados ao CC781 (Figura 10d), enquanto ST2127 estava mais próximo do CC558 – complexo clonal este que evoluiu a partir do CC781 (Figura 10d); os STs 2126 e 2131 foram relacionados ao *subfounder* ST1709 (Figura 10d); e, por fim, os STs 2129 e 2164 estão mais

próximos de CC1758 (Figura 10c). Análises estatísticas revelaram que o CC71 apresentou associação significativa à resistência à ciprofloxacina ($p < 0,05$).

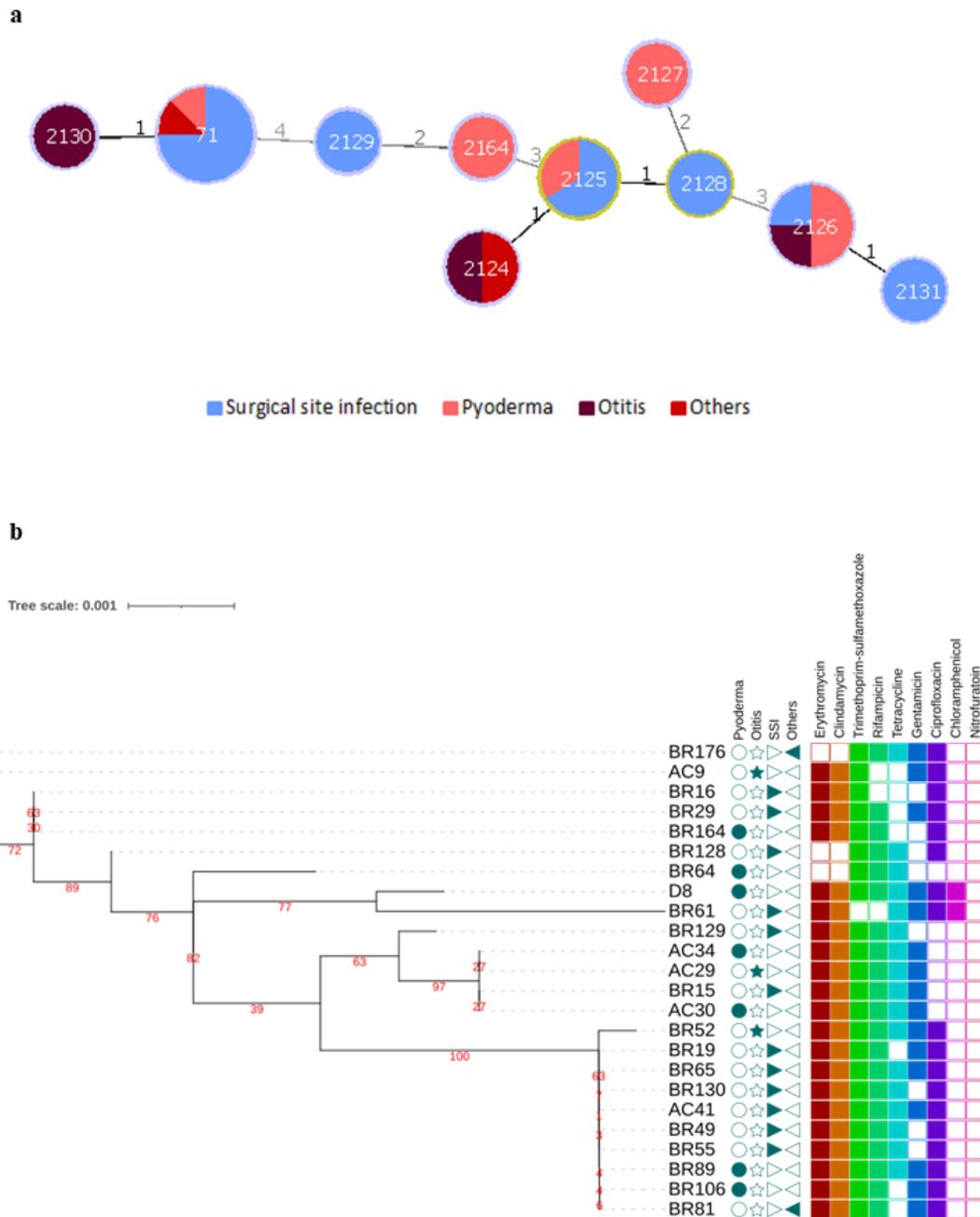


Figura 9 – Relação genética de estirpes MRSP de cães de Belo Horizonte (2017-2020). a) Snapshot da população de STs encontrados no presente estudo, utilizando-se a análise goeBURST full MST. Linhas e sombras indicam o número de variações alélicas entre os STs, e cores indicam o tipo de infecção relacionado a cada ST. b) Uma árvore filogenética baseada no alinhamento da sequência concatenada dos genes do MLST foi inferida utilizando-se o programa iqTree; probabilidades posteriores são mostradas em vermelho. Colunas com símbolos de triângulo, círculo e estrela indicam a apresentação clínica relacionada a cada isolado; colunas de quadrados coloridos indicam presença ou ausência de resistência a antimicrobianos de diferentes classes de não-beta-lactâmicos.

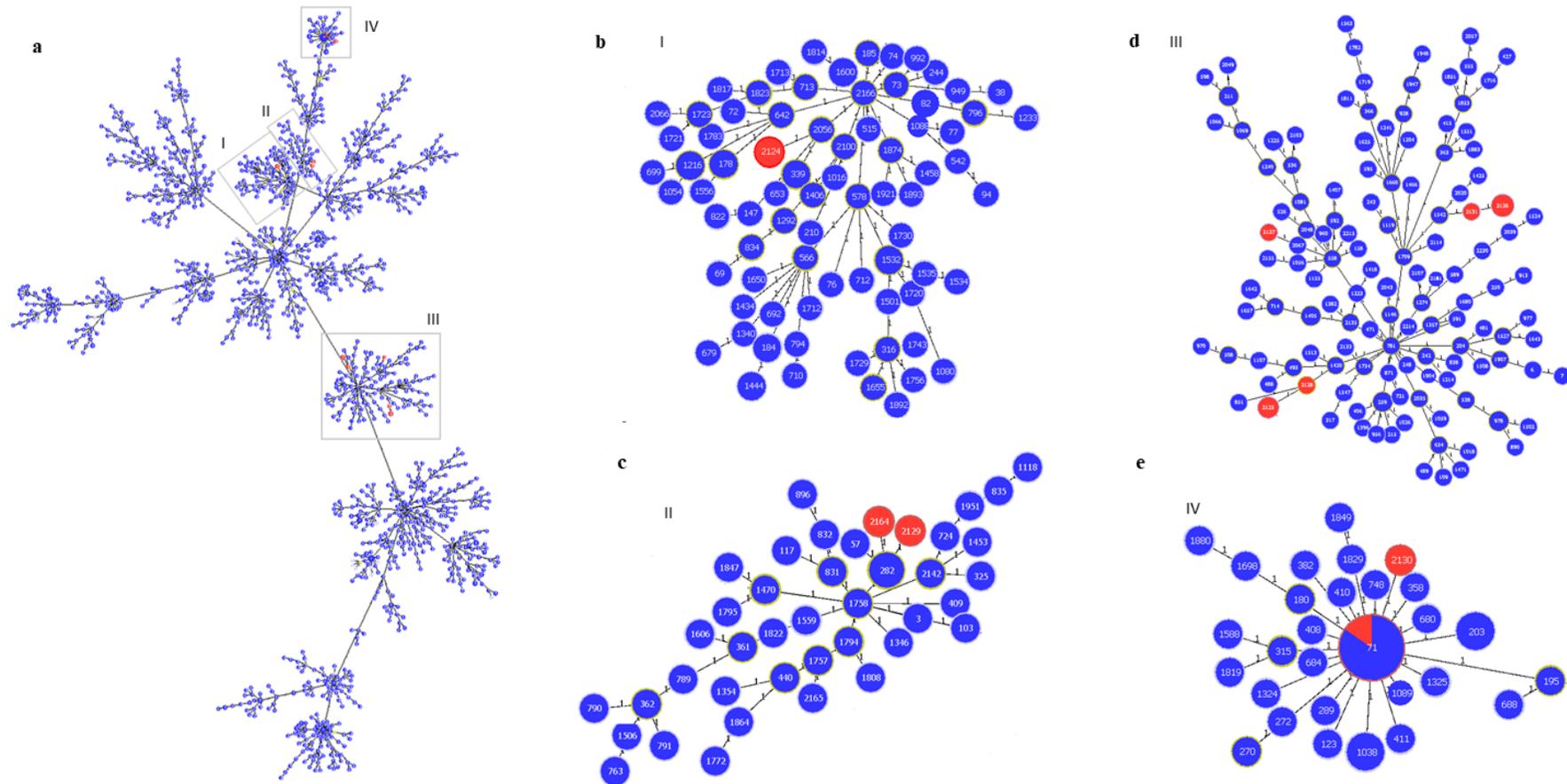


Figura 10 – Snapshot da população de *S. pseudintermedius* considerando-se variação de apenas um locus. A cor azul representa strain types de todo o mundo já encontrados e depositados no banco de dados do PubMLST e vermelho indica os STs MRSP identificados no presente estudo; **a)** Estrutura populacional principal de *S. pseudintermedius*. Clusters de isolados ligados indicam complexos clonais (CCs); singletons não demonstrados na figura. Caixas cinzas indicam a localizam dos STs identificados neste estudo. **b)** Snapshot do CC2166, ST2124 em vermelho. **c)** Snapshot do CC1758, com STs 2129 and 2164 em vermelho. **d)** Snapshot do CC781 e adjacentes, com STs 2125, 2126, 2127, 2128 e 2131 em vermelho. **e)** Snapshot do CC71 com STs 71 e 2130 em vermelho.

5.6 Fatores de risco para aquisição de MRSP

Não houve diferença significativa na proporção de estirpes MRSP entre cães fêmeas e machos ou entre grupos de idade. No entanto, o tratamento prévio com antimicrobianos (OR 9,21 IC 95% 2,05-41,25) e infecções adquiridas em ambiente hospitalar foram associados ao isolamento de MRSP. Ao se considerar a condição clínica apresentada pelos animais, infecções de sítio cirúrgico apresentaram associação estatisticamente significativa ao isolamento de MRSP: um cão com SSI foi mais propenso a carrear uma cepa MRSP do que uma MSSP (OR 3,7 IC 95% 1,5-9,4). Além disso, a chance de MRSP ser isolado de uma SSI foi maior do que ser isolada de infecções de pele, otites, infecção de trato geniturinário ou outras infecções ($p < 0,05$).

6. DISCUSSÃO

O presente trabalho identificou a ocorrência de espécies de estafilococos isoladas de diferentes sítios infecciosos em cães, por meio de técnicas diversas, e avaliou a resistência dessas estirpes aos antimicrobianos. Não houve diferença entre o número de animais incluídos no estudo quanto ao sexo. É interessante notar, porém, que mais de 95% dos animais eram adultos ou idosos, com média de idade acima dos sete anos. Apesar de não haver associação estatística significativa, a idade dos animais pode ser um fator que explica por que as infecções de pele e ouvidos foram as mais encontradas neste estudo. Infecções dermatológicas bacterianas geralmente apresentam caráter secundário a outras patologias – tais quais as alergopatias e endocrinopatias – e podem se tornar crônicas, o que justifica uma maior casuística em pacientes adultos (Fazakerley *et al.*, 2010; Bajwa, 2019).

A técnica de MALDI-TOF foi aplicada para a primeira identificação de todas as amostras sugestivas e apresentou boa resposta de determinação do gênero *Staphylococcus*. Esta é uma técnica de que permite a obtenção de resultados rápidos e com alta acurácia (Decristophoris *et al.*, 2011; van Duijkeren *et al.*, 2011; Morris *et al.*, 2017). Nisa *et al.* (2019) relataram alta sensibilidade e especificidade da técnica para a identificação de *S. pseudintermedius*. No presente estudo, apesar da técnica ter apresentado boa resposta quando comparada à técnica de PCR, muitas amostras do SIG foram identificadas erroneamente como *S. intermedius*. Há ainda muita controvérsia a respeito da capacidade do MALDI-TOF em diferenciar espécies do SIG e pode estar relacionado à falta de um banco de dados amplo e bem consolidado (Decristophoris *et al.*, 2011; Silva *et al.*, 2015). Para estes casos, indica-se o uso

de técnicas moleculares baseadas em PCR, para determinação correta da espécie isolada (Morris *et al.*, 2017).

Já para os isolados não-SIG, o uso do MALDI-TOF foi bastante satisfatório e conseguiu identificar de forma correta todas as espécies – incluindo os casos em que o *score* foi abaixo do ideal, o que foi comprovado pelo sequenciamento do gene *16S rRNA*. A escolha pelo sequenciamento deste gene como um segundo método de confirmação se deu devido à facilidade de aplicação, comparado à necessidade de se padronizar protocolos de PCR para oito espécies diferentes de estafilococos. O gene *16S rRNA* é uma região altamente conservada encontrada no genoma das bactérias, permitindo identificação de espécies de forma fácil (Ghebremedhin *et al.*, 2008; Kosecka-Strojek *et al.*, 2019).

Para o caso específico da amostra de *S. delphini* em que não houve concordância entre resultados de MALDI-TOF, PCR do gene *nuc* e sequenciamento do gene *16S rRNA*, foi necessário a aplicação de uma técnica adicional para confirmação definitiva da espécie. A técnica escolhida foi o sequenciamento do gene *rpoB*, pois este apresenta maior grau discriminatório quando comparado ao gene *16S rRNA* (Mellmann *et al.*, 2006).

S. pseudintermedius foi a espécie mais encontrada no presente estudo. Uma vez que este é o principal agente causador de piodermite em cães, é natural que a maioria dos espécimes clínicos tenham sido obtidos de lesões cutâneas (Bannoehr e Guardabassi, 2012; Hensel, Zabel e Hensel, 2016). A segunda espécie mais observada foi *S. schleiferi*, uma espécie raramente encontrada em portadores saudáveis, mas comumente isolada de cães com quadros de otite ou piodermite (Morris *et al.*, 2006; Morris *et al.*, 2017; Lee *et al.*, 2019). Houve ainda uma baixa ocorrência de *S. aureus* (2,3%), que vai de encontro à literatura; estudos relatam taxas de prevalência de até 10%, pois este agente não é usualmente considerado comensal da microbiota cutânea de cães (Duquette e Nuttall, 2004; Ma *et al.*, 2019; Ma *et al.*, 2020; Suepaul *et al.*, 2021). Observou-se que alguns animais foram co-infectados tanto por estirpes MSSP quanto por estirpes MRSP, ou mesmo por duas espécies diferentes de *Staphylococcus*, semelhante a relatos anteriores (Bannoehr e Guardabassi, 2012; Morris *et al.*, 2017). Como essas bactérias podem compartilhar MGE, é preocupante que isolados suscetíveis ou pouco virulentos possam adquirir genes de resistência e/ou virulência quando em contato com linhagens altamente virulentas/resistentes (Kadlec e Schwarz, 2012; Pomba *et al.*, 2016).

Altas taxas de resistência antimicrobiana foram observadas entre os isolados de SIG para a maioria dos antimicrobianos testados neste estudo. A AMR é considerada um fenômeno natural, mas o uso excessivo ou inadequado de antimicrobianos na medicina humana e veterinária acelera sua ocorrência (OIE, 2021). Mais da metade dos animais incluídos no estudo

foram previamente tratados com pelo menos um antimicrobiano sistêmico, o que pode estar relacionado às altas taxas de AMR encontradas; infelizmente, essa frequência não é surpreendente, considerando as principais manifestações clínicas apresentadas por estes cães. As infecções de pele são comumente vistas na rotina de atendimento de cães e gatos, sendo a principal razão para a administração de antimicrobianos em cães, e respondendo por quase um terço das prescrições de antimicrobianos em clínicas de pequenos animais (Larsen *et al.*, 2018). Da mesma forma, otites e infecções bacterianas do trato urinário são causas comuns de morbidade em cães e figuram entre as principais razões para o uso de antimicrobianos (Penna *et al.*, 2009; Weese *et al.*, 2019; Lynch e Helbig, 2021); e, por fim, as cirurgias, apesar de serem intervenções pontuais, frequentemente requerem a administração de antimicrobianos nos momentos pré- e pós-operatório (Nelson, 2011; BSAVA, 2018). Os principais antimicrobianos prescritos para os animais investigados foram cefalexina, amoxicilina ou amoxicilina/ácido clavulânico e enrofloxacin. Os beta-lactâmicos são comumente a classe antimicrobiana mais usada em pequenos animais, especialmente quando a cultura bacteriana não está disponível (Guardabassi *et al.*, 2013; Pomba *et al.*, 2016; Weese *et al.*, 2019).

Exceto para beta-lactâmicos lábeis à penicilinase, estirpes MSSP geralmente apresentam taxas satisfatórias de suscetibilidade antimicrobiana (Frank e Loeffler, 2012; Kadlec e Schwarz, 2012; Moodley, Damborg e Nielsen, 2014; McCarthy *et al.*, 2015). No entanto, nossos resultados revelaram altas taxas de resistência antimicrobiana a diversas classes – incluindo agentes antimicrobianos considerados de importância crítica para a veterinária (OIE, 2018) – tanto em estirpes MRSP quanto MSSP, com uma alta taxa de ocorrência de multirresistência. Além disso, foi observada altas taxas de resistência para antimicrobianos como as tetraciclinas e sulfonamidas, classes amplamente utilizadas na medicina veterinária no Brasil. Em contrapartida, cloranfenicol e nitrofurantoína foram os antimicrobianos com maiores taxas de suscetibilidade entre os isolados de *S. pseudintermedius*, o que não é uma surpresa, visto que ambos são proibidos para uso veterinário no Brasil (Brasil, 2003).

Já em relação aos isolados não-SIG, à exceção da penicilina, as taxas de resistência encontradas para demais antimicrobianos foi baixa ou até inexistente, sendo apenas 6,9% dos isolados considerados MDR. Estudos conduzidos na Europa indicaram uma alta prevalência de resistência antimicrobiana entre estes isolados, em especial CoNS, (Hrictu *et al.*, 2020; Suepaul *et al.*, 2021). No Brasil, Penna *et al.* (2009; 2010) e Teixeira, Ferreira e Penna (2019) encontraram uma alta prevalência de espécies não-SIG multirresistentes, incluindo cepas resistentes à meticilina, no estado do Rio de Janeiro, dentre cães saudáveis e cães com quadros de piodermite ou otite. Considerando os resultados obtidos no presente trabalho estudo, pode-

se inferir que espécies não-SIG ainda não apresentam grande relevância na casuística de cães acometidos por infecções estafilocócicas na cidade de Belo Horizonte. É interessante, entretanto, que isto seja acompanhado a longo prazo, a fim de se observar possíveis mudanças.

O presente estudo identificou ainda uma ocorrência geral de 24,5% de MRSP entre todos os isolados de *S. pseudintermedius*, o que está dentro do esperado, uma vez que a literatura relata taxas de prevalência de MRSP em cães variando de 0% a 60% (Weese e van Duijkeren, 2010; van Duijkeren *et al.*, 2011; dos Santos *et al.*, 2016). Estudos anteriores realizados no Brasil mostraram taxas semelhantes ou superiores de MRSP em animais com piodermite, otite ou infecções de trato urinário (Penna *et al.*, 2009; Penna *et al.*, 2010; Botoni *et al.*, 2016; Bourguignon *et al.*, 2016; Scherer *et al.*, 2018), quando comparado ao presente trabalho. É importante ressaltar que as comparações entre diferentes estudos não são fáceis de serem feitas, uma vez que a prevalência da MRSP depende não só da região geográfica, mas também do tipo de amostra, da população incluída e da metodologia do estudo (Bannoehr e Guardabassi, 2012).

Curiosamente, mais de 90% das estirpes de *S. pseudintermedius* isoladas de feridas cirúrgicas foram MRSP. A análise estatística revelou que SSIs, tratamento antimicrobiano prévio e infecções nosocomiais foram associados à ocorrência de MRSP nos cães amostrados. O achado está em consonância com a literatura, que demonstrou que a exposição prévia a antimicrobianos, hospitalização e lesões de pele e/ou feridas cirúrgicas estão associadas a um maior risco de aquisição de MRSP (van Duijkeren *et al.*, 2011; Weese, *et al.*, 2012; Grönthal *et al.*, 2014; Grönthal *et al.*, 2017; Saputra *et al.*, 2017). Além disso, é possível que o uso frequente de amoxicilina/ácido clavulânico, cefalosporinas e fluorquinolonas especificamente – que foram os principais antimicrobianos prescritos aos cães incluídos neste estudo – possa estar relacionado à seleção de MRSP (Guardabassi *et al.*, 2013; Pomba *et al.*, 2013; Pomba *et al.*, 2016).

Estudos anteriores utilizando a técnica de MLST forneceram informações sobre a estrutura populacional de estirpes MRSP e demonstraram que a disseminação desse patógeno está ligada a algumas linhagens clonais bem-sucedidas, com destaque para os complexos clonais CC71 e CC258 na Europa, CC68 na América do Norte, e ambos CC45 e CC112 na Ásia (Perreten *et al.*, 2010; Dos Santos *et al.*, 2016; Meroni *et al.*, 2019). No Brasil, pouco se sabe sobre a estrutura populacional de *S. pseudintermedius*, visto que não há estudos suficientes buscando explorar o assunto. Sabe-se, entretanto, que há a circulação do CC71 no país; Quitoco *et al.* (2013) relataram a ocorrência de uma única estirpe MRSP ST71, isolada da mucosa nasal de um cão saudável, e Motta (2018) encontrou uma prevalência de 86,2% do CC71 dentre amostras MRSP de cães doentes analisadas pela mesma – ambos no estado do Rio de

Janeiro. No presente trabalho, cerca de 41,6% das cepas MRSP pertenciam ao CC71 (STs 71 e 2130), o mesmo CC previamente relatado. Estudos demonstraram que o CC71 é frequentemente resistente a todos os antimicrobianos de uso na rotina de pequenos animais, incluindo macrolídeos, aminoglicosídeos e fluorquinolonas; além disso, entre os antimicrobianos beta-lactâmicos, pode estar associado a taxas mais altas de resistência à oxacilina, amoxicilina/clavulanato, cefalotina e ampicilina (Paul *et al.*, 2011; Duim *et al.*, 2016; Wegener *et al.*, 2020). Todas as estirpes pertencentes ao CC71, encontradas no presente trabalho, foram resistentes a pelo menos seis classes de antimicrobianos não beta-lactâmicos, incluindo as fluorquinolonas – classe que está associada à disseminação bem-sucedida de linhagens MRSP MDR (McCarthy *et al.*, 2015). Estes achados indicam que o complexo clonal em questão apresenta sucesso em sua dispersão e, possivelmente, pode ser encontrado em outros estados e regiões do país. A maioria das cepas CC71 foram isoladas de infecções de sítio cirúrgico e provenientes do HV-UFGM, o que levantou a preocupação de uma possível transmissão nosocomial, conforme relatado anteriormente (Grönthal *et al.*, 2014), mas uma caracterização molecular adicional é necessária para confirmar essa hipótese.

Em contrapartida, estudos recentes na Europa, América do Norte e Oceania mostraram também que a prevalência de novas linhagens clonais está aumentando e possivelmente superará a prevalência do CC71 dentro de alguns anos (Duim *et al.*, 2016; Bergot *et al.*, 2018; Grönthal *et al.*, 2017; Meroni *et al.*, 2019; Nisa *et al.*, 2019). No presente trabalho, 62,5% (15/24) das estirpes MRSP pertenciam a nove novos STs. Todos os STs foram resistentes a pelo menos três classes diferentes de antimicrobianos não beta-lactâmicos e alguns deles foram isolados de mais de um animal. Motta (2018) relatou a identificação de estirpes ST282 e ST265; apesar de não serem novas no contexto mundial, não pertencem aos principais CCs relatados na literatura. Curiosamente, à análise do eBURST, dois STs encontrados no presente estudo – STs 2129 e 2164 – parecem ser evoluções diretas do ST282. Essa observação corrobora com a hipótese de que eventos de transferência gênica horizontal podem ser tão relevantes quanto a dispersão clonal para disseminação de MRSP e também destaca a necessidade de mais estudos no Brasil para melhor compreender a evolução dessas novas linhagens (Bannoehr e Guadabassi, 2012; Pires dos Santos *et al.*, 2016; Duim *et al.*, 2016; Grönthal *et al.*, 2017)

Este é o primeiro estudo realizado em Minas Gerais que investigou extensivamente as características fenotípicas e moleculares de isolados de *S. pseudintermedius* resistentes à meticilina. Além disso, este trabalho identificou fatores de risco para aquisição da MRSP e analisou a estrutura populacional das cepas da MRSP, o que contribui para o entendimento da

dispersão da MRSP não só no Brasil, mas também na América do Sul, onde ainda há carência de informações a respeito.

7. CONCLUSÃO

O presente estudo confirmou que *S. pseudintermedius* é a principal espécie de estafilococos isolada de cães infectados em Belo Horizonte. A alta taxa de MDR observada, especialmente cepas MRSP-MDR, é de grande preocupação. O CC71 está circulando em clínicas veterinárias e representa um grande desafio para os protocolos terapêuticos devido à sua resistência à maioria das classes de antimicrobianos de uso diário na prática de pequenos animais e sua dispersão bem-sucedida. Apesar disso, os novos STs encontrados neste estudo indicam que a disseminação de MRSP via transferência horizontal de genes pode ser tão relevante quanto a dispersão clonal. Até onde sabemos, este é o primeiro estudo brasileiro que identificou o MRSP ST71 em cães doentes e revelou novos STs em circulação no país. A implementação de programas de vigilância, protocolos de controle de infecção em clínicas veterinárias e administração de antimicrobianos são essenciais para o controle eficaz da MRSP.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALGAMMAL, Abdelazeem M. *et al.* Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA): One health perspective approach to the bacterium epidemiology, virulence factors, antibiotic-resistance, and zoonotic impact. *Infection and Drug Resistance*, v. 13, p. 3255–3265, 2020.
- BADGER, Skye *et al.* Diagnostic accuracy of phenotypic assays for determining antimicrobial resistance status in *Staphylococcus pseudintermedius* isolates from canine clinical cases. *Veterinary Microbiology*, v. 234, n. December 2018, p. 101–109, 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2019.05.024>>.
- BAJWA, Jangi. Canine otitis externa - Treatment and complications. *The Canadian veterinary journal*, v. 60, n. 1, p. 97–99, 2019.
- BANNOEHR, Jeanette *et al.* Molecular diagnostic identification of *Staphylococcus pseudintermedius*. *Journal of Clinical Microbiology*, v. 47, n. 2, p. 469–471, 2009.
- BANNOEHR, Jeanette; GUARDABASSI, Luca. *Staphylococcus pseudintermedius* in the dog: Taxonomy, diagnostics, ecology, epidemiology and pathogenicity. *Veterinary Dermatology*, v. 23, n. 4, 2012.
- BECKER, Karsten *et al.* Thermonuclease gene as a target for specific identification of *Staphylococcus intermedius* isolates: Use of a PCR-DNA enzyme immunoassay. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, v. 51, n. 4, p. 237–244, 2005.
- BEMIS, David A. *et al.* Evaluation of susceptibility test breakpoints used to predict mecA-mediated resistance in *Staphylococcus pseudintermedius* isolated from dogs. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, v. 21, n. 1, p. 53–58, 2009.
- BERGOT, Marine *et al.* Evolution of the population structure of *Staphylococcus pseudintermedius* in France. *Frontiers in Microbiology*, v. 9, p. 1–10, 2018.
- BLONDEAU, L. D. *et al.* Persistent infection with *Staphylococcus pseudintermedius* in an adult oncology patient with transmission from a family dog. *Journal of Chemotherapy*, v. 0, n. 0, p. 1–5, 2020. <https://doi.org/10.1080/1120009X.2020.1735142>
- BLOOM, Paul. Canine superficial bacterial folliculitis: current understanding of its etiology, diagnosis and treatment. *Veterinary Journal*. [S.l.], 2014. <http://dx.doi.org/10.1016/j.tvjl.2013.11.014>
- BORIO, Stefano *et al.* Effectiveness of a combined (4% chlorhexidine digluconate shampoo and solution) protocol in MRS and non-MRS canine superficial pyoderma: A randomized, blinded, antibiotic-controlled study. *Veterinary Dermatology*, v. 26, n. 5, p. 339-e72, 2015.
- BOTONI, Larissa S. *et al.* Prevalence and in vitro susceptibility of methicillin-resistant *Staphylococcus pseudintermedius* (MRSP) from skin and nostrils of dogs with superficial pyoderma. *Pesquisa Veterinaria Brasileira*, v. 36, n. 12, p. 1178–1180, 2016.
- BOURGUIGNON, E. *et al.* Description of methicillin-resistant *Staphylococcus pseudintermedius* from canine pyoderma in Minas Gerais State, Brazil. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.*, v.68, n.2, p.299-306, 2016.

BRASIL. Ministério de Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução normativa n. 9 de 27 de junho de 2003. Brasília. Diário oficial da União, Seção 1, p. 4., 2003.

British Small Animal Veterinary Association. BSAVA/SAMSoc Guide to Responsible Use of Antibacterials: PROTECT ME. 2018. Disponível em <<https://www.bsavalibrary.com/content/book/10.22233/9781910443644#overview>>. Acesso em setembro de 2021.

CANNING, Benjamin *et al.* Thermonuclease test accuracy is preserved in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates. *Journal of Medical Microbiology*, v. 69, n. 4, p. 548–551, 2020.

CARROLL, Karen C.; BURNHAM, Carey-Ann D.; WESTBLADE, Lars F. From canines to humans: Clinical importance of *Staphylococcus pseudintermedius*. *PLOS Pathogens*, v. 17, n. 12, p. e1009961, 2021. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1371/journal.ppat.1009961>>.

CLARK, S. M.; LOEFFLER, A.; BOND, R. Susceptibility in vitro of canine methicillin-resistant and susceptible staphylococcal isolates to fusidic acid, chlorhexidine and miconazole: opportunities for topical therapy of canine superficial pyoderma. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, v. 70, n. 7, p. 2048–2052, 2015.

CLARK, Siân Marie *et al.* Interaction of chlorhexidine with tris EDTA or miconazole in vitro against canine methicillin-resistant and-susceptible *Staphylococcus pseudintermedius* isolates from two UK regions. *Veterinary Dermatology*, v. 27, n. 5, 2016.

CLSI. Performance standards for antimicrobial disk and dilution susceptibility tests for bacteria isolated from animal. 5th ed. CLSI supplement VET01S. Clinical and Laboratory Standards Institute, 2020.

CLSI. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing. 31th ed. CLSI supplement M100. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute, 2021.

DECRISTOPHORIS, Paola *et al.* Identification of *Staphylococcus intermedius* Group by MALDI-TOF MS. *Systematic and Applied Microbiology*, v. 34, n. 1, p. 45–51, 2011. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.syapm.2010.11.004>>.

DEVRIESE, Luc A. *et al.* *Staphylococcus pseudintermedius* sp. nov., a coagulase-positive species from animals. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, v. 55, n. 4, p. 1569–1573, 2005.

DEVRIESE, Luc A. *et al.* *Staphylococcus pseudintermedius* versus *Staphylococcus intermedius*. *Veterinary Microbiology*, v. 133, n. 1–2, p. 206–207, 2009.

DUIM, Birgitta *et al.* Changes in the population of methicillin-resistant *Staphylococcus pseudintermedius* and dissemination of antimicrobial-resistant phenotypes in the Netherlands. *Journal of Clinical Microbiology*, v. 54, n. 2, p. 283–288, 2016.

DUQUETTE, R. A.; NUTTALL, T. J. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in dogs and cats: An emerging problem? *Journal of Small Animal Practice*, v. 45, n. 12, p. 591–597, 2004.

FADOK, Valerie A.; IRWIN, Katherine. Sodium hypochlorite/salicylic acid shampoo for treatment of canine staphylococcal pyoderma. *Journal of the American Animal Hospital Association*, v. 55, n. 3, p. 117–123, 2019.

- FAZAKERLEY, Jennifer *et al.* Heterogeneity of *Staphylococcus pseudintermedius* isolates from atopic and healthy dogs. *Veterinary Dermatology*, v. 21, n. 6, p. 578–585, 2010.
- ERENCE, Elisabeth H. *et al.* Zoonotic *Staphylococcus pseudintermedius* sinonasal infections: risk factors and resistance patterns. *International Forum of Allergy and Rhinology*, v. 9, n. 7, p. 724–729, 2019.
- FOX J. G. *et al.* *Helicobacter hepaticus* infection in mice: models for understanding lower bowel inflammation and cancer. *Mucosal Immunol*, 2011. 422–30.10.1038/mi.2010.61
- FRANCISCO, Alexandre P. *et al.* Global optimal eBURST analysis of multilocus typing data using a graphic matroid approach. *BMC Bioinformatics*, v. 10, p. 1–15, 2009. Disponível em <<https://doi.org/10.1186/1471-2105-10-152>>.
- FRANK, Linda A.; LOEFFLER, Anette. Methicillin-resistant *Staphylococcus pseudintermedius*: Clinical challenge and treatment options. *Veterinary Dermatology*, v. 23, n. 4, 2012.
- FROSINI, S. M. *et al.* Genetic resistance determinants to fusidic acid and chlorhexidine in variably susceptible staphylococci from dogs. *BMC Microbiology*, v. 19, n. 1, p. 1–10, 2019.
- FUTAGAWA-SAITO, Keiko *et al.* Prevalence of virulence factors in *Staphylococcus intermedius* isolates from dogs and pigeons. *BMC Veterinary Research*, v. 2, p. 5–8, 2006.
- GAGETTI, Paula *et al.* Identification and molecular epidemiology of methicillin resistant *Staphylococcus pseudintermedius* strains isolated from canine clinical samples in Argentina. *BMC Veterinary Research*, v. 15, n. 1, p. 1–12, 2019.
- GAGETTI, Paula *et al.* Characterization of the first *mecA*-positive multidrug-resistant *Staphylococcus pseudintermedius* isolated from an Argentinian patient. *Microbial Drug Resistance*, v. 00, n. 00, p. 1–5, 2020.
- GHEBREMEDHIN, Beniam *et al.* Genetic classification and distinguishing of *Staphylococcus* species based on different partial gap, 16S rRNA, hsp60, rpoB, sodA, and tuf gene sequences. *Journal of Clinical Microbiology*, v. 46, n. 3, p. 1019–1025, 2008.
- GODBEER, Stacey M.; GOLD, Randi M.; LAWHON, Sara D. Prevalence of mupirocin resistance in *Staphylococcus pseudintermedius*. *Journal of Clinical Microbiology*, v. 52, n. 4, p. 1250–1252, 2014.
- GRIFFETH, Gregory C. *et al.* Screening for skin carriage of methicillin-resistant coagulase-positive staphylococci and *Staphylococcus schleiferi* in dogs with healthy and inflamed skin. *Veterinary Dermatology*, v. 19, n. 3, p. 142–149, 2008.
- GRÖNTHAL, Thomas *et al.* Large outbreak caused by methicillin resistant *Staphylococcus pseudintermedius* ST71 in a Finnish veterinary teaching hospital - From outbreak control to outbreak prevention. *PLoS ONE*, v. 9, n. 10, 2014.
- GRÖNTHAL, Thomas *et al.* Antimicrobial resistance in *Staphylococcus pseudintermedius* and the molecular epidemiology of methicillin-resistant *S. pseudintermedius* in small animals in Finland. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, v. 72, n. 4, p. 1021–1030, 2017.

- GUARDABASSI, Luca *et al.* Public health impact and antimicrobial selection of methicillin-resistant staphylococci in animals. *Journal of Global Antimicrobial Resistance*, v. 1, n. 2, p. 55–62, 2013. Disponível em <<http://dx.doi.org/10.1016/j.jgar.2013.03.011>>.
- HAENNI, Marisa *et al.* High genetic diversity among methicillin-susceptible *Staphylococcus pseudintermedius* in dogs in Europe. *Journal of Global Antimicrobial Resistance*, v. 21, n. 20, p. 57–59, 2020. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.jgar.2020.02.016>>.
- HAJEK, V. *Staphylococcus intermedius*, a new species isolated from animals. *International Journal of Systematic Bacteriology*, v. 26, n. 4, p. 401–408, 1976.
- HEADLEY, S. A. *et al.* Pyogenic ventriculitis and ventricular empyema associated with *Staphylococcus pseudintermedius* in a puppy. *Journal of Comparative Pathology*, v. 156, n. 2–3, p. 152–157, 2017.
- HENSEL, Nao; ZABEL, Sonja; HENSEL, Patrick. Prior antibacterial drug exposure in dogs with methicillin-resistant *Staphylococcus pseudintermedius* (MRSP) pyoderma. *Veterinary Dermatology*, v. 27, n. 2, p. 72-e20, 2016.
- HILLIER, Andrew *et al.* Guidelines for the diagnosis and antimicrobial therapy of canine superficial bacterial folliculitis (Antimicrobial Guidelines Working Group of the International Society for Companion Animal Infectious Diseases). *Veterinary Dermatology*, v. 25, n. 3, 2014.
- HOLMSTRÖM, Thérèse C. N. *et al.* Methicillin-resistant *Staphylococcus pseudintermedius*: an underestimated risk at pet clinic. *Revista Brasileira de Medicina Veterinária*, v. 52, n. 1, p. 6–11, 2020.
- HRITCU, Ozana M. *et al.* Geographical variations in virulence factors and antimicrobial resistance amongst staphylococci isolated from dogs from the United Kingdom and Romania. *Frontiers in Veterinary Science*, v. 7, p. 1–10, 2020.
- JARADAT, Ziad W. *et al.* Methicillin Resistant *Staphylococcus aureus* and public fomites: a review. *Pathogens and Global Health*, v. 00, n. 00, p. 1–25, 2020. Disponível em: <<https://doi.org/10.1080/20477724.2020.1824112>>.
- KADLEC, Kristina; SCHWARZ, Stefan. Antimicrobial resistance of *Staphylococcus pseudintermedius*. *Veterinary Dermatology*, v. 23, n. 4, p. 19–25, 2012.
- KANG, Jung Hun; HWANG, Cheol Yong. One health approach to genetic relatedness in SCCmec between methicillin-resistant *Staphylococcus* isolates from companion dogs with pyoderma and their owners. *Veterinary Microbiology*, v. 253, p. 108957, 2021. Disponível em <<https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2020.108957>>.
- KOSECKA-STROJEK, Maja *et al.* Development and validation of a reference data set for assigning *Staphylococcus* species based on next-generation sequencing of the 16S-23S rRNA Region. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, v. 9, n. August, p. 1–19, 2019.
- KRAPF, Martina *et al.* Molecular characterisation of methicillin-resistant *Staphylococcus pseudintermedius* from dogs and the description of their SCCmec elements. *Veterinary Microbiology*, v. 233, p. 196–203, 2019. Disponível em <<https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2019.04.002>>.

- LAARHOVEN, Laura M. *et al.* Longitudinal study on methicillin-resistant *Staphylococcus pseudintermedius* in households. *PLoS ONE*, v. 6, n. 11, p. 1–6, 2011.
- LARSEN, Rikke Friis *et al.* Diversity of *Staphylococcus pseudintermedius* in carriage sites and skin lesions of dogs with superficial bacterial folliculitis: potential implications for diagnostic testing and therapy. *Veterinary Dermatology*, v. 29, n. 4, p. 291-e100, 2018.
- LEE, Gi Yong *et al.* Carriage of *Staphylococcus schleiferi* from canine otitis externa: antimicrobial resistance profiles and virulence factors associated with skin infection. *Journal of Veterinary Science*, v. 20, n. 2, p. 1–11, 2019.
- LETUNIC, I.; BORK, P. Interactive Tree of Life (iTOL) v4: recent updates and new developments, *Nucleic Acids Research*, Volume 47, Issue W1, 02 July 2019, Pages W256–W259 <https://doi.org/10.1093/nar/gkz239>
- LOZANO, Carmen *et al.* *Staphylococcus pseudintermedius* human infection cases in Spain: dog-to-human transmission. *Vector-Borne and Zoonotic Diseases*, v. 17, n. 4, p. 268–270, 2017.
- LYNCH, Stephanie A.; HELBIG, Karla J. The complex diseases of *Staphylococcus pseudintermedius* in canines: Where to next? *Veterinary Sciences*, v. 8, n. 1, p. 1–19, 2021.
- MA, Gemma C. *et al.* Molecular characterization of community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* from pet dogs. *Zoonoses and Public Health*, v. 67, n. 3, p. 222–230, 2019.
- MA, Gemma C. *et al.* Commensal staphylococci including methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* from dogs and cats in remote New South Wales, Australia. *Microbial Ecology*, v. 79, n. 1, p. 164–174, 2020. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1007/s00248-019-01382-y>>.
- MARSELLA, R. Advances in our understanding of canine atopic dermatitis. *Veterinary Dermatology*, v. 32, n. 6, p. 547-e151, 2021.
- MCCARTHY, Alex J. *et al.* Genomic insights into the rapid emergence and evolution of MDR in *Staphylococcus pseudintermedius*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, v. 70, n. 4, p. 997–1007, 2015.
- MELLMANN, Alexander *et al.* Sequencing and Staphylococci Identification. *Emerging Infectious Diseases*, v. 12, n. 2, p. 333-336, 2006.
- MERONI, Gabriele *et al.* Investigation on antibiotic-resistance, biofilm formation and virulence factors in multidrug resistant and non-multidrug resistant *Staphylococcus pseudintermedius*. *Microorganisms*, v. 7, n. 12, 2019.
- MERONI, Gabriele *et al.* In vitro efficacy of essential oils from *Melaleuca alternifolia* and *Rosmarinus officinalis*, Manuka Honey-based gel, and propolis as antibacterial agents against canine *Staphylococcus pseudintermedius* strains. *Antibiotics*, v. 9, n. 6, p. 344, 2020.
- MIHN, Bui. Q. *et al.* IQ-TREE 2: New models and efficient methods for phylogenetic inference in the genomic era. *Mol Biol. Evol*, 37:1530-1534, 2020. Disponível <<https://doi.org/10.1093/molbev/msaa015>>.
- MOODLEY, Arshnee; DAMBORG, Peter; NIELSEN, Søren Saxmose. Antimicrobial resistance in methicillin susceptible and methicillin resistant *Staphylococcus pseudintermedius*

of canine origin: Literature review from 1980 to 2013. *Veterinary Microbiology*, v. 171, n. 3–4, p. 337–341, 2014. Disponível em <<http://dx.doi.org/10.1016/j.vetmic.2014.02.008>>.

MOODLEY, Arshnee *et al.* Isolation and characterization of bacteriophages active against methicillin-resistant *Staphylococcus pseudintermedius*. *Research in Veterinary Science*, v. 122, n. November 2018, p. 81–85, 2019.

MORRIS, Daniel O. *et al.* Screening of *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus intermedius*, and *Staphylococcus schleiferi* isolates obtained from small companion animals for antimicrobial resistance: A retrospective review of 749 isolates (2003-04). *Veterinary Dermatology*, v. 17, n. 5, p. 332–337, 2006.

MORRIS, Daniel O. *et al.* The prevalence of carriage of methicillin-resistant staphylococci by veterinary dermatology practice staff and their respective pets. *Veterinary Dermatology*, v. 21, n. 4, p. 400–407, 2010.

MORRIS, Daniel O. *et al.* Recommendations for approaches to methicillin-resistant staphylococcal infections of small animals: diagnosis, therapeutic considerations and preventative measures. Clinical Consensus Guidelines of the World Association for Veterinary Dermatology. *Veterinary Dermatology*, v. 28, n. 3, 2017.

MOTTA, Cássia Couto da. **Ocorrência, resistência, virulência e diversidade genética de de companhia.** 2018. 90 p. Tese (Doutorado em Ciências Veterinárias). Instituto de Veterinária, Departamento de Parasitologia Animal, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2018.

MURAKAMI, Kazuhisa *et al.* Identification of Methicillin-Resistant Strains of Staphylococci by Polymerase Chain Reaction. *American Journal of Clinical Pathology*, v. 29, n. 10, p. 2240–2244, 1991. Disponível em <<https://jcm.asm.org/content/29/10/2240>>.

MURRAY Aimee K. *et al.* *Staphylococcus cornubiensis* sp. nov., a member of the *Staphylococcus intermedius* group (SIG). *Int J Syst Evol Microbiol* v.68: p. 3404–3408, 2018.

NASCIMENTO, Marta *et al.* PHYLOViZ 2.0: Providing scalable data integration and visualization for multiple phylogenetic inference methods. *Bioinformatics*, v. 33, n. 1, p. 128–129, 2017.

NAZARALI, Alim *et al.* Association between methicillin-resistant *Staphylococcus pseudintermedius* carriage and the development of surgical site infections following tibial plateau leveling osteotomy in dogs. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, v. 247, n. 8, p. 909–916, 2015.

NELSON, Laura L. Surgical site infections in small animal surgery. *Veterinary Clinics of North America - Small Animal Practice*, v. 41, n. 5, p. 1041–1056, 2011. Disponível em <<http://dx.doi.org/10.1016/j.cvsm.2011.05.010>>.

NISA, Shahista *et al.* Combining MALDI-TOF and genomics in the study of methicillin resistant and multidrug resistant *Staphylococcus pseudintermedius* in New Zealand. *Scientific Reports*, v. 9, n. 1, p. 1–13, 2019.

Organização Mundial da Saúde (OMS). Critically important antimicrobials for human medicine, 6th revision. Geneva: World Health Organization; 2019. Licence: CC BY-NC-SA 3.0 IGO.

Organização Mundial de Saúde Animal (OIE). Antimicrobial resistance. Disponível em <<https://www.oie.int/en/what-we-do/global-initiatives/antimicrobial-resistance/>>. Acesso em nov de 2021.

Organização Mundial de Saúde Animal (OIE). Oie List of Antimicrobial Agents of Veterinary Importance. OIE Int Commitee. May 2018.

ONUMA, Kenta; TANABE, Taishi; SATO, Hisaaki. Antimicrobial resistance of *Staphylococcus pseudintermedius* isolates from healthy dogs and dogs affected with pyoderma in Japan. *Veterinary Dermatology*, v. 23, n. 1, p. 17–23, 2012.

PAUL, Narayan. C. *et al.* Carriage of methicillin-resistant *Staphylococcus pseudintermedius* in small animal veterinarians: Indirect evidence of zoonotic transmission. *Zoonoses and Public Health*, v. 58, n. 8, p. 533–539, 2011.

PAUL, Narayan C. *et al.* *Staphylococcus pseudintermedius* colonization patterns and strain diversity in healthy dogs: A cross-sectional and longitudinal study. *Veterinary Microbiology*, v. 160, n. 3–4, p. 420–427, 2012.

PENNA, Bruno *et al.* Species distribution and antimicrobial susceptibility of staphylococci isolated from canine otitis externa. *Veterinary Dermatology*, v. 21, n. 3, p. 292–296, 2009.

PENNA, Bruno *et al.* In vitro antimicrobial resistance of staphylococci isolated from canine urinary tract infection. *Canadian Veterinary Journal*, v. 51, n. 7, p. 738–742, 2010.

PERRETEN, Vincent *et al.* Clonal spread of methicillin-resistant *Staphylococcus pseudintermedius* in Europe and North America: An international multicentre study. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, v. 65, n. 6, p. 1145–1154, 2010.

PIRES DOS SANTOS, Teresa *et al.* Systematic review on global epidemiology of methicillin-resistant *Staphylococcus pseudintermedius*: Inference of population structure from multilocus sequence typing data. *Frontiers in Microbiology*, v. 7, p. 1–12, 2016.

PITCHENIN, Leticia Camara *et al.* Occurrence of toxin genes in *Staphylococcus pseudintermedius* from diseased dogs and other domestic and wild species. *Journal of Infection in Developing Countries*, v. 11, n. 12, p. 957–961, 2017.

PITCHER, D. G.; SAUNDERS, N. A.; OWEN, R. J. Rapid extraction of bacterial genomic DNA with guanidium thiocyanate. *Letters in Applied Microbiology*, v. 8, n. 4, p. 151–156, 1989.

POMBA, Constança *et al.* Public health risk of antimicrobial resistance transfer from companion animals. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, v. 72, n. 4, p. 957–968, 2016.

QUITOCO, Isidório M. Z. *et al.* First report in South America of companion animal colonization by the USA1100 clone of community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (ST30) and by the European clone of methicillin-resistant *Staphylococcus pseudintermedius* (ST71). *BMC Research Notes*, v. 6, n. 1, 2013.

- RUBIN, Joseph E.; CHIRINO-TREJO, Manuel. Prevalence, sites of colonization, and antimicrobial resistance among *Staphylococcus pseudintermedius* isolated from healthy dogs in Saskatoon, Canada. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, v. 23, n. 2, p. 351–354, 2011.
- SAMBROOK, J.; FRITSCH, E. F.; MANIATIS, T. Molecular cloning: a laboratory manual. 2.ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989. 3v
- SAPUTRA, Sugiyono *et al.* Antimicrobial resistance in coagulase-positive staphylococci isolated from companion animals in Australia: A one year study. *PLOS ONE*, v. 12, n. 4, p. e0176379, 2017.: Disponível em <<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0176379>>.
- SASAKI, Takashi *et al.* Reclassification of phenotypically identified *Staphylococcus intermedius* strains. *Journal of Clinical Microbiology*, v. 45, n. 9, p. 2770–2778, 2007.
- SASAKI, Takashi *et al.* Multiplex-PCR method for species identification of coagulase-positive staphylococci. *Journal of Clinical Microbiology*, v. 48, n. 3, p. 765–769, 2010.
- SCHERER, Carolina Boesel *et al.* Frequency and antimicrobial susceptibility of *Staphylococcus pseudintermedius* in dogs with otitis externa. *Ciencia Rural*, v. 48, n. 4, 2018.
- SCHMIDT, Vanessa M. *et al.* Antimicrobial resistance and characterisation of staphylococci isolated from healthy Labrador retrievers in the United Kingdom. *BMC Veterinary Research*, v. 10, 2014.
- SHOEN, Hanna R.C. *et al.* Analysis of *Staphylococcus* infections in a veterinary teaching hospital from 2012 to 2015. *Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases*, v. 66, n. June, p. 101332, 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.cimid.2019.101332>>.
- SILVA, Marcella Braga *et al.* An evaluation of matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry for the identification of *Staphylococcus pseudintermedius* isolates from canine infections. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, v. 27, n. 2, p. 231–235, 2015.
- SMITH, Joshua T. *et al.* Population genomics of *Staphylococcus pseudintermedius* in companion animals in the United States. *Communications Biology*, v. 3, n. 1, 2020. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1038/s42003-020-1009-y>>.
- SOIMALA, Tanawan *et al.* Molecular and phenotypic characterization of methicillin-resistant *Staphylococcus pseudintermedius* from ocular surfaces of dogs and cats suffering from ophthalmological diseases. *Veterinary Microbiology*, v. 244, n. April, p. 108687, 2020. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2020.108687>>.
- SOLYMAN, S. M. *et al.* Multilocus sequence typing for characterization of *Staphylococcus pseudintermedius*. *Journal of Clinical Microbiology*, v. 51, n. 1, p. 306–310, 2013.
- SOMAYAJI, R. *et al.* Human infections due to *Staphylococcus pseudintermedius*, an emerging zoonosis of canine origin: report of 24 cases. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, v. 85, n. 4, p. 471–476, 2016. Disponível em <<http://dx.doi.org/10.1016/j.diagmicrobio.2016.05.008>>.

SONG, Chi Youn *et al.* In vitro efficacy of the essential oil from *Leptospermum scoparium* (manuka) on antimicrobial susceptibility and biofilm formation in *Staphylococcus pseudintermedius* isolates from dogs. *Veterinary Dermatology*, v. 24, n. 4, p. 404–409, 2013.

STEGMANN, Ramona *et al.* Human infection associated with methicillin-resistant *Staphylococcus pseudintermedius* ST71. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, v. 65, n. 9, p. 2047–2048, 2010.

STULL, Jason W. *et al.* 2018 AAHA Infection Control, Prevention, and Biosecurity Guidelines. *Journal of the American Animal Hospital Association*, v. 54, n. 6, p. 297–326, 2018.

SUEPAUL, Sharianne *et al.* Determination of the frequency, species distribution and antimicrobial resistance of staphylococci isolated from dogs and their owners in Trinidad. *PLoS ONE*, v. 16, n. 7 July, p. 1–17, 2021. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0254048>>.

TEIXEIRA, Izabel M.; FERREIRA, Eliane, O.; PENNA, Bruno, A. Dogs as reservoir of methicillin resistant coagulase negative staphylococci strains – A possible neglected risk. *Microbial Pathogenesis*, v. 135, n. July, p. 103616, 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.micpath.2019.103616>>.

The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST). Breakpoint tables for interpretation of MICs and zone diameters. Version 10.0, 2020. Disponível em <<http://www.eucast.org>>.

VAN DUIJKEREN, Engeline *et al.* Review on methicillin-resistant *Staphylococcus pseudintermedius*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, v. 66, n. 12, p. 2705–2714, 2011.

WEESE, J. Scott; VAN DUIJKEREN, Engeline. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus pseudintermedius* in veterinary medicine. *Veterinary Microbiology*, v. 140, n. 3–4, p. 418–429, 2010.

WEESE, J. Scott. *et al.* Factors associated with methicillin-resistant versus methicillin-susceptible *Staphylococcus pseudintermedius* infection in dogs. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, v. 240, n. 12, p. 1450–1455, 2012.

WEESE, J. Scott *et al.* International Society for Companion Animal Infectious Diseases (ISCAID) guidelines for the diagnosis and management of bacterial urinary tract infections in dogs and cats. *Veterinary Journal*, v. 247, p. 8–25, 2019. Disponível em <<https://doi.org/10.1016/j.tvjl.2019.02.008>>.

WEGENER, Alice *et al.* Comparative genomics of phenotypic antimicrobial resistances in methicillin-resistant *Staphylococcus pseudintermedius* of canine origin. *Veterinary Microbiology*, v. 225, n. May, p. 125–131, 2018. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2018.09.013>

WEGENER, Alice *et al.* Specific staphylococcal cassette chromosome mec (SCCmec) types and clonal complexes are associated with low-level amoxicillin/clavulanic acid and cefalotin resistance in methicillin-resistant *Staphylococcus pseudintermedius*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, v. 75, n. 3, p. 508–511, 2020.

WINDAHL, Ulrika *et al.* Characterisation of bacterial growth and antimicrobial susceptibility patterns in canine urinary tract infections. *BMC Veterinary Research*, v. 10, n. 1, p. 1–10, 2014.

WORTHING, Kate A. *et al.* Clonal diversity and geographic distribution of methicillin-resistant *Staphylococcus pseudintermedius* from Australian animals: Discovery of novel sequence types. *Veterinary Microbiology*, v. 213, n. August 2017, p. 58–65, 2018.

ZAKOŠEK PIPAN, Maja *et al.* *Staphylococcus pseudintermedius* septicemia in puppies after elective cesarean section: Confirmed transmission via dam's milk. *BMC Veterinary Research*, v. 15, n. 1, p. 1–8, 2019.

APÊNDICE A

Tabela 7 - Relação de isolados de cães incluídos no estudo, de acordo com idade, sexo, raça, sítio de infecção, ano e local de coleta.

Animal	Idade (meses)	Sexo	Raça	Número de isolados	Sítio de infecção	Ano de coleta	Local de coleta
1	58	Fêmea	Shih Tzu	2	Infecções de pele e Otite	2019	VetMaster
2	70	Fêmea	Pitbull	1	Infecções de pele	2019	VetMaster
3	96	Macho	Daschund	1	Otite	2019	VetMaster
4	120	Macho	Shih Tzu	1	Otite	2019	VetMaster
5	36	Macho	Buldogue Francês	2	Infecções de pele e Otite	2019	VetMaster
6	12	Fêmea	Yorkshire	1	Infecções de pele	2019	VetMaster
7	72	Fêmea	Pug	2	Infecções de pele e Otite	2019	VetMaster
8	60	Fêmea	Lhasa Apso	2	Infecções de pele e Otite	2019	VetMaster
9	108	Fêmea	Yorkshire	1	Infecções de pele	2019	VetMaster
10	20	Macho	Shih Tzu	1	Infecções de pele	2019	VetMaster
11	84	Macho	Schnauzer	2	Infecções de pele	2019	VetMaster
12	144	Fêmea	SRD	1	Otite	2019	VetMaster
13	108	Fêmea	Golden Retriever	1	Infecções de pele	2019	VetMaster
14	48	Fêmea	Yorkshire	1	Infecções de pele	2019	VetMaster
15	57	Macho	Chow Chow	1	Infecções de pele	2019	HV-UFGM
16	204	Macho	Labrador Retriever	1	Infecções de pele	2019	VetMaster
17	84	Macho	SRD	2	Infecções de pele e Otite	2019	VetMaster
18	156	Macho	Bichon Frise	1	Infecções de pele	2019	VetMaster
19	72	Fêmea	Shih Tzu	1	Infecções de pele	2019	VetMaster
20	NI	Macho	SRD	1	Otite	2019	VetMaster
21	72	Macho	Boxer	2	Infecções de pele e Otite	2019	VetMaster
22	100	Fêmea	Dálmata	1	Otite	2019	VetMaster
23	44	Macho	Buldogue Francês	1	Infecções de pele	2019	VetMaster

24	NI	Fêmea	SRD	1	Infecções de pele	2019	VetMaster
25	96	Fêmea	Dálmata	2	Infecções de pele e Otite	2020	VetMaster
26	24	Fêmea	Fox Terrier	1	Infecções de pele	2020	VetMaster
27	84	Fêmea	SRD	2	Infecções de pele e Otite	2020	VetMaster
28	108	Fêmea	Akita	1	Infecções de pele	2020	VetMaster
29	150	Macho	SRD	1	Infecção de ferida cirúrgica	2020	HV-UFGM
30	36	Fêmea	SRD	1	Otite	2021	HV-UFGM
31	28	Macho	SRD	1	Infecção de ferida cirúrgica	2018	HV-UFGM
32	45	Macho	Fila Brasileiro	1	Infecção de ferida cirúrgica	2019	HV-UFGM
33	122	Fêmea	Shih Tzu	1	Outros	2018	HV-UFGM
34	80	Macho	SRD	1	Infecção de trato geniturinário	2018	HV-UFGM
35	128	Macho	SRD	1	Infecção de ferida cirúrgica	2019	HV-UFGM
36	24	Macho	Buldogue Francês	1	Infecção de ferida cirúrgica	2019	HV-UFGM
37	15	Macho	Golden Retriever	1	Infecção de ferida cirúrgica	2018	HV-UFGM
38	57	Fêmea	SRD	1	Infecção de ferida cirúrgica	2019	HV-UFGM
39	176	Macho	SRD	1	Infecção de trato geniturinário	2019	HV-UFGM
40	77	Fêmea	SRD	1	Infecção de ferida cirúrgica	2019	HV-UFGM
41	139	Macho	Schnauzer	1	Infecção de trato geniturinário	2019	HV-UFGM
42	78	Macho	SRD	1	Otite	2019	HV-UFGM
43	74	Fêmea	Pastor Belga	2	Infecções de pele	2017	HV-UFGM
44	NI	NI	NI	1	Infecção de ferida cirúrgica	2017	HV-UFGM
45	183	Macho	Daschund	1	Infecção de ferida cirúrgica	2017	HV-UFGM
46	52	Fêmea	SRD	2	Infecções de pele	2017	HV-UFGM
47	169	Macho	Golden Retriever	1	Infecções de pele	2018	HV-UFGM
48	123	Fêmea	Labrador Retriever	1	Infecção de ferida cirúrgica	2018	HV-UFGM
49	144	Fêmea	Shih Tzu	1	Infecção de trato geniturinário	2018	HV-UFGM
50	96	Macho	Pitbull	1	Infecções de pele	2018	HV-UFGM
51	88	Fêmea	Labrador Retriever	1	Infecção de ferida cirúrgica	2018	HV-UFGM

52	18	Macho	Bichon Frise	1	Infecção de trato geniturinário	2018	HV-UFMG
53	118	Fêmea	Fila Brasileiro	1	Infecção de trato geniturinário	2017	HV-UFMG
54	27	Fêmea	Shih Tzu	1	Infecções de pele	2017	HV-UFMG
55	27	Macho	Pastor Alemão	1	Infecção de trato geniturinário	2017	HV-UFMG
56	21	Macho	Pastor Alemão	1	Infecção de trato geniturinário	2019	HV-UFMG
57	17	Fêmea	Poodle	1	Outros	2019	HV-UFMG
58	83	Macho	Shih Tzu	1	Infecção de trato geniturinário	2019	HV-UFMG
59	99	Fêmea	Yorkshire	1	Otite	2019	HV-UFMG
60	36	Fêmea	SRD	1	Infecções de pele	2019	HV-UFMG
61	64	Fêmea	Pastor Alemão	1	Infecções de pele	2019	HV-UFMG
62	135	Fêmea	Shih Tzu	1	Otite	2019	HV-UFMG
63	126	Fêmea	Daschund	1	Outros	2019	HV-UFMG
64	85	Macho	Golden Retriever	1	Infecções de pele	2019	HV-UFMG
65	137	Fêmea	Boxer	1	Infecção de trato geniturinário	2019	HV-UFMG
66	86	Macho	Labrador Retriever	1	Outros	2019	HV-UFMG
67	139	Macho	Pastor Alemão	1	Infecções de pele	2019	HV-UFMG
68	98	Macho	Yorkshire	1	Infecções de pele	2019	HV-UFMG
69	59	Macho	Pug	1	Otite	2019	HV-UFMG
70	109	Macho	Labrador Retriever	1	Otite	2019	HV-UFMG
71	159	Macho	Lhasa Apso	1	Outros	2019	HV-UFMG
72	32	Macho	Bulldog Francês	1	Infecção de ferida cirúrgica	2019	HV-UFMG
73	158	Macho	Pastor Branco Suiço	1	Infecção de ferida cirúrgica	2019	HV-UFMG
74	17	Fêmea	Pastor Belga	1	Infecção de ferida cirúrgica	2019	HV-UFMG
75	74	Macho	SRD	1	Outros	2019	HV-UFMG
76	107	Fêmea	Shih Tzu	1	Infecção de trato geniturinário	2019	HV-UFMG
77	84	Fêmea	Fox Paulistinha	1	Infecções de pele	2019	HV-UFMG
78	NI	Macho	SRD	1	Outros	2019	HV-UFMG
79	109	Macho	Labrador Retriever	1	Otite	2019	HV-UFMG

80	126	Fêmea	Maltês	1	Otite	2019	HV-UFMG
81	109	Macho	Boxer	1	Infecção de trato geniturinário	2019	HV-UFMG
82	73	Macho	SRD	1	Outros	2019	HV-UFMG
83	70	Fêmea	SRD	2	Infecções de pele	2019	HV-UFMG
84	124	Macho	Schnauzer	1	Infecção de trato geniturinário	2019	HV-UFMG
85	84	Fêmea	SRD	1	Infecções de pele	2019	HV-UFMG
86	108	Fêmea	SRD	1	Otite	2019	HV-UFMG
87	121	Macho	Yorkshire	1	Infecções de pele	2019	HV-UFMG
88	152	Fêmea	SRD	1	Infecções de pele	2019	HV-UFMG
89	60	Fêmea	Pitbull	1	Outros	2019	HV-UFMG
90	143	Fêmea	Maltês	1	Otite	2019	HV-UFMG
91	85	Macho	Yorkshire	1	Infecção de trato geniturinário	2019	HV-UFMG
92	120	Macho	Yorkshire	2	Otite	2019	HV-UFMG
93	57	Fêmea	Shih Tzu	1	Otite	2019	HV-UFMG
94	26	Macho	Yorkshire	1	Otite	2019	HV-UFMG
95	28	Macho	Pug	1	Infecções de pele	2019	HV-UFMG
96	184	Fêmea	SRD	1	Infecções de pele	2019	HV-UFMG
97	83	Fêmea	Buldogue Francês	1	Infecções de pele	2019	HV-UFMG
98	99	Fêmea	Shih Tzu	2	Infecções de pele	2019	HV-UFMG
99	35	Fêmea	Pitbull	1	Infecções de pele	2019	HV-UFMG
100	127	Macho	Yorkshire	1	Infecções de pele	2019	HV-UFMG
101	173	Macho	Golden Retriever	1	Infecções de pele	2019	HV-UFMG
102	92	Macho	Golden Retriever	1	Infecções de pele	2020	HV-UFMG
103	46	Macho	SRD	1	Infecções de pele	2019	HV-UFMG
104	71	Macho	Akita	1	Infecções de pele	2019	HV-UFMG
105	67	Macho	Pequinês	1	Infecções de pele	2019	HV-UFMG
106	90	Macho	Akita	1	Infecções de pele	2020	HV-UFMG
107	169	Fêmea	Schnauzer	2	Otite e Infecções de pele	2020	HV-UFMG

108	17	Macho	American bully	1	Infecções de pele	2020	HV-UFMG
109	31	Macho	Shih tzu	1	Infecções de pele	2020	HV-UFMG
110	100	Fêmea	SRD	1	Infecção de trato geniturinário	2018	HV-UFMG
111	155	Fêmea	SRD	1	Infecção de trato geniturinário	2018	HV-UFMG
112	NI	Fêmea	NI	1	Infecção de trato geniturinário	2018	HV-UFMG
113	26	Fêmea	Pinscher	1	Infecção de trato geniturinário	2018	HV-UFMG
114	24	Fêmea	Labrador Retriever	1	Infecção de trato geniturinário	2019	HV-UFMG
115	161	Fêmea	SRD	1	Infecção de trato geniturinário	2019	HV-UFMG
116	NI	Fêmea	NI	1	Outros	2018	HV-UFMG

APÊNDICE B

Tabela 8 - Identificação das espécies dos isolados do SIG, de acordo com as técnicas de MALDI-TOF, PCR, sequenciamento do gene 16S rRNA e sequenciamento do gene *rpoB*.

AMOSTRA		MALDI-TOF		PCR SIG		16S rRNA			<i>rpoB</i>
SIG	Espécie	Score	Cor	Espécie	Espécie	Cobertura	Identidade	<i>e-value</i>	Espécie
AC1	<i>S. pseudintermedius</i>	2,066	Verde	<i>S. pseudintermedius</i>	NA	NA	NA	NA	NA
AC3	<i>S. pseudintermedius</i>	1,954	Amarelo	<i>S. pseudintermedius</i>	NA	NA	NA	NA	NA
AC7-2	<i>S. pseudintermedius</i>	1,897	Amarelo	<i>S. pseudintermedius</i>	NA	NA	NA	NA	NA
AC8	<i>S. pseudintermedius</i>	1,716	Amarelo	<i>S. pseudintermedius</i>	NA	NA	NA	NA	NA
AC9	<i>S. pseudintermedius</i>	2,035	Verde	<i>S. pseudintermedius</i>	NA	NA	NA	NA	NA
AC12	<i>S. pseudintermedius</i>	2,268	Verde	<i>S. pseudintermedius</i>	NA	NA	NA	NA	NA
AC13	<i>S. delphini</i>	1,755	Amarelo	<i>S. delphini A</i>	NA	NA	NA	NA	NA
AC14	<i>S. pseudintermedius</i>	1,727	Amarelo	<i>S. pseudintermedius</i>	NA	NA	NA	NA	NA
AC15	<i>S. pseudintermedius</i>	1,701	Amarelo	<i>S. pseudintermedius</i>	NA	NA	NA	NA	NA
AC16	<i>S. pseudintermedius</i>	1,835	Amarelo	<i>S. pseudintermedius</i>	NA	NA	NA	NA	NA
AC17	<i>S. intermedius</i>	1,800	Amarelo	<i>S. pseudintermedius</i>	NA	NA	NA	NA	NA
AC18	<i>S. intermedius</i>	1,718	Amarelo	<i>S. pseudintermedius</i>	NA	NA	NA	NA	NA
AC19	<i>S. pseudintermedius</i>	1,825	Amarelo	<i>S. pseudintermedius</i>	NA	NA	NA	NA	NA
AC20	<i>S. pseudintermedius</i>	1,825	Amarelo	<i>S. pseudintermedius</i>	NA	NA	NA	NA	NA
AC21	<i>S. pseudintermedius</i>	1,744	Amarelo	<i>S. pseudintermedius</i>	NA	NA	NA	NA	NA
AC24	<i>S. pseudintermedius</i>	1,744	Amarelo	<i>S. pseudintermedius</i>	NA	NA	NA	NA	NA
AC25	<i>S. pseudintermedius</i>	1,871	Amarelo	<i>S. pseudintermedius</i>	NA	NA	NA	NA	NA
AC26	<i>S. pseudintermedius</i>	2,550	verde	<i>S. pseudintermedius</i>	NA	NA	NA	NA	NA
AC27	<i>S. pseudintermedius</i>	2,172	verde	<i>S. pseudintermedius</i>	NA	NA	NA	NA	NA
AC29	<i>S. pseudintermedius</i>	2,468	verde	<i>S. pseudintermedius</i>	NA	NA	NA	NA	NA
AC30	<i>S. pseudintermedius</i>	2,425	verde	<i>S. pseudintermedius</i>	NA	NA	NA	NA	NA
AC33	<i>S. intermedius</i>	1,793	Amarelo	<i>S. pseudintermedius</i>	NA	NA	NA	NA	NA
AC34	<i>S. pseudintermedius</i>	1,827	Amarelo	<i>S. pseudintermedius</i>	NA	NA	NA	NA	NA

AC40	<i>S. intermedius</i>	2,078	Verde	<i>S. pseudintermedius</i>	NA	NA	NA	NA	NA
AC41	<i>S. intermedius</i>	1,764	Amarelo	<i>S. pseudintermedius</i>	NA	NA	NA	NA	NA
AC42	<i>S. pseudintermedius</i>	1,576	vermelho	<i>S. pseudintermedius</i>	NA	NA	NA	NA	NA
BR1	<i>S. pseudintermedius</i>	2,092	Verde	<i>S. pseudintermedius</i>	NA	NA	NA	NA	NA
BR6	<i>S. pseudintermedius</i>	1,739	Amarelo	<i>S. pseudintermedius</i>	NA	NA	NA	NA	NA
BR15	<i>S. pseudintermedius</i>	1,929	Amarelo	<i>S. pseudintermedius</i>	NA	NA	NA	NA	NA
BR16	<i>S. pseudintermedius</i>	1,946	Amarelo	<i>S. pseudintermedius</i>	NA	NA	NA	NA	NA
BR19	<i>S. pseudintermedius</i>	2,037	Verde	<i>S. pseudintermedius</i>	NA	NA	NA	NA	NA
BR29	<i>S. pseudintermedius</i>	1,889	Amarelo	<i>S. pseudintermedius</i>	NA	NA	NA	NA	NA
BR43	<i>S. pseudintermedius</i>	1,955	Amarelo	<i>S. pseudintermedius</i>	NA	NA	NA	NA	NA
BR49	<i>S. intermedius</i>	1,855	Amarelo	<i>S. pseudintermedius</i>	NA	NA	NA	NA	NA
BR51	<i>S. pseudintermedius</i>	1,878	Amarelo	<i>S. pseudintermedius</i>	NA	NA	NA	NA	NA
BR52	<i>S. pseudintermedius</i>	2,443	Verde	<i>S. pseudintermedius</i>	NA	NA	NA	NA	NA
BR55	<i>S. pseudintermedius</i>	1,809	Amarelo	<i>S. pseudintermedius</i>	NA	NA	NA	NA	NA
BR58-2	<i>S. intermedius</i>	1,833	Amarelo	<i>S. pseudintermedius</i>	NA	NA	NA	NA	NA
BR60	<i>S. pseudintermedius</i>	1,582	Vermelho	<i>S. pseudintermedius</i>	NA	NA	NA	NA	NA
BR61	<i>S. pseudintermedius</i>	1,492	Vermelho	<i>S. pseudintermedius</i>	NA	NA	NA	NA	NA
BR63	<i>S. pseudintermedius</i>	1,923	Amarelo	<i>S. delphini A</i>	NA	NA	NA	NA	NA
BR64	<i>S. intermedius</i>	1,734	Amarelo	<i>S. pseudintermedius</i>	NA	NA	NA	NA	NA
BR65	<i>S. pseudintermedius</i>	1,369	Vermelho	<i>S. pseudintermedius</i>	NA	NA	NA	NA	NA
BR66	<i>S. pseudintermedius</i>	1,799	Amarelo	<i>S. pseudintermedius</i>	NA	NA	NA	NA	NA
BR68	<i>S. pseudintermedius</i>	2,003	Verde	<i>S. pseudintermedius</i>	NA	NA	NA	NA	NA
BR69	<i>S. pseudintermedius</i>	2,222	Verde	<i>S. pseudintermedius</i>	NA	NA	NA	NA	NA
BR71	<i>S. intermedius</i>	1,622	Vermelho	<i>S. pseudintermedius</i>	NA	NA	NA	NA	NA
BR80	<i>S. pseudintermedius</i>	1,827	Amarelo	<i>S. pseudintermedius</i>	NA	NA	NA	NA	NA
BR81	<i>S. pseudintermedius</i>	1,836	Amarelo	<i>S. pseudintermedius</i>	NA	NA	NA	NA	NA
BR83	<i>S. delphini</i>	1,729	Amarelo	<i>S. delphini A</i>	NA	NA	NA	NA	NA
BR84	<i>S. pseudintermedius</i>	1,986	Amarelo	<i>S. pseudintermedius</i>	NA	NA	NA	NA	NA

BR85	<i>S. pseudintermedius</i>	1,784	Amarelo	<i>S. pseudintermedius</i>	NA	NA	NA	NA	NA
BR89	<i>S. pseudintermedius</i>	1,894	Amarelo	<i>S. pseudintermedius</i>	NA	NA	NA	NA	NA
BR94	<i>S. intermedius</i>	1,724	Amarelo	<i>S. pseudintermedius</i>	NA	NA	NA	NA	NA
BR95	<i>S. pseudintermedius</i>	2,031	Verde	<i>S. pseudintermedius</i>	NA	NA	NA	NA	NA
BR96	<i>S. pseudintermedius</i>	1,739	Amarelo	<i>S. pseudintermedius</i>	<i>S. pseudintermedius</i>	100%	100%	0,0	NA
BR102	<i>S. pseudintermedius</i>	1,787	Amarelo	<i>S. pseudintermedius</i>	NA	NA	NA	NA	NA
BR103	<i>S. pseudintermedius</i>	1,967	Amarelo	<i>S. pseudintermedius</i>	NA	NA	NA	NA	NA
BR106	<i>S. pseudintermedius</i>	2,034	Verde	<i>S. pseudintermedius</i>	NA	NA	NA	NA	NA
BR112	<i>S. pseudintermedius</i>	1,967	Amarelo	<i>S. pseudintermedius</i>	NA	NA	NA	NA	NA
BR120	<i>S. intermedius</i>	2,008	Verde	<i>S. pseudintermedius</i>	NA	NA	NA	NA	NA
BR128	<i>S. pseudintermedius</i>	1,456	Vermelho	<i>S. pseudintermedius</i>	NA	NA	NA	NA	NA
BR129	<i>S. intermedius</i>	1,629	Vermelho	<i>S. pseudintermedius</i>	NA	NA	NA	NA	NA
BR130	<i>S. intermedius</i>	1,714	Amarelo	<i>S. pseudintermedius</i>	NA	NA	NA	NA	NA
BR131	<i>S. intermedius</i>	1,725	Amarelo	<i>S. pseudintermedius</i>	NA	NA	NA	NA	NA
BR132	<i>S. pseudintermedius</i>	1,590	Vermelho	<i>S. pseudintermedius</i>	NA	NA	NA	NA	NA
BR133	<i>S. pseudintermedius</i>	1,612	Vermelho	<i>S. pseudintermedius</i>	NA	NA	NA	NA	NA
BR149	<i>S. intermedius</i>	1,847	Amarelo	<i>S. pseudintermedius</i>	NA	NA	NA	NA	NA
BR150	<i>S. pseudintermedius</i>	1,974	Amarelo	<i>S. pseudintermedius</i>	NA	NA	NA	NA	NA
BR156	<i>S. pseudintermedius</i>	2,038	verde	<i>S. pseudintermedius</i>	NA	NA	NA	NA	NA
BR158	<i>S. pseudintermedius</i>	2,495	verde	<i>S. pseudintermedius</i>	NA	NA	NA	NA	NA
BR159	<i>S. pseudintermedius</i>	2,545	verde	<i>S. pseudintermedius</i>	NA	NA	NA	NA	NA
BR162	<i>S. pseudintermedius</i>	1,767	Amarelo	<i>S. pseudintermedius</i>	NA	NA	NA	NA	NA
BR164	<i>S. pseudintermedius</i>	1,868	Amarelo	<i>S. pseudintermedius</i>	NA	NA	NA	NA	NA
BR172	<i>S. intermedius</i>	1,811	Amarelo	<i>S. pseudintermedius</i>	NA	NA	NA	NA	NA
BR173	<i>S. delphini</i>	1,709	Amarelo	Negativo	<i>S. pseudintermedius</i>	100%	99,83%	0.0	<i>S. delphini</i>
BR174	<i>S. pseudintermedius</i>	2,143	Verde	<i>S. pseudintermedius</i>	NA	NA	NA	NA	NA
BR175	<i>S. pseudintermedius</i>	1,903	Amarelo	<i>S. pseudintermedius</i>	NA	NA	NA	NA	NA
BR176	<i>S. pseudintermedius</i>	1,942	Amarelo	<i>S. pseudintermedius</i>	NA	NA	NA	NA	NA

BR177	<i>S. delphini</i>	1,784	Amarelo	<i>S. pseudintermedius</i>	NA	NA	NA	NA	NA
Bruce esquerda	<i>S. intermedius</i>	1,892	Amarelo	<i>S. pseudintermedius</i>	NA	NA	NA	NA	NA
D1	<i>S. intermedius</i>	1,999	Amarelo	<i>S. pseudintermedius</i>	NA	NA	NA	NA	NA
D2	<i>S. pseudintermedius</i>	1,787	Amarelo	<i>S. pseudintermedius</i>	NA	NA	NA	NA	NA
D5	<i>S. intermedius</i>	1,777	Amarelo	<i>S. pseudintermedius</i>	NA	NA	NA	NA	NA
D7	<i>S. pseudintermedius</i>	2,121	Verde	<i>S. pseudintermedius</i>	NA	NA	NA	NA	NA
D8	<i>S. pseudintermedius</i>	2,468	Verde	<i>S. pseudintermedius</i>	NA	NA	NA	NA	NA
D9	<i>S. pseudintermedius</i>	2,002	Verde	<i>S. pseudintermedius</i>	NA	NA	NA	NA	NA
D10	<i>S. pseudintermedius</i>	2,007	Verde	<i>S. pseudintermedius</i>	NA	NA	NA	NA	NA
D12	<i>S. pseudintermedius</i>	1,735	Amarelo	<i>S. pseudintermedius</i>	NA	NA	NA	NA	NA
D16	<i>S. pseudintermedius</i>	2,301	Verde	<i>S. pseudintermedius</i>	NA	NA	NA	NA	NA
D18	<i>S. pseudintermedius</i>	1,982	Amarelo	<i>S. pseudintermedius</i>	NA	NA	NA	NA	NA
D19	<i>S. pseudintermedius</i>	1,925	Amarelo	<i>S. pseudintermedius</i>	NA	NA	NA	NA	NA
D20	<i>S. pseudintermedius</i>	2,076	Verde	<i>S. pseudintermedius</i>	NA	NA	NA	NA	NA
D21	<i>S. pseudintermedius</i>	2,177	Verde	<i>S. pseudintermedius</i>	NA	NA	NA	NA	NA
D22	<i>S. pseudintermedius</i>	2,109	Verde	<i>S. pseudintermedius</i>	NA	NA	NA	NA	NA
D23	<i>S. pseudintermedius</i>	1,993	Amarelo	<i>S. pseudintermedius</i>	NA	NA	NA	NA	NA
P6	<i>S. intermedius</i>	2,158	verde	<i>S. pseudintermedius</i>	NA	NA	NA	NA	NA
P8	<i>S. pseudintermedius</i>	2,474	verde	<i>S. pseudintermedius</i>	NA	NA	NA	NA	NA
P11	<i>S. pseudintermedius</i>	2,136	Verde	<i>S. pseudintermedius</i>	NA	NA	NA	NA	NA
P13	<i>S. pseudintermedius</i>	1,953	Amarelo	<i>S. pseudintermedius</i>	NA	NA	NA	NA	NA
P60	<i>S. pseudintermedius</i>	2,168	Verde	<i>S. pseudintermedius</i>	NA	NA	NA	NA	NA
S18	<i>S. pseudintermedius</i>	2,130	Verde	<i>S. pseudintermedius</i>	NA	NA	NA	NA	NA

Tabela 9 - Identificação das espécies dos isolados não-SIG, de acordo com as técnicas de MALDI-TOF, PCR, sequenciamento do gene 16S rRNA e sequenciamento do gene rpoB.

AMOSTRA		MALDI-TOF		PCR SIG		16S rRNA			<i>rpoB</i>
Não SIG	Espécie	Score	Cor	Espécie	Espécie	Cobertura	Identidade	<i>e-value</i>	Espécie
AC2	<i>S. schleiferi</i>	2,246	Verde	NA	NA	NA	NA	NA	NA
AC4	<i>S. schleiferi</i>	2,025	Verde	NA	NA	NA	NA	NA	NA
AC5	<i>S. schleiferi</i>	2,061	Verde	NA	NA	NA	NA	NA	NA
AC6	<i>S. schleiferi</i>	2,331	Verde	NA	NA	NA	NA	NA	NA
AC10	<i>S. schleiferi</i>	2,19	Verde	NA	NA	NA	NA	NA	NA
AC22	<i>S. schleiferi</i>	2,091	Verde	NA	NA	NA	NA	NA	NA
AC23	<i>S. schleiferi</i>	2,229	Verde	NA	NA	NA	NA	NA	NA
AC32	<i>S. schleiferi</i>	2,215	Verde	NA	NA	NA	NA	NA	NA
AC35	<i>S. schleiferi</i>	2,410	Verde	NA	NA	NA	NA	NA	NA
AC36	<i>S. schleiferi</i>	2,148	Verde	NA	NA	NA	NA	NA	NA
AC37	<i>S. schleiferi</i>	1,833	Amarelo	NA	<i>S. schleiferi</i>	100%	100%	0,0	NA
AC38	<i>S. schleiferi</i>	1,934	Amarelo	NA	<i>S. schleiferi</i>	99%	99,66%	0,0	NA
AC39	<i>S. schleiferi</i>	1,695	Amarelo	NA	<i>S. schleiferi</i>	100%	99,83%	0,0	NA
BR5	<i>S. simulans</i>	2,173	Verde	NA	NA	NA	NA	NA	NA
BR10	<i>S. epidermidis</i>	2,098	Verde	NA	NA	NA	NA	NA	NA
BR54	<i>S. aureus</i>	2,354	Verde	NA	NA	NA	NA	NA	NA
BR57	<i>S. capitis</i>	2,088	Verde	NA	NA	NA	NA	NA	NA
BR59	<i>S. aureus</i>	2,434	Verde	NA	NA	NA	NA	NA	NA
BR70	<i>S. warneri</i>	1,567	Vermelho	NA	<i>S. warneri</i>	100%	100%	0,0	NA
BR113	<i>S. schleiferi</i>	2,02	Verde	NA	NA	NA	NA	NA	NA
BR118	<i>S. schleiferi</i>	1,874	Amarelo	NA	<i>S. schleiferi</i>	100%	99,85%	0,0	NA
BR135	<i>S. simulans</i>	1,914	Amarelo	NA	<i>S. simulans</i>	100%	99,83%	0,0	NA
BR182	<i>S. capitis</i>	2,021	Verde	NA	NA	NA	NA	NA	NA
Bruce direita	<i>S. schleiferi</i>	-	-	NA	<i>S. schleiferi</i>	99%	99,66%	0,0	NA
D3	<i>S. schleiferi</i>	2,148	Verde	NA	NA	NA	NA	NA	NA

D6	<i>S. schleiferi</i>	2,140	Verde	NA	NA	NA	NA	NA	NA
D11	<i>S. schleiferi</i>	2,202	Verde	NA	NA	NA	NA	NA	NA
D17	<i>S. schleiferi</i>	2,338	Verde	NA	NA	NA	NA	NA	NA
P42	<i>S. aureus</i>	2,475	Verde	NA	NA	NA	NA	NA	NA

