

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
Escola de Veterinária
Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal

Jordana Almeida Santana

**DIVERSIDADE E RESISTÊNCIA A ANTIMICROBIANOS EM *Staphylococcus* spp.
ISOLADOS DE CÃES E ANIMAIS SILVESTRES**

Belo Horizonte

2022

Jordana Almeida Santana

**DIVERSIDADE E RESISTÊNCIA A ANTIMICROBIANOS EM *Staphylococcus* spp.
ISOLADOS DE CÃES E ANIMAIS SILVESTRES**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal da Escola de Veterinária da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial à obtenção do título de Doutora em Ciência Animal.

Área de concentração: Medicina Veterinária Preventiva

Orientador: Prof. Dr. Rodrigo Otávio Silveira Silva

Coorientadores: Prof. Dr. Francisco Carlos Faria Lobato e Prof. Dr. Henrique César Pereira Figueiredo

Belo Horizonte

2022

S232d Santana, Jordana Almeida, 1987 -
Diversidade e resistência a antimicrobianos em Staphylococcus spp. isolados de cães e animais silvestres / Jordana Almeida Santana. –2022 .
232f: il.

Orientador: Rodrigo Otávio Silveira Silva

Coorientadores: Francisco Carlos Faria Lobato

Henrique César Pereira Figueiredo

Tese (Doutorado) apresentada à Escola de Veterinária da Universidade Federal de Minas Gerais para obtenção do título de Doutora.

Área de concentração: Medicina Veterinária Preventiva

1. Cão - Doenças – Diagnóstico - Teses - 2. Ciência animal - Teses – I. Silva, Rodrigo Otávio Silveira - II. Lobato, Francisco Carlos Faria – III. Figueiredo, Henrique César Pereira - IV. Universidade Federal de Minas Gerais, Escola de Veterinária – V. Título.

CDD – 636.708 96

Bibliotecário responsável Cristiane Patrícia Gomes – CRB2569
Biblioteca da Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais



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

FOLHA DE APROVAÇÃO

JORDANA ALMEIDA SANTANA

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

Aprovado(a) em 14 de julho de 2022, pela banca constituída pelos membros:

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

Dr.(a). Marcelo Pires Nogueira de Carvalho

Dr.(a). Adriane Pimenta da Costa Val Bicalho

Dr.(a). Leonardo Borges Acurcio

Dr.(a). Prhiscylla Sadana Pires



Documento assinado eletronicamente por **Rodrigo Otavio Silveira Silva, Professor do Magistério Superior**, em 14/07/2022, às 15:54, 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 **Adriane Pimenta da Costa Val Bicalho, Cidadã**, em 14/07/2022, às 20:21, 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 **Marcelo Pires Nogueira de Carvalho, Professor do Magistério Superior**, em 14/07/2022, às 20:30, 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 **Leonardo Borges Acurcio, Usuário Externo**, em 28/07/2022, às 21:57, 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 **Prhiscylla Sadana Pires, Usuário Externo**, em 05/08/2022, às 14:44, 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 **1565751** e o código CRC **2080579A**.

Dedico este trabalho a duas pessoas muito especiais. A primeira é minha mãe, que sempre viu meu potencial e, desde muito cedo, apostou tudo o que tinha e não tinha na minha educação. A segunda é meu esposo, meu maior incentivador, que não me deixou sucumbir diante das dificuldades e me apoiou de todas as maneiras durante essa longa e maluca jornada do doutorado.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por estar viva e por presenciar essa conquista com muita saúde ao lado da minha família e dos meus amigos. Agradeço também aos meus anjos da guarda e aos meus santinhos por todo o amparo nos momentos difíceis.

Agradeço à minha mãe, o maior e melhor exemplo de mulher forte e independente que eu poderia ter. Quando eu tinha 13 anos, minha mãe não tinha boas condições financeiras, mas vendo meu potencial, decidiu investir sozinha na minha educação. Acredito que ela não tinha noção de onde essa decisão me levaria, e hoje estou aqui, graças à sua garra, ao seu amor e à sua vontade de ver suas filhas felizes. Essa conquista é tão dela, quanto minha!

Agradeço ao meu pai por todo o carinho e aconchego. Pelas conversas que “varam” a madrugada e por toda a saudade com que ele sempre me espera nas minhas idas a Sacramento.

Agradeço à minha irmã que, mesmo de longe, me apoia e me diverte com suas palhaçadas.

Agradeço ao meu esposo Renato! Meu “dunho”! O meu maior companheiro e amigo! Meu estatístico! Essa conquista também é dele, que me amparou por todos esses anos e segurou junto comigo essa barra que é fazer um doutorado.

Agradeço ao prof. Chico por toda a alegria que ele me transmitiu durante essa jornada e por toda força e ajuda que tem me dado até hoje. Deus o colocou no meu caminho em um momento extremamente decisivo e ele me acolheu como uma filha. Tenho nele um ídolo, um exemplo de conduta e um amigo!!! Vai estar para sempre no meu coração!

Agradeço ao prof. Rodrigo por todo o aprendizado que me proporcionou e pela paciência que teve com minhas dificuldades! Pelo total apoio, principalmente neste finalzinho em que, devido ao meu trabalho, não me deixou desanimar e deu todo suporte que eu precisava, se adaptando aos meus horários, fazendo correções nas suas horas vagas, dentre outras mil coisas que fez para me ajudar! Sou extremamente grata por toda a confiança que depositou em mim com o projeto de *Staphylococcus*, por sua amizade e por me ajudar a enxergar uma versão melhor e mais madura de mim mesmo. Tenho muita admiração por ele, por sua paixão pela ciência e pelo ensino.

Agradeço ao prof. Henrique e a equipe do Aquacen pela valiosa contribuição e por toda ajuda com a identificação e caracterização dos isolados.

Agradeço a todos os colegas e amigos que passaram pelo Laboratório de Anaeróbios e fizeram essa caminhada mais leve e feliz: Rafa, Isa, Gabi, Diogo, Brendhal, Carlitos, Loren, Carol, Flávia, Emily, Carol Kamei, Letícia Wolf, Letícia Barbosa, Rafaela, Giúlia e Amanda.

Agradeço a todos os professores, funcionários, estudantes e residentes da EV-UFMG que conviveram comigo durante esse período, seja contribuindo com os estudos, ou mesmo me alegrando com um afetuoso bom dia! Em especial, agradeço ao prof. Marcelo Carvalho, ao Leo Alcântara e à Bruna Hermine, à Rani e Amanda Paraguassu, à Profa Adriane, Claudia Bonisson e Júlia SetteCâmara, à Lara Ribeiro, Fernanda Dorella, à Júnia Pacheco, Salene Colombo, Alexandra Cumerlato, Graciela Kunrath e todas as outras pessoas que generosamente contribuíram para a realização deste trabalho.

Agradeço ao meu time de vôlei Frida pelo acolhimento, alívio e diversão!

Agradeço à minha terapeuta Maria Isabel Lisboa pela paciência e toda a ajuda durante os momentos difíceis dessa jornada.

Agradeço 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.

Agradeço às instituições de apoio e fomento à pesquisa: CNPq, CAPES, FAPEMIG e PRPq; e também à prestação de serviços do Laboratório de Anaeróbios que possibilitaram a realização dos experimentos.

Agradeço imensamente à banca examinadora por aceitar o convite para participar da avaliação do presente trabalho.

Deseje a flor, mas ame a semente”

Anônimo

RESUMO

O gênero *Staphylococcus* apresenta grande relevância para a medicina humana e medicina veterinária, sendo composto, até o momento, por mais de 75 espécies. Estafilococos podem ser encontrados como parte da microbiota natural de animais e humanos, mas também como agente oportunista em processos infecciosos. Por sua alta capacidade em adquirir, abrigar e transmitir genes de resistência a antimicrobianos, este gênero bacteriano tem muita relevância em saúde pública, sendo de grande importância seu constante monitoramento não apenas na saúde humana, mas também nos animais domésticos e na vida selvagem, ambos descritos como parte essencial dessa cadeia epidemiológica. Diante da escassez de dados sobre a epidemiologia de estirpes multirresistentes de *Staphylococcus* spp. em cães no Brasil e em animais silvestres no mundo, os objetivos deste estudo foram: (1) avaliar a dinâmica de infecção/colonização, os fatores de risco, a diversidade genética e a resistência a antimicrobianos de estirpes de *S. pseudintermedius* isoladas de cães nos ambientes de clínica e Unidade de Terapia Intensiva (UTI) do Hospital Veterinário da Universidade Federal de Minas Gerais; (2) avaliar a ocorrência, distribuição e perfil de resistência a antimicrobianos de *Staphylococcus* spp. em diferentes espécies de animais silvestres, incluindo roedores, marsupiais, carnívoros, pombos e jabutis. Na avaliação de isolados oriundos de quadros infecciosos em cães, o presente estudo mostrou uma alta frequência de estafilococos multirresistentes (MDR), sobretudo *S. pseudintermedius* resistente a meticilina (MRSP). Isolados de ferida cirúrgica apresentaram uma maior frequência de resistência quando comparado com os demais quadros clínicos estudados. Os isolados MRSP foram alocados dentro do complexo clonal (CC) 71, de reconhecida importância mundial, ou entre nove novos sequence type (ST) pertencentes a outros CCs. No estudo sobre a dinâmica de colonização de *Staphylococcus* spp. na UTI, 21,6% dos cães com isolamento estafilocócico apresentaram estirpes MRSP, enquanto 5,9% apresentaram estirpes de *S. aureus* resistentes a meticilina (MRSA). Estirpes MRSP resistentes a nove classes de antimicrobianos, com perfis de resistência idênticos, foram observadas em diferentes cães durante todo o período de experimento, o que sugere a possibilidade de circulação de um clone entre os animais. Cães com estas estirpes, supostamente clones, apresentaram maior tempo de internação que aqueles colonizados por outras estirpes MRSP. A aquisição de MRSP durante a internação na UTI foi associada ao: sexo (fêmeas), idade (>7 anos) e cães que fizeram uso prévio de antimicrobianos. Nos estudos sobre distribuição e perfil de resistência em diferentes

animais silvestres, todas as espécies apresentaram estirpes resistentes a antimicrobianos e, com exceção dos jabutis e marsupiais, todas apresentaram estirpes MDR. Destaca-se ainda a detecção de *S. intermedius* e *S. delphini* em quatis, e *S. pseudintermedius* em lobo-guará, sugerindo dois novos hospedeiros de bactérias do grupo *S. intermedius* (SIG). Novos STs de *S. pseudintermedius* foram relatados em lobos-guarás e demonstraram algumas semelhanças com linhagens anteriormente isoladas de cães no Brasil. O presente estudo relatou ainda, pela primeira vez na literatura, *S. felis* em animais silvestres, especificamente em duas onças-pintadas e um lobo-guará. Este trabalho reforça a hipótese de que cães e animais silvestres podem atuar como reservatórios e disseminadores de estafilococos patogênicos e resistentes a múltiplos antimicrobianos.

Palavras-chave: Multirresistência, resistência à meticilina, Grupo *S. intermedius* (SIG), *S. aureus*, *S. pseudintermedius*, *S. felis*.

ABSTRACT

The genus *Staphylococcus* is of great relevance to human medicine and veterinary medicine and is composed of more than 75 species to date. *Staphylococcus* can be found as part of the natural microbiota of animals and humans, but also as an opportunistic agent in infectious processes. Because of its high capacity to acquire, harbor, and transmit antimicrobial resistance genes, this bacterial genus has great relevance in the public health scenario, and its constant monitoring is of great importance not only in human health, but also in domestic animals and wildlife, both described as an essential part of this epidemiological chain. Given the scarcity of data on the epidemiology of multidrug-resistant strains of *Staphylococcus* spp. in dogs in Brazil and in wild animals worldwide, the objectives of this study were: (1) to evaluate the infection/colonization dynamics, risk factors, genetic diversity, and antimicrobial resistance of *S. pseudintermedius* isolated from dogs in the clinic and Intensive Care Unit (ICU) environments of the Veterinary Hospital of UFMG; (2) to evaluate the occurrence, distribution, and antimicrobial resistance profile of *Staphylococcus* spp. in different groups of wild animals, including rodents, marsupials, coatis, canids, felids, pigeons, and tortoises. In evaluating isolates from infectious conditions in dogs, the present study showed a high frequency of multidrug-resistant staphylococci (MDR), especially methicillin-resistant *S. pseudintermedius* (MRSP). Isolates from surgical wound showed a higher frequency of resistance when compared to the other clinical infections studied. The MRSP isolates were allocated either within clonal complex (CC) 71, of recognized worldwide importance, or among nine new sequence types (ST) belonging to other CCs. In the study on the colonization dynamics of *Staphylococcus* spp. in the ICU, 21.6% of dogs with staphylococcal isolates had MRSP strains, while 5.9% had methicillin-resistant *S. aureus* (MRSA) strains. MRSP strains resistant to nine classes of antimicrobials, with identical resistance profiles, were observed in different animals throughout the experiment period, suggesting the possibility of a clone circulating among animals. Dogs with these strains, presumably clones, had longer hospital stays than those colonized by other MRSP strains. Acquisition of MRSP during ICU stay was associated with: sex (females), age (>7 years), and dogs that had prior antimicrobial use. In studies on distribution and resistance profile in different wild animals, all species showed antimicrobial resistant strains and, with the exception of jabutis and marsupials, all showed MDR strains. We also highlight the detection of *S. intermedius* and *S. delphini* in coatis, and *S. pseudintermedius* in maned wolves,

suggesting two new hosts for bacteria of the *S. intermedius* group (SIG). New STs of *S. pseudintermedius* have been reported in maned wolves and showed some similarities to strains previously isolated from dogs in Brazil. The present study also reported, for the first time in the literature, *S. felis* in wild animals, specifically in two jaguars and one maned wolf. This work reinforces the hypothesis that dogs and wild animals may act as reservoirs and disseminators of pathogenic and multi-antimicrobial resistant staphylococci.

Keywords: Multidrug resistance, methicillin resistance, *S. intermedius* group (SIG), *S. aureus*, *S. pseudintermedius*, *S. felis*.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1** – Estrutura populacional de *S. pseudintermedius* mediante análise eBURST..29
- Figura 2** - Dispersão da resistência a antimicrobianos entre comunidades humanas, hospitais, estações de tratamento de esgoto, fazendas e o meio ambiente mais amplo, inclusive através da vida selvagem 34
- Figura 3** - Fluxograma de etapas de processamento realizadas durante o estudo com animais infectados..... 56
- Figura 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. 62
- Figura 5** – Resistência antimicrobiana entre isolados clínicos do SIG obtidos de cães atendidos em duas diferentes clínicas de Belo Horizonte, entre 2017 e 2020..... 63
- Figura 6** - Relação genética de estirpes MRSP de cães de Belo Horizonte (2017-2020).67
- Figura 7** - *Snapshot* da população de *S. pseudintermedius* considerando-se variação de apenas um locus..... 68
- Figura 8** – Fluxograma de etapas de processamento realizadas durante o estudo com cães internados na UTI. 82
- Figura 9** – Frequência (%) total de estafilococos resistentes a múltiplos antimicrobianos (MDR) e frequência (%) de isolados resistentes a 3 ou mais classes de antimicrobianos.88
- Figura 10** – Relação entre o dia de internação e a proporção de estirpes MRSP (a); Relação entre o dia de internação e a proporção de cães positivos para estirpes MRSP. 92
- Figura 11** – Comparação do tempo médio de dias de internação entre cães com estirpes MRSP resistentes a nove classes de antimicrobianos e cães com outras estirpes MRSP. 93
- Figura 12** - Mapeamento do HV-UFGM na cidade de Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil. 110
- Figura 13** - Mapeamento dos parques 1 e 2 localizados na cidade de Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil. 112
- Figura 14** - Localização do Parque Municipal das Mangabeiras (Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil) e distribuição das armadilhas (pontos vermelhos) para capturar os quatis (*Nasua nasua*) no Parque Municipal das Mangabeiras, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil. 114

Figura 15 - Relação genética de isolados de *S. pseudintermedius* de lobos-guarás (*Chrysocyon
brachyurus*) em Belo Horizonte (2020)..... 125

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Fatores de risco associados à introdução, colonização e desenvolvimento de infecção por bactérias resistentes a múltiplos antimicrobianos (MDR) em instalações veterinárias.....	31
Tabela 2 - Distribuição e proporção de espécies de estafilococos isolados de diferentes sítios de infecção de 116 cães atendidos em um hospital e uma clínica veterinária de Belo Horizonte, Brasil, entre 2017 e 2020.....	60
Tabela 3 - Resistência antimicrobiana entre os estafilococos isolados de cães infectados atendidos em uma clínica e um hospital veterinário, no período entre 2017 e 2020, em Belo Horizonte, Brasil.....	64
Tabela 4 - Perfil de resistência a antimicrobianos de estirpes MRSP isoladas de cães (Belo Horizonte, Brasil) de acordo com os STs e sítios de infecção.	66
Tabela 5 - Frequência de isolamento total e por dia de internação de <i>Staphylococcus</i> spp., <i>S. pseudintermedius</i> e MRSP recuperados de 54 cães internados na UTI do HV-UFGM entre agosto de 2018 e abril de 2019.	86
Tabela 6 – Distribuição de espécies e frequência de isolados (total e por sítio de coleta).	87
Tabela 7 - Frequência de isolados susceptíveis e resistentes a diferentes classes de antimicrobianos.	88
Tabela 8 - Resistência antimicrobiana entre os estafilococos isolados de cães internados na UTI do HV-UFGM em Belo Horizonte, Minas Gerais, entre agosto de 2018 e abril de 2019.	89
Tabela 9 - Frequência de <i>Staphylococcus</i> spp., <i>S. pseudintermedius</i> e <i>S. aureus</i> resistentes à meticilina (MRS) e resistentes a múltiplos antimicrobianos (MDR) em cães que apresentaram isolamento estafilocócico.	90
Tabela 10 – Total de isolados, frequência e espécies estafilocócicas que apresentaram o gene <i>mecA</i>	91
Tabela 11 – Espécies estafilocócicas e total de isolados que apresentaram perfil fenotípico de resistência à meticilina (MRS).	91
Tabela 12 – Dia de internação, dia real do experimento, uso prévio de antimicrobianos e perfis de resistência dos isolados MRSP recuperados de cães internados na UTI do HV-UFGM entre agosto de 2018 e abril de 2019.....	95

Tabela 14 - Variáveis avaliadas como possíveis fatores de risco para aquisição de MRSP na UTI do HV-UFGM entre agosto de 2018 e abril de 2019.....	96
Tabela 15 - Frequência, distribuição e fenótipos de resistência a antimicrobianos de espécies estafilocócicas recuperadas de pombos (n = 47) no HV-UFGM, Belo-Horizonte, Minas Gerais, Brasil.	117
Tabela 16 - Frequência e distribuição de roedores e marsupiais capturados no Parque Municipal Jacques Cousteau (parque 1) e no Parque Municipal Mangabeiras (parque 2) em Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil.....	119
Tabela 17 - Frequência e distribuição de espécies estafilocócicas isoladas de roedores (n=136) de dois parques urbanos em Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil.	120
Tabela 18 - Caracterização dos isolados estafilocócicos obtidos de animais capturados no Parque 1 (transectos 1 e 2) que apresentaram resistência a antimicrobianos.	121
Tabela 19 - Frequência, distribuição e fenótipos de resistência antimicrobiana de espécies estafilocócicas recuperadas de quatis (n = 55) no estado de Minas Gerais, Brasil.	122
Tabela 20 - Frequência e distribuição de espécies estafilocócicas isoladas de lobo-guará (<i>Chrysocyon brachyurus</i>), onça-pintada (<i>Panthera onca</i>) e leão (<i>Panthera leo</i>) mantidos em cativeiro no Zoológico de Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil.	123
Tabela 21 - Frequência, distribuição e fenótipos de resistência antimicrobiana de espécies estafilocócicas recuperadas de jabutis saudáveis (n = 66) em Minas Gerais, Brasil.....	127
Tabela 22 – Principais achados sobre estafilococos e susceptibilidade a antimicrobianos em diferentes espécies de animais silvestres.	127

LISTA DE ABREVIATURAS

°C	Graus Celsius
CC	Complexo clonal
CDC	Center for Disease Control and Prevention
CETAS	Centro de Triagem de Animais Silvestres
CEUA	Comitê de Ética em Uso Animal
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 Types
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
ICMBio	Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade
IFC	Infecção de ferida cirúrgica
IUCN	International Union for Conservation of Nature
ITU	Infecção de trato urinário
L	Litro
MALDI-TOF	Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization – Time of Flight
MDR	Multi-drug resistance ou multirresistência antimicrobiana
mg	Miligramas
MGE	Mobile Genetic Element ou elemento genético móvel
MH	Müller-Hinton
mm	Milímetros

MLSA	Multi-Locus Sequence Analysis
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	Nucleotide Basic Local Alignment Search Tool
NCBI	National Center for Biotechnology Information
NIT	Nitrofurantoína
OIE	Organização Mundial de Saúde Animal
OMS	Organização Mundial da Saúde
OR	Odds ratio ou Razão de chances
OXA	Oxacilina
PMM	Parque Municipal das Mangabeiras
PCR	Polimerase Chain Reaction
PEN	Penicilina
RAM	Resistência a antimicrobianos
RIF	Rifampicina
rRNA	Ácido ribonucleico ribossômico
RT	Real time
SCC _{mec}	Staphylococcal Cassette Chromosome <i>mec</i>
SISBIO	Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade
SIG	Grupo <i>Staphylococcus intermedius</i>
SISGEN	Sistema Nacional de Gestão do Patrimônio Genético e Conhecimento Tradicional Associado
spp.	Espécies
ST	Sequence type
SXT	Sulfametoxazol/trimetoprima
TET	Tetraciclina
UFMG	Universidade Federal de Minas Gerais

Sumário

1. INTRODUÇÃO.....	21
2. OBJETIVOS.....	22
3. REVISÃO DE LITERATURA.....	22
3.1 Gênero <i>Staphylococcus</i>	22
3.2 Gênero <i>Staphylococcus</i> em cães.....	23
3.2.1 Grupo <i>Staphylococcus intermedius</i> (SIG).....	23
3.2.2 <i>Staphylococcus pseudintermedius</i>	24
3.2.3 <i>Staphylococcus pseudintermedius</i> resistente à meticilina (MRSP).....	26
3.2.3.1 Epidemiologia.....	26
3.2.3.2 Diversidade genética.....	28
3.2.4 MRSP em hospitais veterinários.....	30
3.2.5 MRSP em humanos.....	32
4. REFERÊNCIAS.....	37
5. CAPÍTULO 1: Diversidade e resistência a antimicrobianos em <i>Staphylococcus</i> spp. isolados de cães.....	52
5.1 Isolamento e caracterização de <i>Staphylococcus</i> spp. em cães com diferentes enfermidades atendidos em Belo Horizonte, Minas Gerais.....	52
5.1.1 INTRODUÇÃO.....	54
5.1.2 MATERIAL E MÉTODOS.....	55
5.1.2.1 Delineamento experimental.....	55
5.1.2.2 Coleta, isolamento e identificação das amostras.....	56
5.1.2.3 Teste de suscetibilidade antimicrobiana.....	57
5.1.2.4 Extração de DNA e detecção do gene <i>mecA</i>	58
5.1.2.5 Tipagem de sequência Multilocus (MLST).....	58
5.1.2.6 Análise estatística.....	58
5.1.3 RESULTADOS.....	59
5.1.3.1 Coleta de dados.....	59
5.1.3.2 Isolamento e identificação de amostras.....	59
5.1.3.3 Suscetibilidade a antimicrobianos.....	62
5.1.3.4 Estafilococos resistente à meticilina.....	65
5.1.3.5 MRSP.....	65
5.1.3.6 Preditores para MRSP.....	69
5.1.4 DISCUSSÃO.....	69
5.1.5 AGRADECIMENTOS.....	72
5.1.6 REFERÊNCIAS.....	73

5.2 Isolamento, caracterização, resistência a antimicrobianos e dinâmica de colonização de <i>Staphylococcus</i> spp. em cães internados na Unidade de Terapia Intensiva do Hospital veterinário da UFMG.....	80
5.2.1 INTRODUÇÃO.....	81
5.2.2 MATERIAL E MÉTODOS.....	82
5.2.2.1 Delineamento experimental.....	82
5.2.2.2 Coleta, isolamento e identificação das amostras.....	82
5.2.2.3 Teste de suscetibilidade antimicrobiana.....	83
5.2.2.4 Extração de DNA e detecção do gene <i>mecA</i>	84
5.2.2.5 Análise estatística.....	84
5.2.3 RESULTADOS.....	84
5.2.3.1 Coleta de dados.....	84
5.2.3.2 Isolamento.....	85
5.2.3.3 Distribuição de espécies de <i>Staphylococcus</i>	86
5.2.3.4 Resistência a antimicrobianos.....	87
5.2.3.4.1 Resistência geral.....	87
5.2.3.4.2 Resistência à metilina (MRS).....	90
5.2.3.4.3 Resistência genotípica (gene <i>mecA</i>).....	90
5.2.3.4.4 Resistência fenotípica à metilina (resistência à cefoxitina).....	91
5.2.3.5 Dinâmica de colonização de estirpes MRSP nos cães internados na UTI do HV-UFMG.....	92
5.2.3.6 Preditores para MRSP em cães internados na UTI do HV-UFMG.....	96
5.2.4 DISCUSSÃO.....	97
5.2.5 AGRADECIMENTOS.....	101
5.2.6 REFERÊNCIAS.....	102
6. CAPÍTULO 2: Diversidade e resistência a antimicrobianos em <i>Staphylococcus</i> spp. de animais silvestres de diferentes origens.....	106
6.1 INTRODUÇÃO.....	107
6.2 MATERIAL E MÉTODOS.....	109
6.2.1 Amostras.....	109
6.2.1.1 Amostras de pombos (<i>Columbia livia</i>).....	109
6.2.1.2 Amostras de roedores e marsupiais de vida livre.....	111
6.2.1.3 Amostras de quatis (<i>Nasua nasua</i>).....	113
6.2.1.4 Amostras de canídeos e felídeos silvestres do Zoológico de Belo Horizonte.....	114
6.2.1.5 Amostras de jabutis (<i>Chelonoidis carbonaria</i>).....	115
6.2.2 Isolamento e identificação de <i>Staphylococcus</i> spp.....	115
6.2.3 Suscetibilidade a antimicrobianos e detecção do gene <i>mecA</i>	116
6.2.4 MLST de <i>S. pseudintermedius</i> de canídeos silvestres.....	116
6.2.5 Análise estatística.....	117

6.3 RESULTADOS.....	117
6.3.1 Pombos (<i>Columbia livia</i>).....	117
6.3.2 Roedores e marsupiais de vida livre.....	118
6.3.3 Quatis (<i>Nasua nasua</i>).....	121
6.3.4 Canídeos e felídeos silvestres.....	122
6.3.5 Jabutis (<i>Chelonoidis carbonaria</i>).....	126
6.4 DISCUSSÃO.....	128
6.5 REFERÊNCIAS.....	136
6.6 AGRADECIMENTOS.....	145
7. CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	145
8. ANEXOS – Artigos publicados e produtos da tese.....	147

1. INTRODUÇÃO

Os estafilococos são importantes patógenos oportunistas que habitam a pele e mucosas da maioria das espécies animais. Por sua ampla capacidade de carrear e transmitir resistência a múltiplos antimicrobianos, esta bactéria tem causado preocupações significativas para a saúde humana e animal, sendo, atualmente, objeto de estudo em todo o mundo (Weese e Duijkeren, 2010; Pires Dos Santos et al., 2016; Lakhundi e Zhang, 2018).

Muitos trabalhos têm demonstrado a importância dos animais como reservatórios de microrganismos patogênicos relevantes, assim como na cadeia epidemiológica da resistência a antimicrobianos. Apesar de sua importância, ainda existem poucos estudos sobre estafilococos em cães no Brasil, principalmente sobre as estirpes resistentes à meticilina, como *Staphylococcus pseudintermedius* resistente a meticilina (MRSP) e *Staphylococcus aureus* resistente à meticilina (MRSA). Até o presente momento, pouco se sabe sobre padrões de resistência e, principalmente, sobre a estrutura populacional dessas espécies, tanto na comunidade, como no ambiente hospitalar (Penna et al., 2010; Botoni et al, 2016; Bourguignon et al, 2016; Scherer et al, 2018). Além disso, em um contexto mundial, poucos trabalhos investigaram a possível relação entre as diferentes manifestações clínicas, os padrões de resistência a antimicrobianos (RAM) e a estrutura populacional de *S. pseudintermedius* em cães.

Ao longo dos anos, os estafilococos e a RAM têm sido investigados com maior frequência em seres humanos e animais domésticos, mas há poucos estudos sobre a vida selvagem, principalmente em países em desenvolvimento (Himsworth et al., 2014). Sabe-se que alguns animais silvestres podem atuar como reservatórios para bactérias resistentes a antimicrobianos, transmitindo e disseminando estes microrganismos por diferentes rotas, incluindo fezes e urina (Jahan et al., 2020). Até o momento, a atenção tem sido voltada para os animais domésticos, porém, os animais silvestres, principalmente as espécies sinantrópicas e de hábitos generalistas, tais como pombos, roedores, marsupiais e quatis, também são importantes nesta cadeia, pois coabitam o mesmo ambiente e estão presentes em alta densidade na maioria dos centros urbanos (Spinelli et al. 2010; Silva et al. 2014; Torres-Mejía et al. 2018; Santana et al. 2022).

É evidente e preocupante a limitação de estudos sobre colonização e perfil de resistência a antimicrobianos de estafilococos potencialmente patogênicos em animais domésticos no

Brasil e silvestres em todo o mundo. Hoje em dia, os animais domésticos são intimamente tratados como parte das famílias e os animais silvestres estão cada vez mais inseridos nos ambientes urbanos e submetidos, direta ou indiretamente, à atividade antrópica. Dessa forma, conhecer o perfil e a dinâmica de colonização dos estafilococos nestes animais, assim como a carga de resistência que carregam, pode levar ao entendimento do potencial risco que representam para a comunidade, para que assim, medidas de prevenção e combate a possíveis ameaças sejam, estrategicamente, aplicadas.

2. OBJETIVOS

Os objetivos deste estudo foram: (1) avaliar a dinâmica de infecção/colonização, os fatores de risco, a diversidade genética e a resistência a antimicrobianos de estirpes de *S. pseudintermedius* isoladas de cães nos ambientes de clínica e Unidade de Terapia Intensiva (UTI) do Hospital Veterinário da Universidade Federal de Minas Gerais (HV-UFMG); (2) realizar um estudo sobre a colonização e perfil de resistência a antimicrobianos de estafilococos em diferentes espécies de animais silvestres incluindo roedores, marsupiais, quatis, canídeos, felídeos, pombos e jabutis.

3. REVISÃO DE LITERATURA

3.1 Gênero *Staphylococcus*

Staphylococcus spp. são bactérias cocoides, gram-positivas, anaeróbias facultativas, que integram a microbiota da pele e mucosas de seres humanos e animais. Podem ser classificados quanto à presença da enzima coagulase em dois grupos: *Staphylococcus* coagulase-positivos (CoPS) e *Staphylococcus* coagulase-negativos (CoNS). Ambos possuem potencial patogênico e atuam como microrganismos oportunistas, porém, espécies CoPS são consideradas de maior patogenicidade e mais comumente envolvidas em quadros infecciosos (Griffeth et al., 2008; Becker et al., 2014; Ma et al., 2020; Suepaul et al., 2021).

Com mais de 75 espécies e 30 subespécies descritas, as bactérias deste gênero parecem ter predileção por determinados hospedeiros (Griffeth et al., 2008; Jaradat et al., 2020; Ma et al., 2020; Suepaul et al., 2021). *S. aureus* é frequentemente isolado de humanos, mas também

é um importante agente infeccioso em medicina veterinária. Pode ser isolado de quadros infecciosos de diferentes espécies animais, mas é associado com maior frequência a infecções de bovinos e bubalinos. Outras espécies também têm relevância veterinária, com destaque para *S. hyicus* subsp. *hyicus* em suínos, *S. epidermidis* em caprinos e ovinos, *Staphylococcus felis* em gatos e *S. pseudintermedius* em cães (Megid, Ribeiro e Paes, 2016; Jaradat *et al.*, 2020; Bannoehr e Guardabassi, 2012; Bierowiec *et al.*, 2019).

3.2 Gênero *Staphylococcus* em cães

3.2.1 Grupo *Staphylococcus intermedius* (SIG)

Por mais de trinta anos, *S. intermedius* foi designado, erroneamente, como principal patógeno relacionado a quadros infecciosos de pele e mucosas de cães (Hájek, 1976). Porém, em 2005, com a evolução das técnicas de diagnóstico molecular, uma nova espécie foi descrita e denominada *S. pseudintermedius* (Devriese *et al.*, 2005). O nome designado reflete a alta similaridade fenotípica com *S. intermedius*, o que explica o diagnóstico equivocado por tantas décadas. Provas bioquímicas não são capazes de diferenciá-los assertivamente, pois há variações de resultados dentro das próprias espécies (Devriese *et al.*, 2005; Bond e Loeffler, 2012). A alta semelhança não é apenas fenotípica. A análise da sequência do gene *16S rRNA* de *S. pseudintermedius* aponta 99% de similaridade com as sequências de *S. intermedius* e *S. delphini*, o que resultou na sua inclusão no mesmo grupo filogenético, até então, composto por estas duas espécies, denominado Grupo *S. intermedius* (SIG), que hoje abrange também as espécies *S. cornubiensis* e *S. ursi* (Takahashi *et al.*, 1999; Devriese *et al.*, 2005; van Duijkeren *et al.*, 2011; Perreten *et al.*, 2020). A descoberta levou a uma reclassificação dos isolados de *S. intermedius* e, estudos realizados após este evento, revelaram que 100% das estirpes de cães anteriormente identificadas como *S. intermedius*, eram, na verdade, *S. pseudintermedius* (Sasaki *et al.*, 2007b; Devriese *et al.*, 2009). Assim, a partir destes resultados, foi estabelecido que todas as amostras isoladas de cães, antes designadas como *S. intermedius*, fossem reclassificadas como *S. pseudintermedius*, a menos que o contrário fosse provado por métodos de tipificação genética (Sasaki *et al.*, 2007b; Devriese *et al.*, 2009).

S. pseudintermedius é, portanto, a principal espécie de estafilococos encontrada em cães. Podem ser isolados de diferentes sítios muco-epiteliais, como narinas, boca, faringe, virilha,

vagina, prepúcio, ânus, axilas e orelhas de indivíduos saudáveis, mas também de espécimes clínicos de quadros infecciosos secundários, como afecções de pele, otites, infecções do trato geniturinário e infecções de feridas cirúrgicas (Griffeth *et al.*, 2008; Takahashi *et al.*, 1999; Devriese *et al.*, 2005; van Duijkeren *et al.*, 2011; Bannoehr e Guardabassi, 2012; Bergot *et al.*, 2018). Em casos raros, pode haver ainda a ocorrência de sepse e morte em animais muito jovens (Headley *et al.*, 2017; Zakošek Pipan *et al.*, 2019).

3.2.2 *Staphylococcus pseudintermedius*

S. pseudintermedius é um microrganismo oportunista comensal da pele e mucosas de cães (Bannoehr e Guardabassi, 2012). Possui distribuição mundial, cujos relatos de frequência em cães saudáveis variam de 40% a 90%, sendo influenciados de acordo com a população estudada, o local amostrado, o número de sítios amostrados por animal, a metodologia empregada e a localização geográfica (Bannoehr e Guardabassi, 2012; Smith *et al.*, 2020). Segundo Bannoehr e Guardabassi (2012), o reto parece ser o melhor local para isolamento do agente, seguido por boca, narinas e virilha. Entretanto, para aumento considerável da taxa de isolamento, a amostragem de mais de um sítio anatômico é recomendada (Rubin e Chirino-Trejo, 2011; Ma *et al.*, 2019).

Embora seja um integrante da microbiota natural do cão, diversos estudos apontam a ocorrência de *S. pseudintermedius* em diferentes quadros infecciosos (Penna *et al.*, 2010; van Duijkeren *et al.*, 2011; Griffeth *et al.*, 2008; Bannoehr e Guardabassi, 2012; Bergot *et al.*, 2018). A patogênese e importância clínica desta bactéria é determinada principalmente pelos fatores de virulência e de resistência a antimicrobianos que possui ou pode adquirir através de processos de co-colonização (Hritcu *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, infecção e disseminação da bactéria. Dentre eles, encontra-se enzimas (coagulase, proteases e termonucleases), toxinas (hemolisinas, toxinas exfoliativas e enterotoxinas), fatores de adesão (como proteína A) e a capacidade de formação de biofilme (Futagawa-Saiko *et al.*, 2006; Hritcu *et al.*, 2020). Apesar de conhecidos, pouco se sabe ainda sobre estes fatores em *S. pseudintermedius*, o que, conseqüentemente, impacta o entendimento sobre a sua patogênese (Ferrer *et al.*, 2021).

Diante do grande número de fatores de virulência encontrados em *S. pseudintermedius* e do pouco conhecimento acerca da patogênese deste microrganismo, mais estudos são necessários para a melhor compreensão dos processos de colonização e infecção. Esta bactéria tem, cada vez mais, sido relatada em diferentes quadros infecciosos, principalmente piodermites, otites, infecções do trato geniturinário (ITU) e infecções de ferida cirúrgica (IFC) (Penna et al., 2010; van Duijkeren et al., 2011; Griffeth et al., 2008; Bannoehr e Guadabassi, 2012; Bergot et al., 2018). As piodermites, classificadas como superficiais ou profundas, geralmente são secundárias a alergias, endocrinopatias, ectoparasitas ou outras doenças dermatológicas (Bloom, 2014; Lynch and Helbig, 2021), apresentando altas taxas de frequência que podem corresponder a mais de 90% dos casos, dependendo do grupo estudado (Griffeth et al., 2008; Onuma, Tanabe e Sato, 2012; Larsen et al., 2018; Lynch and Helbig, 2021). No cenário brasileiro, a taxa de ocorrência de *S. pseudintermedius* em piodermites é próxima de 90% (Botoni et al., 2016; Bourguignon et al., 2016).

Assim como as piodermites, otites por *S. pseudintermedius* geralmente são secundárias a outras doenças (Bourély et al., 2019; Lynch e Helbig, 2021). As taxas de frequência variam entre 20 e 90%, geralmente sendo comum valores com média de 30% (Dziva et al., 2015; Bourély et al., 2019; Lee et al., 2019; Lynch e Helbig, 2021). No Brasil, variações de 30% a 60% foram relatadas (Penna et al., 2010; Scherer et al., 2018). Em relação às ITUs, a principal bactéria atuante é a *Escherichia coli*, mas *S. pseudintermedius* figura entre os agentes mais relevantes deste tipo de enfermidade, principalmente em cistites, sendo a principal bactéria gram-positiva isolada (Lynch e Helbig, 2021). As taxas de frequência podem variar de 9% a 94% em certos casos (Windahl et al., 2014; Lynch e Helbig, 2021), tendo sido relatada como 30% no Brasil (Penna et al., 2010).

Apesar da evidente predileção por cães, existem relatos de infecção e colonização em outras espécies (Devriese et al., 2005), dentre elas, a espécie humana (Somayaji *et al.*, 2016; Ference *et al.*, 2019). Na maioria dos casos, as pessoas infectadas ou colonizadas apresentavam contato próximo e contínuo com animais domésticos, principalmente com cães, o que sugere uma transmissão zoonótica. Adicionalmente, a maioria destas infecções e colonizações descritas ocorreram por estirpes resistentes a múltiplos antimicrobianos, também conhecidas como *S. pseudintermedius* resistentes à meticilina (MRSP), o que eleva o nível de preocupação ao cenário da saúde pública, visto o número reduzido de opções de antibióticos disponíveis para

tratamento desta infecção (Descloux et al., 2008; Stegmann et al., 2010; Paul et al., 2011; Somayaji et al., 2016; Lozano et al., 2017; Pomba et al., 2017).

3.2.3 *Staphylococcus pseudintermedius* resistente à meticilina (MRSP)

3.2.3.1 Epidemiologia

O gênero *Staphylococcus* é conhecido por carrear genes de resistência a todos os antimicrobianos disponíveis para uso clínico em medicina veterinária (Morris et al., 2017). Assim como é observado em outras bactérias, há uma crescente expansão de estirpes de *S. pseudintermedius* resistentes a múltiplos antimicrobianos (MDR) (Nisa et al., 2019; Meroni et al., 2019). A aquisição de transposons carregadores 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 MRSP, por si só, são consideradas MDR, pois apresentam resistência a todos os antimicrobianos beta-lactâmicos disponíveis no mercado veterinário (Frank e Loeffler, 2012; Kadlec e Schwarz, 2012). Por transferência horizontal, elas adquirem o gene *mecA*, que está presente em um elemento genético móvel denominado cassete cromossômico estafilocócico *mec* (SCC*mec*). A partir deste evento, passam a produzir uma proteína ligadora de penicilina alterada (PBP-2a) que não se liga mais a este grupo de antimicrobianos, justificando, assim, a resistência (Kadlec e Schwarz, 2012). O primeiro relato de MRSP foi descrito por Gortel et al. (1999). Desde então, a distribuição destas estirpes tem aumentado drasticamente em todo o mundo, com ocorrência acima de 60% em alguns países (Kawakami et al., 2010; Pires Dos Santos et al., 2016).

No Brasil, poucos estudos avaliaram a ocorrência de MRSP em cães até o momento. Apesar de escassos, os trabalhos disponíveis têm demonstrado dados alarmantes, com frequências cronologicamente ascendentes, que levantam a hipótese sobre a emergência e disseminação generalizada destes microrganismos multirresistentes pelo país (Lilenbaum et al., 2000; Penna et al., 2009; Penna et al., 2010; Silva et al., 2014; Lopes et al., 2015; Botoni et al., 2016; Bourguignon et al., 2016; Scherer et al., 2018).

No Estado do Rio de Janeiro, dois estudos foram realizados com isolados de *Staphylococcus* spp. obtidos de cães com piodermite e otite externa. Aproximadamente 13% dos isolados obtidos de cães com piodermite eram MRSP e, surpreendentemente, 94,9% foram resistentes a três ou mais classes de antimicrobianos, ou seja, foram multirresistentes (Penna et al., 2009). Semelhantemente, para otite, 14,3% dos cães estavam infectados com MRSP e 89,1% dos isolados apresentaram multirresistência (Penna et al., 2010). Os dois estudos testaram os antimicrobianos que eram mais utilizados na rotina veterinária da época, e ambos alegam que a elevada taxa de multirresistência provavelmente estaria relacionada ao tratamento empírico e uso indiscriminado de antibióticos. Outra importante questão abordada por Penna et al. (2010), foi o considerável aumento da multirresistência ao longo do tempo, na mesma região, quando comparou seus resultados com um estudo realizado pelo mesmo grupo no ano 2000, cuja taxa de multirresistência em estafilococos de cães com otite foi de 36,4% (Lilenbaum et al., 2000). Recentemente, Holmström et al. (2020) realizaram outro estudo no Rio de Janeiro, em que avaliaram a taxa de estirpes MRSP em isolados de otites, piodermite e ITUs. O valor encontrado foi de 43,9% e sugere que a resistência se mantém em ascendência mesmo após 10 anos do último estudo realizado na região.

No estado de Minas Gerais, um estudo realizado por Bourguignon et al. (2016) revelou uma incidência de 94,3% de isolados MRSP obtidos de cães com piodermite atendidos em um hospital veterinário de Viçosa. Esta alta frequência foi detectada apenas genotipicamente, pela presença do gene *mecA*, pois a detecção fenotípica, referente à resistência à oxacilina, apontou apenas 17% de estirpes MRSP. Apesar da comprovada correlação existente entre os resultados destas duas técnicas, os autores justificaram esta divergência em razão de que todos os isolados MRSP susceptíveis à oxacilina poderiam não estar expressando o gene *mecA*. A justificativa é possível, porém, contrária a vários outros estudos e ao próprio órgão responsável pelo desenvolvimento e padronização de testes de susceptibilidade aos antimicrobianos (Clinical and Laboratory Standards Institute - CLSI) (Bemis et al., 2006; Schissler et al., 2009; CLSI, 2021). De qualquer forma, esta frequência é muito preocupante, o que reflete a necessidade de monitoramento através de estudos e levantamentos epidemiológicos sobre estes microrganismos.

Ainda em Minas Gerais, no município de Belo Horizonte, Botoni et al. (2016) relataram ocorrência de 37% de estirpes MRSP em lesões de pele e narinas de cães com piodermite atendidos no HV-UFGM. Vinte e oito por cento dos isolados obtidos neste estudo foram

resistentes a mais de seis tipos distintos de antimicrobianos e apenas 10% das estirpes foram sensíveis a todos os medicamentos testados. Outro estudo realizado também no HV-UFMG, conduzido por Scherer et al. (2018), avaliou a frequência e susceptibilidade de *S. pseudintermedius* isolados de cães com otite. Os autores relataram a ocorrência de 40,9% de estirpes MRSP e destacaram que 59,1% dos isolados foram multirresistentes.

É possível constatar que, ao longo do tempo, houve um aumento da ocorrência de infecções por MRSP em cães nos atendimentos clínicos dermatológicos de hospitais e clínicas veterinárias de diferentes regiões do país. Os estudos realizados por Botoni et al. (2016) e Scherer et al. (2018) permitiram confirmar que no HV-UFMG existe uma circulação relativamente alta de pacientes infectados por MRSP. Um melhor entendimento sobre a incidência de infecção e colonização por MRSP em diferentes sítios anatômicos, assim como sobre os possíveis fatores que contribuem para a infecção e colonização de cada um deles, permitiria criar medidas de controle e prevenção já direcionadas aos riscos, aumentando consideravelmente as chances de redução de uma alta taxa de ocorrência (Stull et al., 2018). Além disso, outros métodos, como técnicas de tipificação genética, também poderiam ser utilizados para obter mais informações e uma melhor compreensão da dinâmica de dispersão destas estirpes (Duum et al., 2016).

3.2.3.2 Diversidade genética

S. pseudintermedius é conhecido por sua alta diversidade genética, sendo possível que diferentes estirpes colonizem ou infectem um mesmo animal (Bannoehr e Guadabassi, 2012; Larsen et al., 2018). O uso de métodos como *Multilocus Sequence Typing* (MLST) permite avaliar esta diversidade, analisar a estrutura da população e estabelecer possíveis relações de ancestralidade (Solyman et al., 2013; Pires dos Santos et al., 2016). O método avalia o polimorfismo de genes conservados para a detecção de variação de sequências nos loci. Os resultados são diferentes perfis alélicos, denominados, também, de "sequence types" (STs). Pelo grau de similaridade, o MLST agrupa as estirpes em "clusters", também conhecidos como complexos clonais (CC) (Solyman et al., 2013), conforme ilustrado na figura 1.

No contexto mundial, os principais CCs de MRSP já relatados são: CC71 e CC258 na Europa, CC68 na América do Norte, e CC45 e CC112 na Ásia (Perreten et al., 2010; Pires dos Santos et al., 2016; Meroni et al., 2019). Embora haja associação entre os CCs e a localização

geográfica, todos esses perfis já foram relatados em outros continentes, o que demonstra a ampla capacidade de disseminação dessas bactérias (Pires dos Santos *et al.*, 2016). No Brasil, apenas a linhagem ST71 (pertencente ao CC71) foi relatada até os dias atuais, sendo isolada da microbiota nasal de um cão saudável que participou de um estudo em uma clínica no Rio de Janeiro (Quitoco *et al.*, 2013).

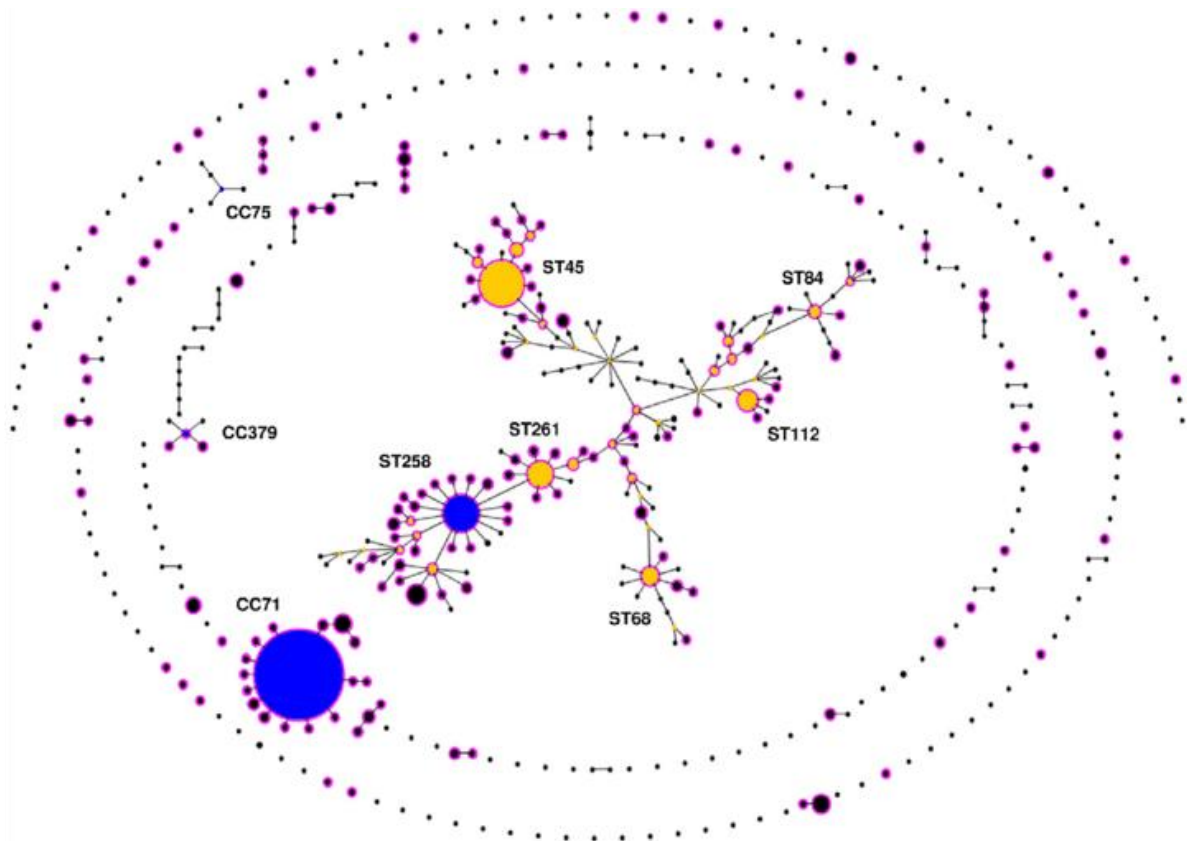


Figura 1 – Estrutura populacional de *S. pseudintermedius* mediante análise eBURST. Os complexos clonais de maior relevância são indicados em azul (fundadores primários) e amarelo (fundadores de subgrupos). O diâmetro dos círculos é diretamente proporcional ao número total de isolados relatados no banco de dados MLST (<http://pubmlst.org/spseudintermedius/>). Imagem adaptada de Pires dos Santos *et al.* (2016). CC: complexo clonal; ST: Sequence type.

Estudos demonstram que pode haver associação entre a linhagem da estirpe e os padrões de resistência a antimicrobianos encontrados. 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 ocorrência da mesma tem reduzido, enquanto a frequência de outras linhagens, como o ST258 e ST496 aumentaram (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 e Guadabassi, 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 metilicilina.

3.2.4 MRSP em hospitais veterinários

Nas últimas décadas, muitos avanços técnicos foram obtidos na medicina veterinária com o objetivo de melhorar e prolongar a vida dos animais. Dispositivos e procedimentos cirúrgicos invasivos, terapias imunossupressoras, antimicrobianos, hospitalizações prolongadas e cuidados mais intensivos são considerados progressos para a saúde animal. Porém, em contrapartida, tudo isso tem contribuído para o aumento da incidência de infecções nosocomiais em hospitais veterinários (Stull e Weese, 2015). MRSP tem sido uma causa comum de infecções nosocomiais em todo o mundo (Sasaki et al., 2007a; Ishihara et al., 2010; Nienhoff et al., 2011b; Grönthal et al., 2014; Lehner et al., 2014; Qekwana et al., 2017; Shoen et al., 2019). Embora frequentemente isolada de pacientes ambulatoriais, esta bactéria tem sido também isolada do próprio ambiente, incluindo superfícies, equipamentos e fômites, assim como de funcionários e de pacientes internados (Sasaki et al., 2007a; Bergström et al., 2012; Hamilton et al., 2012; Shoen et al., 2019).

Os fatores de risco inerentes à colonização/infecção nosocomial especificamente por MRSP mais relatados na literatura são: hospitalização prévia recente, visitas frequentes ao veterinário, animais com doenças de pele crônicas e uso prévio de antimicrobianos (principalmente, beta-lactâmicos) (Nienhoff et al., 2011a; Nienhoff et al., 2011b; Weese et al.,

2012; Lehner et al., 2014; Hensel et al., 2016). De uma maneira geral, todos os animais admitidos diariamente em clínicas e hospitais veterinários, doentes ou saudáveis, são potenciais carreadores e transmissores de patógenos multirresistentes causadores de infecções nosocomiais, como MRSP, o que eleva ainda mais a importância de estudos epidemiológicos sobre patógenos MDR nestes ambientes (Stull e Weese, 2015). Mais alguns fatores de risco frequentemente associados à introdução de patógenos MDR, em geral, estão sumarizados na Tabela 1. Juntamente são apresentados, também, fatores de risco para pacientes se tornarem portadores de patógenos MDR, assim como para desenvolverem infecções por patógenos MDR em clínicas e hospitais veterinários.

Tabela 1 – Fatores de risco associados à introdução, colonização e desenvolvimento de infecção por bactérias resistentes a múltiplos antimicrobianos (MDR) em instalações veterinárias.

Risco	Fatores de risco	Referências
Introdução de bactérias MDR	Clínicas e hospitais com maior encaminhamento de pacientes; Animais que já tiveram infecções anteriores por patógenos MDR ou convivem com animal ou pessoas que já tiveram; Animais residentes de clínicas e hospitais veterinários; Veterinários com carreamento assintomático de patógenos MDR.	Hanselman et al. (2006); Duijkeren et al. (2010); Jordan et al. (2011); Ghosh et al. (2012); Stull e Weese (2015); Morris et al. (2017); Walther, Tedin e Lübke-becker (2017);
Colonização por bactérias MDR dentro de instalações veterinárias	Hospitalização prolongada; Tratamento com antimicrobiano antes da admissão; Tratamento prolongado com antimicrobianos; Profilaxia antimicrobiana; Internação na Unidade de Terapia Intensiva (UTI); Uso de doses subterapêuticas de antimicrobianos, biocidas e compostos metálicos por longos períodos.	Weese et al. (2006); Gibson et al. (2011); Ghosh, Dowd e Zurek (2011); Nienhoff et al. (2011a); Damborg et al. (2012); Maddox et al. (2012); Lehner et al. (2014); Argudín et al. (2017).
Desenvolvimento de infecção por bactérias MDR dentro de instalações veterinárias	Hospitalização prolongada; Tratamento com antimicrobianos; Cateterismo intravenoso; Quantidade de funcionários trabalhando no ambiente; Pacientes imunossuprimidos.	Faires et al. (2010); Van den Eede et al. (2012); Suthar et al. (2014); Walther et al. (2014); Stull et al. (2018).

No ambiente hospitalar veterinário, uma área pouca estudada quanto à dinâmica de infecções por MRSP, porém de grande importância, é a Unidade de terapia intensiva (UTI). Este ambiente geralmente fornece uma boa condição de seleção e sobrevivência para patógenos multirresistentes, já que estes podem suportar o uso extensivo de diferentes antibióticos e desinfetantes (Stull et al., 2018; Shoen et al., 2019). Shoen et al. (2019) realizaram um estudo em que foram coletadas amostras ambientais de uma UTI de um hospital veterinário. O

resultado confirmou a presença de diferentes espécies de MRS, dentre eles MRSP. Todas as amostras isoladas foram resistentes ao protocolo de desinfecção que era utilizado na instalação da UTI, o que levou à sua modificação. MRSP e MRSA também foram identificados em outro estudo realizado em UTI, em que foram isolados tanto dos pacientes, quanto de superfícies ambientais (Cocca et al., 2021). Mesmo escassos, os dados sobre *Staphylococcus* multirresistentes nestas unidades são extremamente alarmantes. Frente a isso, uma avaliação interna dos registros clínicos de pacientes internados na UTI do HV-UFG, conduzida pelo Laboratório de Bacterioses e Pesquisa (dados não publicados), revelou a ocorrência frequente de infecções por MRSP nos animais internados neste local, o que fez com que o grupo se questionasse se estaria havendo colonização dos animais por MRSP após internação na UTI do HV-UFG, além de quais fatores de risco poderiam estar contribuindo para a ocorrência de tal evento.

3.2.5 MRSP em humanos

S. pseudintermedius não é um agente comensal de humanos, entretanto, é crescente o número de relatos referentes ao carreamento de MRSP por pessoas, em especial veterinários (van duijkeren et al., 2011; Guardabassi et al., 2013). Morris et al. (2010) demonstraram que veterinários dermatologistas de pequenos animais dos Estados Unidos apresentaram taxas de carreamento 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 caso evidenciam a alta similaridade entre estirpes isoladas dos pacientes humanos e cães residentes do mesmo ambiente domiciliar, 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 (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*, especialmente estirpes MRSP, em humanos, colocando assim, profissionais de medicina veterinária e tutores de cães como grupos de maior risco (Stegmann et al., 2010; van Duijkeren et al., 2011). Dessa forma, é essencial 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 (Stegmann 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).

3.3 Gênero *Staphylococcus* em animais silvestres

Os estafilococos são bactérias ubíquas capazes de sobreviver em condições ambientais adversas e, além da pele e mucosas de seres humanos e animais, podem ser encontrados no ar, poeira, água, solo, plantas ou superfícies ambientais (Silva et al., 2020). Esta onipresença possibilita um fluxo constante destas bactérias e de seus genes de resistência entre diferentes nichos ecológicos e seres vivos, apontando para a importância de estudá-las em outros contextos, como em animais de vida livre. No entanto, os dados sobre a distribuição e perfil de resistência de *Staphylococcus* spp. na fauna silvestre são escassos, sendo a maioria dos estudos focados em *S. aureus* (Heaton et al., 2020; Silva et al., 2020; Abdullahi et al., 2021; Honert, Van den et al., 2021), por ser a espécie comensal de seres humanos, responsável por infecções cujo tratamento é, muitas vezes, impossibilitado pela resistência a praticamente todos os antimicrobianos disponíveis (Lakhundi e Zhang, 2018).

S. aureus é realmente o representante mais importante do gênero *Staphylococcus*. Porém, outras espécies geralmente negligenciadas como as estirpes de *Staphylococcus* coagulase-negativas (CoNS), são de extrema relevância, pois, além de representarem a maioria dos estafilococos comensais de diferentes hospedeiros, podem causar infecções em seres humanos e animais, e têm ampla capacidade de adquirir, abrigar e transferir genes de resistência

para outros estafilococos e, até mesmo, para outras espécies bacterianas (Dimitriou et al., 2011; Persson Waller et al., 2011; Otto, 2013; Becker et al., 2014; Bierowiec et al., 2019; Heilmann et al., 2019; Rossi et al., 2020). Assim, CoNS são consideradas potenciais ameaças, pois podem transferir horizontalmente genes de RAM para espécies mais patogênicas, como o próprio *S. aureus*, aumentando, assim, sua capacidade de resistir à terapia medicamentosa (Haaber et al., 2017).

Embora a RAM seja considerada um dos maiores desafios para a segurança da saúde global (WHO, 2014), até o momento, a maioria das pesquisas sobre o tema tem sido baseada em ambientes clínicos (Davies e Davies, 2010). Os relatos na vida selvagem apenas especulam sobre possíveis fontes, mas pouco se sabe sobre o fluxo e destino de RAM no ambiente natural e sobre as diferentes espécies de animais silvestres que podem atuar eficientemente como dispersores (Greig et al., 2015; Huijbers et al., 2015). A figura 2 aponta o provável fluxo da RAM entre os diferentes nichos e ecossistemas existentes.

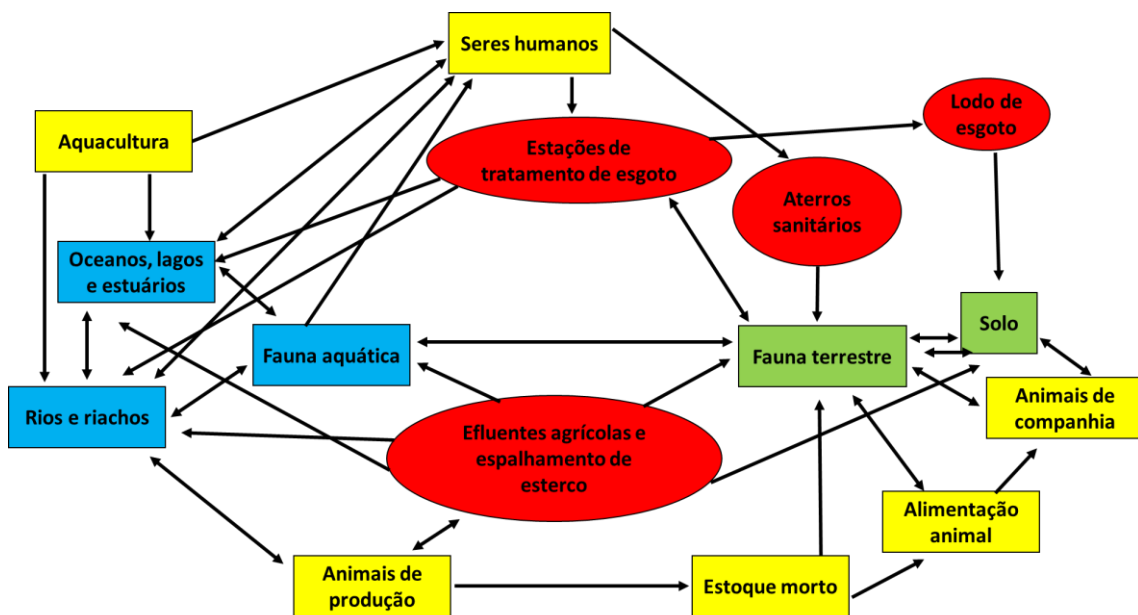


Figura 2 - Dispersão da resistência a antimicrobianos entre comunidades humanas, hospitais, estações de tratamento de esgoto, fazendas e o meio ambiente mais amplo, inclusive através da vida selvagem - adaptado de Arnold et al. (2016).

Com a crescente pressão das populações humanas em expansão, os animais silvestres são cada vez mais forçados a se alimentar de recursos contaminados pela antropização, não sendo surpreendente que a RAM venha sendo frequentemente descrita na vida selvagem peri-doméstica (Graham et al., 2014; Wiethoelter et al., 2015; Vittecoq et al., 2016; Santana et al., 2021). A RAM tem sido detectada, particularmente, entre bactérias comensais de mamíferos

selvagens, aves, répteis e peixes, com os padrões de frequência e resistência variando entre espécies, locais e, possivelmente, tempo (Cabello et al., 2013; Zigo, 2017; Mama et al., 2019; Ruiz-Ripa et al., 2020; Santana et al., 2021; Santana et al., 2022). Animais silvestres residentes de áreas relativamente remotas sem influência antrópica também já foram descritos como portadores de RAM, o que sugere que, na vida selvagem, a RAM não é simplesmente uma questão de contaminação ou seleção antrópica recente. O monitoramento de RAM dentro desses ecossistemas primitivos ou em sua interface com áreas de influência humana possibilita estimar a frequência com que genes que codificam resistência são trocados em comunidades microbianas, coexistindo dentro de populações humanas, animais domésticos e animais silvestres, bem como no ambiente mais amplo (Arnold et al., 2016).

As consequências para a vida selvagem da evolução da RAM, provavelmente, são pequenas (Arnold et al., 2016; Swift et al., 2019). O problema clínico da RAM, principalmente em populações humanas e de animais domésticos, é a ameaça à capacidade de tratar infecções com antimicrobianos, uma prática rara em populações selvagens, exceto em casos individuais de cativeiro, como em hospitais de vida selvagem, parques e zoológicos (Morris et al., 2013; Arnold et al., 2016). O principal problema enfrentado pelas populações de vida selvagem é a resposta do manejo, caso sejam consideradas fontes significativas de RAM para humanos e animais domésticos. Neste caso, das três abordagens existentes – separação, vacinação e controle da população – apenas o controle da população, geralmente por abate, é possível, uma vez que vacinação não pode controlar a RAM e a separação física de animais selvagens e animais de produção é dispendiosa, cara e impraticável. Assim, o abate é muitas vezes a abordagem adotada, no entanto, sua eficiência em animais selvagens no controle de doenças é, na melhor das hipóteses, controversa (Arnold et al., 2016).

É importante estudar a RAM na vida selvagem como um perigo potencial para a saúde pública, especialmente porque se pensa que cerca de 40% das doenças humanas emergentes se originaram na vida selvagem (Jones et al., 2008). O monitoramento da RAM na vida selvagem pode elucidar questões fundamentais na evolução e ecologia de transmissão de bactérias resistentes a antimicrobianos e determinantes de resistência que podem ser aplicados de volta à comunidade e aos ambientes clínicos. Uma melhor compreensão do papel da vida selvagem na disseminação da RAM pode orientar quais estratégias de controle e mitigação são necessárias e onde melhor aplicá-las. É importante entender que, enquanto a vida selvagem pode ser

dispersora de RAM, ela também pode ser sentinela para a abundância e distribuição de patógenos em nosso ambiente (Arnold et al., 2016; Swift et al., 2019).

4. REFERÊNCIAS

- ABDULLAHI, I.N.; FERNÁNDEZ-FERNÁNDEZ, R.; JUÁREZ-FERNÁNDEZ, G.; MARTÍNEZ-ÁLVAREZ, S.; EGUIZÁBAL, P.; ZARAZAGA, M.; LOZANO, C.; TORRES, C. Wild Animals Are Reservoirs and Sentinels of *Staphylococcus aureus* and MRSA Clones: A Problem with “One Health” Concern. **Antibiotics**, v.10, p.1556, 2021. DOI: 10.3390/antibiotics10121556.
- ARGUDÍN, M.; DEPLANO, A.; MEGHRAOUI, A.; DODÉMONT, M.; HEINRICHS, A.; DENIS, O.; NONHOFF, C.; ROISIN, S. Bacteria from Animals as a Pool of Antimicrobial Resistance Genes. **Antibiotics**, v.6, p.12, 2017. DOI: 10.3390/antibiotics6020012.
- ARNOLD, K.E.; WILLIAMS, N.J.; BENNETT, M. ‘Disperse abroad in the land’: the role of wildlife in the dissemination of antimicrobial resistance. **Biology Letters**, v.12, p.20160137, 2016a. DOI: 10.1098/rsbl.2016.0137.
- BANNOEHR, J.; GUARDABASSI, L. *Staphylococcus pseudintermedius* in the dog: taxonomy, diagnostics, ecology, epidemiology and pathogenicity. **Veterinary Dermatology**, v.23, p.253-e52, 2012. DOI: 10.1111/j.1365-3164.2012.01046.x.
- BECKER, K.; HEILMANN, C.; PETERS, G. Coagulase-negative staphylococci. **Clinical Microbiology Reviews**, v.27, p.870–926, 2014. DOI: 10.1128/CMR.00109-13.
- BEMIS, D.A.; JONES, R.D.; HIATT, L.E.; OFORI, E.D.; ROHRBACH, B.W.; FRANK, L.A.; KANIA, S.A. Comparison of Tests To Detect Oxacillin Resistance in *Staphylococcus intermedius*, *Staphylococcus schleiferi*, and *Staphylococcus aureus* Isolates from Canine Hosts. **Journal of Clinical Microbiology**, v.44, p.3374–3376, 2006. DOI: 10.1128/JCM.01336-06.
- BERGOT, M.; MARTINS-SIMÕES, P.; KILIAN, H.; CHÂTRE, P.; WORTHING, K.A.; NORRIS, J.M.; MADEC, J.-Y.; LAURENT, F.; HAENNI, M. Evolution of the Population Structure of *Staphylococcus pseudintermedius* in France. **Frontiers in Microbiology**, v.9, 2018.
- BERGSTRÖM, A.; GUSTAFSSON, C.; LEANDER, M.; FREDRIKSSON, M.; GRÖNLUND, U.; TROWALD-WIGH, G. Occurrence of methicillin-resistant Staphylococci in surgically treated dogs and the environment in a Swedish animal hospital. **Journal of Small Animal Practice**, v.53, p.404–410, 2012. DOI: 10.1111/j.1748-5827.2012.01238.x.
- BIEROWIEC, K.; KORZENIOWSKA-KOWAL, A.; WZOREK, A.; RYPUŁA, K.; GAMIAN, A. Prevalence of *Staphylococcus* Species Colonization in Healthy and Sick Cats. **BioMed Research International**, v.2019, p.4360525, 2019. DOI: 10.1155/2019/4360525.
- BLONDEAU, L.D.; RUBIN, J.E.; DENEER, H.; KANTHAN, R.; MORRISON, B.; SANCHE, S.; RYPIEN, C.; DUECK, D.; BECK, G.; BLONDEAU, J.M. Persistent infection with *Staphylococcus pseudintermedius* in an adult oncology patient with transmission from a family dog. **Journal of Chemotherapy (Florence, Italy)**, v.32, p.151–155, 2020. DOI: 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>

BOND, R.; LOEFFLER, A. What's happened to *Staphylococcus intermedius*? Taxonomic revision and emergence of multi-drug resistance. **The Journal of Small Animal Practice**, v.53, p.147–154, 2012. DOI: 10.1111/j.1748-5827.2011.01165.x.

BOTONI, L.S.; SCHERER, C.B.; SILVA, R.O.; COURA, F.M.; HEINEMANN, M.B.; PAES-LEME, F.O.; COSTA-VAL, A.P.; BOTONI, L.S.; SCHERER, C.B.; SILVA, R.O.; COURA, F.M.; HEINEMANN, M.B.; PAES-LEME, F.O.; COSTA-VAL, A.P. Prevalence and *in vitro* susceptibility of methicillin-resistant *Staphylococcus pseudintermedius* (MRSP) from skin and nostrils of dogs with superficial pyoderma. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v.36, p.1178–1180, 2016. DOI: 10.1590/s0100-736x2016001200006.

BOURÉLY, C.; CAZEAU, G.; JARRIGE, N.; LEBLOND, A.; MADEC, J.Y.; HAENNI, M.; GAY, E. Antimicrobial resistance patterns of bacteria isolated from dogs with otitis.

Epidemiology and Infection, v.147, p.e121, 2019. DOI: 10.1017/S0950268818003278.

BOURGUIGNON, E.; VIÇOSA, G.N.; CORSINI, C.M.M.; MOREIRA, M. A. S.; NERO, L.A.; CONCEIÇÃO, L.G.; BOURGUIGNON, E.; VIÇOSA, G.N.; CORSINI, C.M.M.; MOREIRA, M. A. S.; NERO, L.A.; CONCEIÇÃO, L.G. Description of Methicillin-resistant *Staphylococcus pseudintermedius* from canine pyoderma in Minas Gerais state, Brazil.

Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia, v.68, p.299–306, 2016. DOI: 10.1590/1678-4162-8150.

CABELLO, F.C.; GODFREY, H.P.; TOMOVA, A.; IVANOVA, L.; DÖLZ, H.; MILLANAO, A.; BUSCHMANN, A.H. Antimicrobial use in aquaculture re-examined: its relevance to antimicrobial resistance and to animal and human health. **Environmental Microbiology**, v.15, p.1917–1942, 2013. DOI: 10.1111/1462-2920.12134.

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

COCCA, G.; PIVA, S.; MAGNO, S.D.; SCARPELLINI, R.; GIACOMETTI, F.; SERRAINO, A.; GIUNTI, M. Prevalence and Patterns of Antimicrobial Resistance among *Escherichia coli* and *Staphylococcus* spp. in a Veterinary University Hospital. **Veterinary Sciences**, v.8, p.308, 2021. DOI: 10.3390/vetsci8120308.

DAMBORG, P.; MARSKAR, P.; BAPTISTE, K.E.; GUARDABASSI, L. Faecal shedding of CTX-M-producing *Escherichia coli* in horses receiving broad-spectrum antimicrobial prophylaxis after hospital admission. **Veterinary Microbiology**, v.154, p.298–304, 2012.

DOI: 10.1016/j.vetmic.2011.07.005.

DAVIES, J.; DAVIES, D. Origins and Evolution of Antibiotic Resistance. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v.74, p.417–433, 2010. DOI: 10.1128/MMBR.00016-10.

DESCLOUX, S.; ROSSANO, A.; PERRETEN, V. Characterization of New Staphylococcal Cassette Chromosome *mec* (SCC*mec*) and Topoisomerase Genes in Fluoroquinolone- and

Methicillin-Resistant *Staphylococcus pseudintermedius*. **Journal of Clinical Microbiology**, v.46, p.1818–1823, 2008. DOI: 10.1128/JCM.02255-07.

DEVRIESE, L.A.; HERMANS, K.; BAELE, M.; HAESBROUCK, F. *Staphylococcus pseudintermedius* versus *Staphylococcus intermedius*. **Veterinary Microbiology**, v.133, p.206–207, 2009. DOI: 10.1016/j.vetmic.2008.06.002.

DEVRIESE, L.A.; VANCANNEYT, M.; BAELE, M.; VANECHOUTTE, M.; DE GRAEF, E.; SNAUWAERT, C.; CLEENWERCK, I.; DAWYNDT, P.; SWINGS, J.; DECOSTERE, A.; HAESBROUCK, F. *Staphylococcus pseudintermedius* sp. nov., a coagulase-positive species from animals. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v.55, p.1569–1573, 2005. DOI: 10.1099/ij.s.0.63413-0.

DIMITRIOU, G.; FOUZAS, S.; GIORMEZIS, N.; GIANNAKOPOULOS, I.; TZIFAS, S.; FOKA, A.; ANASTASSIOU, D.E.; SPILIOPOULOU, I.; MANTAGOS, S. Clinical and microbiological profile of persistent coagulase-negative staphylococcal bacteraemia in neonates. **Clinical Microbiology and Infection**, v.17, p.1684–1690, 2011. DOI: 10.1111/j.1469-0691.2011.03489.x.

DUIM, B.; VERSTAPPEN, K.M.; BROENS, E.M.; LAARHOVEN, L.M.; DUIJKEREN, E. VAN; HORDIJK, J.; HEUS, P. DE; SPANINKS, M.; TIMMERMAN, A.J.; WAGENAAR, J.A. Changes in the Population of Methicillin-Resistant *Staphylococcus pseudintermedius* and Dissemination of Antimicrobial-Resistant Phenotypes in the Netherlands. **Journal of Clinical Microbiology**, v.54, p.283–288, 2016. DOI: 10.1128/JCM.01288-15.

DZIVA, F.; WINT, C.; AUGUSTE, T.; HEERAMAN, C.; DACON, C.; YU, P.; KOMA, L.M. First identification of methicillin-resistant *Staphylococcus pseudintermedius* strains among coagulase-positive staphylococci isolated from dogs with otitis externa in Trinidad, West Indies. **Infection Ecology & Epidemiology**, v.5, p.29170, 2015. DOI: 10.3402/iee.v5.29170.

FAIRES, M.C.; TRAVERSE, M.; TATER, K.C.; PEARL, D.L.; WEESE, J.S. Methicillin-Resistant and Susceptible *Staphylococcus aureus* Infections in Dogs. **Emerging Infectious Diseases**, v.16, p.69–75, 2010. DOI: 10.3201/eid1601.081758.

ERENCE, E.H.; DANIELIAN, A.; KIM, H.W.; YOO, F.; KUAN, E.C.; SUH, J.D. Zoonotic *Staphylococcus pseudintermedius* sinonasal infections: risk factors and resistance patterns. **International Forum of Allergy & Rhinology**, v.9, p.724–729, 2019. DOI: 10.1002/alr.22329.

FERRER, L.; GARCÍA-FONTICOPA, R.; PÉREZ, D.; VIÑES, J.; FÀBREGAS, N.; MADROÑERO, S.; MERONI, G.; MARTINO, P.A.; MARTÍNEZ, S.; MATÉ, M.L.; SÁNCHEZ-BRUNI, S.; CUSCÓ, A.; MIGURA-GARCÍA, L.; FRANCINO, O. Whole genome sequencing and de novo assembly of *Staphylococcus pseudintermedius*: a pangenome approach to unravelling pathogenesis of canine pyoderma. **Veterinary Dermatology**, v.32, p.654–663, 2021. DOI: 10.1111/vde.13040.

FRANK, L.A.; LOEFFLER, A. Methicillin-resistant *Staphylococcus pseudintermedius*: clinical challenge and treatment options. **Veterinary Dermatology**, v.23, p.283-e56, 2012. DOI: 10.1111/j.1365-3164.2012.01047.x.

FUTAGAWA-SAITO, K.; BA-THEIN, W.; FUKUYASU, T. High occurrence of multi-antimicrobial resistance in *Staphylococcus intermedius* isolates from healthy and diseased dogs and domesticated pigeons. **Research in Veterinary Science**, v.83, p.336–339, 2007. DOI: 10.1016/j.rvsc.2007.01.013.

GAGETTI, P.; WATTAM, A.R.; GIACOBONI, G.; DE PAULIS, A.; BERTONA, E.; CORSO, A.; ROSATO, A.E. Identification and molecular epidemiology of methicillin resistant *Staphylococcus pseudintermedius* strains isolated from canine clinical samples in Argentina. **BMC veterinary research**, v.15, p.264, 2019. DOI: 10.1186/s12917-019-1990-x.

GHOSH, A.; DOWD, S.E.; ZUREK, L. Dogs leaving the ICU carry a very large multi-drug resistant enterococcal population with capacity for biofilm formation and horizontal gene transfer. **PloS One**, v.6, p.e22451, 2011. DOI: 10.1371/journal.pone.0022451.

GHOSH, A.; KUKANICH, K.; BROWN, C.E.; ZUREK, L. Resident Cats in Small Animal Veterinary Hospitals Carry Multi-Drug Resistant Enterococci and are Likely Involved in Cross-Contamination of the Hospital Environment. **Frontiers in Microbiology**, v.3, 2012. DOI: 10.3389/fmicb.2012.00062.

GIBSON, J.S.; MORTON, J.M.; COBBOLD, R.N.; FILIPPICH, L.J.; TROTT, D.J. Risk factors for dogs becoming rectal carriers of multidrug-resistant *Escherichia coli* during hospitalization. **Epidemiology and Infection**, v.139, p.1511–1521, 2011. DOI: 10.1017/S0950268810002785.

GORTEL, K.; CAMPBELL, K.L.; KAKOMA, I.; WHITTEM, T.; SCHAEFFER, D.J.; WEISIGER, R.M. Methicillin resistance among staphylococci isolated from dogs. **American Journal of Veterinary Research**, v.60, p.1526–1530, 1999.

GRAHAM, D.W.; COLLIGNON, P.; DAVIES, J.; LARSSON, D.G.J.; SNAPE, J. Underappreciated Role of Regionally Poor Water Quality on Globally Increasing Antibiotic Resistance. **Environmental Science & Technology**, v.48, p.11746–11747, 2014. DOI: 10.1021/es504206x.

GREIG, J.; RAJIĆ, A.; YOUNG, I.; MASCARENHAS, M.; WADDELL, L.; LEJEUNE, J. A scoping review of the role of wildlife in the transmission of bacterial pathogens and antimicrobial resistance to the food Chain. **Zoonoses and Public Health**, v.62, p.269–284, 2015. DOI: 10.1111/zph.12147.

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, T.; MOODLEY, A.; NYKÄSENOJA, S.; JUNNILA, J.; GUARDABASSI, L.; THOMSON, K.; RANTALA, M. Large Outbreak Caused by Methicillin Resistant *Staphylococcus pseudintermedius* ST71 in a Finnish Veterinary Teaching Hospital – From

Outbreak Control to Outbreak Prevention. **PLoS ONE**, v.9, 2014. DOI: 10.1371/journal.pone.0110084.

RANTALA, M. Antimicrobial resistance in *Staphylococcus pseudintermedius* and the molecular epidemiology of methicillin-resistant *S. pseudintermedius* in small animals in Finland. **The Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v.72, p.1021–1030, 2017. DOI: 10.1093/jac/dkw559.

GUARDABASSI, L.; LARSEN, J.; WEESE, J.S.; BUTAYE, P.; BATTISTI, A.; KLUYTMANS, J.; LLOYD, D.H.; SKOV, R.L. Public health impact and antimicrobial selection of methicillin-resistant staphylococci in animals. **Journal of Global Antimicrobial Resistance**, v.1, p.55–62, 2013. DOI: 10.1016/j.jgar.2013.03.011.

HAABER, J.; PENADÉS, J.R.; INGMER, H. Transfer of Antibiotic Resistance in *Staphylococcus aureus*. **Trends in Microbiology**, v.25, p.893–905, 2017. DOI: 10.1016/j.tim.2017.05.011.

HAJEK, V. *Staphylococcus intermedius*, a new species isolated from animals. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v. 26, n. 4, p. 401–408, 1976.

HAMILTON, E.; KANEENE, J.B.; MAY, K.J.; KRUGER, J.M.; SCHALL, W.; BEAL, M.W.; HAUPTMAN, J.G.; DECAMP, C.E. Prevalence and antimicrobial resistance of *Enterococcus* spp and *Staphylococcus* spp isolated from surfaces in a veterinary teaching hospital. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v.240, p.1463–1473, 2012. DOI: 10.2460/javma.240.12.1463.

HAMILTON, E.; KRUGER, J.M.; SCHALL, W.; BEAL, M.; MANNING, S.D.; KANEENE, J.B. Acquisition and persistence of antimicrobial-resistant bacteria isolated from dogs and cats admitted to a veterinary teaching hospital. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v.243, p.990–1000, 2013. DOI: 10.2460/javma.243.7.990.

HANSELMAN, B.A.; KRUTH, S.A.; ROUSSEAU, J.; LOW, D.E.; WILLEY, B.M.; MCGEER, A.; WEESE, J.S. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* Colonization in Veterinary Personnel. **Emerging Infectious Diseases**, v.12, p.1933–1938, 2006. DOI: 10.3201/eid1212.060231.

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.

HEATON, C.J.; GERBIG, G.R.; SENSIUS, L.D.; PATEL, V.; SMITH, T.C. *Staphylococcus aureus* Epidemiology in Wildlife: A Systematic Review. **Antibiotics**, v.9, 2020. DOI: 10.3390/antibiotics9020089.

HEILMANN, C.; ZIEBUHR, W.; BECKER, K. Are coagulase-negative staphylococci virulent? **Clinical Microbiology and Infection**, v.25, p.1071–1080, 2019. DOI: 10.1016/j.cmi.2018.11.012.

HENSEL, N.; ZABEL, S.; HENSEL, P. Prior antibacterial drug exposure in dogs with methicillin-resistant *Staphylococcus pseudintermedius* (MRSP) pyoderma. **Veterinary Dermatology**, v.27, p.72-78e20, 2016. DOI: 10.1111/vde.12292.

HIMSWORTH, C.G.; MILLER, R.R.; MONTOYA, V.; HOANG, L.; ROMNEY, M.G.; AL-RAWAHI, G.N.; KERR, T.; JARDINE, C.M.; PATRICK, D.M.; TANG, P.; WEESE, J.S. Carriage of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* by wild urban Norway rats (*Rattus norvegicus*). **PloS One**, v.9, p.e87983, 2014. DOI: 10.1371/journal.pone.0087983.

HOLMSTRÖM, Thérèse C. N. et al. Methicillin-resistant *Staphylococcus pseudintermedius*: an underestimated risk at pet clinic. **Revista Brasileira de Medicina Veterinaria**, v. 52, n. 1, p. 6–11, 2020.

HONERT, M.S. VAN DEN; GOUWS, P.A.; HOFFMAN, L.C. A Preliminary Study: Antibiotic Resistance of *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus* from the Meat and Feces of Various South African Wildlife Species. **Food Science of Animal Resources**, v.41, p.135–144, 2021. DOI: 10.5851/kosfa.2020.e62.

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.

HUIJBERS, P.M.C.; BLAAK, H.; JONG, M.C.M. DE; GRAAT, E.A.M.; VANDENBROUCKE-GRAULS, C.M.J.E.; RODA HUSMAN, A.M. DE. Role of the Environment in the Transmission of Antimicrobial Resistance to Humans: A Review. **Environmental Science & Technology**, v.49, p.11993–12004, 2015. DOI: 10.1021/acs.est.5b02566.

ISHIHARA, K.; UENO, H.; MURAMATSU, Y.; KADOSAWA, T.; YANAGISAWA, C.; HANAKI, H.; NAKAJIMA, C.; SUZUKI, Y.; TAMURA, Y. Occurrence and Molecular Characteristics of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* and Methicillin-Resistant *Staphylococcus pseudintermedius* in an Academic Veterinary Hospital. **Applied and Environmental Microbiology**, v.76, p.5165–5174, 2010. DOI: 10.1128/AEM.02780-09.

JAHAN, N.A.; LINDSEY, L.L.; LARSEN, P.A. The Role of Peridomestic Rodents as Reservoirs for Zoonotic Foodborne Pathogens. **Vector-Borne and Zoonotic Diseases**, 2020. DOI: 10.1089/vbz.2020.2640.

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>>.

JONES, K.E.; PATEL, N.G.; LEVY, M.A.; STOREYGARD, A.; BALK, D.; GITTLEMAN, J.L.; DASZAK, P. Global trends in emerging infectious diseases. **Nature**, v.451, p.990–993, 2008. DOI: 10.1038/nature06536.

JORDAN, D.; SIMON, J.; FURY, S.; MOSS, S.; GIFFARD, P.; MAIWALD, M.; SOUTHWELL, P.; BARTON, M.D.; AXON, J.E.; MORRIS, S.G.; TROTT, D.J. Carriage of

methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* by veterinarians in Australia. **Australian Veterinary Journal**, v.89, p.152–159, 2011. DOI: 10.1111/j.1751-0813.2011.00710.x.

KADLEC, K.; SCHWARZ, S. Antimicrobial resistance of *Staphylococcus pseudintermedius*. **Veterinary Dermatology**, v.23, p.276-e55, 2012. DOI: 10.1111/j.1365-3164.2012.01056.x.

KAWAKAMI, T.; SHIBATA, S.; MURAYAMA, N.; NAGATA, M.; NISHIFUJI, K.; IWASAKI, T.; FUKATA, T. Antimicrobial Susceptibility and Methicillin Resistance in *Staphylococcus pseudintermedius* and *Staphylococcus schleiferi* subsp. *coagulans* Isolated from Dogs with Pyoderma in Japan. **Journal of Veterinary Medical Science**, v.72, p.1615–1619, 2010. DOI: 10.1292/jvms.10-0172.

LAKHUNDI, S.; ZHANG, K. Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*: Molecular Characterization, Evolution, and Epidemiology. **Clinical Microbiology Reviews**, v.31, p.e00020-18, 2018. DOI: 10.1128/CMR.00020-18.

LARSEN, R.F.; BOYSEN, L.; JESSEN, L.R.; GUARDABASSI, L.; DAMBORG, P. 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, p.291-e100, 2018. DOI: 10.1111/vde.12549.

LEE, G.Y.; LEE, H.-H.; HWANG, S.Y.; HONG, J.; LYOO, K.-S.; YANG, S.-J. Carriage of *Staphylococcus schleiferi* from canine otitis externa: antimicrobial resistance profiles and virulence factors associated with skin infection. **Journal of Veterinary Science**, v.20, p.e6, 2019. DOI: 10.4142/jvs.2019.20.e6.

LEHNER, G.; LINEK, M.; BOND, R.; LLOYD, D.H.; PRENGER-BERNINGHOFF, E.; THOM, N.; STRAUBE, I.; VERHEYEN, K.; LOEFFLER, A. Case–control risk factor study of methicillin-resistant *Staphylococcus pseudintermedius* (MRSP) infection in dogs and cats in Germany. **Veterinary Microbiology**, v.168, p.154–160, 2014. DOI: 10.1016/j.vetmic.2013.10.023.

LILENBAUM, W.; VERAS, M.; BLUM, E.; SOUZA, G.N. Antimicrobial susceptibility of staphylococci isolated from otitis externa in dogs. **Letters in Applied Microbiology**, v.31, p.42–45, 2000. DOI: 10.1046/j.1472-765x.2000.00759.x.

LOPES, G.V.; GUERRA, P.R.; MACHADO, V.; DIAS, V.C.; CARDOSO, M. Methicillin-resistant *Staphylococcus pseudintermedius* clonal groups isolated from canine pyoderma in Brazil. **Acta Scientiae Veterinariae**, v.43, p.1338, 2015.

LOZANO, C.; REZUSTA, A.; FERRER, I.; PÉREZ-LAGUNA, V.; ZARAZAGA, M.; RUIZ-RIPA, L.; REVILLO, M.J.; TORRES, C. *Staphylococcus pseudintermedius* Human Infection Cases in Spain: Dog-to-Human Transmission. **Vector-Borne and Zoonotic Diseases**, v.17, p.268–270, 2017. DOI: 10.1089/vbz.2016.2048.

LYNCH, S.A.; HELBIG, K.J. The Complex Diseases of *Staphylococcus pseudintermedius* in Canines: Where to Next? **Veterinary Sciences**, v.8, p.11, 2021. DOI: 10.3390/vetsci8010011.

MA, G.C.; WORTHING, K.A.; GOTTLIEB, T.; WARD, M.P.; NORRIS, J.M. Molecular characterization of community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* from pet dogs. *Zoonoses and Public Health*, v.67, p.222–230, 2020a. DOI: 10.1111/zph.12677.

MA, G.C.; WORTHING, K.A.; WARD, M.P.; NORRIS, J.M. Commensal Staphylococci Including Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* from Dogs and Cats in Remote New South Wales, Australia. **Microbial Ecology**, v.79, p.164–174, 2020. DOI: 10.1007/s00248-019-01382-y.

MCCARTHY, A.J.; HARRISON, E.M.; STANCZAK-MROZEK, K.; LEGGETT, B.; WALLER, A.; HOLMES, M.A.; LLOYD, D.H.; LINDSAY, J.A.; LOEFFLER, A. Genomic insights into the rapid emergence and evolution of MDR in *Staphylococcus pseudintermedius*. **The Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v.70, p.997–1007, 2015. DOI: 10.1093/jac/dku496.

MADDOX, T.W.; PINCHBECK, G.L.; CLEGG, P.D.; WEDLEY, A.L.; DAWSON, S.; WILLIAMS, N.J. Cross-sectional study of antimicrobial-resistant bacteria in horses. Part 2: Risk factors for faecal carriage of antimicrobial-resistant *Escherichia coli* in horses. **Equine Veterinary Journal**, v.44, p.297–303, 2012. DOI: 10.1111/j.2042-3306.2011.00440.x.

MAMA, O.M.; RUIZ-RIPA, L.; LOZANO, C.; GONZÁLEZ-BARRIO, D.; RUIZ-FONS, J.F.; TORRES, C. High diversity of coagulase negative staphylococci species in wild boars, with low antimicrobial resistance rates but detection of relevant resistance genes. **Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases**, v.64, p.125–129, 2019. DOI: 10.1016/j.cimid.2019.03.006.

MEGID J.; RIBEIRO M. G.; PAES A. C. **Doenças infecciosas em animais de produção e de companhia**. Rio de Janeiro: Roca, 2016.

MERONI, G.; SOARES FILIPE, J.F.; DRAGO, L.; MARTINO, P.A. Investigation on Antibiotic-Resistance, Biofilm Formation and Virulence Factors in Multi Drug Resistant and Non Multi Drug Resistant *Staphylococcus pseudintermedius*. **Microorganisms**, v.7, p.E702, 2019. DOI: 10.3390/microorganisms7120702.

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, K.; AUSTIN, J.J.; BELOV, K. Low major histocompatibility complex diversity in the Tasmanian devil predates European settlement and may explain susceptibility to disease epidemics. **Biology Letters**, v.9, p.20120900, 2013. DOI: 10.1098/rsbl.2012.0900.

MORRIS, D.O.; LOEFFLER, A.; DAVIS, M.F.; GUARDABASSI, L.; WEESE, J.S. Recommendations for approaches to methicillin-resistant staphylococcal infections of small animals: diagnosis, therapeutic considerations and preventative measures. **Veterinary Dermatology**, v.28, p.304-e69, 2017. DOI: 10.1111/vde.12444.

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.

NIENHOFF, U.; KADLEC, K.; CHABERNY, I.F.; VERSPOHL, J.; GERLACH, G.-F.; KREIENBROCK, L.; SCHWARZ, S.; SIMON, D.; NOLTE, I. Methicillin-resistant *Staphylococcus pseudintermedius* among dogs admitted to a small animal hospital. **Veterinary Microbiology**, v.150, p.191–197, 2011a. DOI: 10.1016/j.vetmic.2010.12.018.

NIENHOFF, U.; KADLEC, K.; CHABERNY, I.F.; VERSPOHL, J.; GERLACH, G.-F.; SCHWARZ, S.; KREIENBROCK, L.; NOLTE, I.; SIMON, D. Methicillin-resistant *Staphylococcus pseudintermedius* among cats admitted to a veterinary teaching hospital. **Veterinary Microbiology**, v.153, p.414–416, 2011b. DOI: 10.1016/j.vetmic.2011.05.045.

NISA, S.; BERCKER, C.; MIDWINTER, A.C.; BRUCE, I.; GRAHAM, C.F.; VENTER, P.; BELL, A.; FRENCH, N.P.; BENSCHOP, J.; BAILEY, K.M.; WILKINSON, D.A. Combining MALDI-TOF and genomics in the study of methicillin resistant and multidrug resistant *Staphylococcus pseudintermedius* in New Zealand. **Scientific Reports**, v.9, p.1271, 2019. DOI: 10.1038/s41598-018-37503-9.

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.

OTTO, M. Coagulase-negative staphylococci as reservoirs of genes facilitating MRSA infection: Staphylococcal commensal species such as *Staphylococcus epidermidis* are being recognized as important sources of genes promoting MRSA colonization and virulence. **BioEssays: News and Reviews in Molecular, Cellular and Developmental Biology**, v.35, p.4–11, 2013. DOI: 10.1002/bies.201200112.

PAUL, N.C.; MOODLEY, A.; GHIBAUDO, G.; GUARDABASSI, L. Carriage of Methicillin-Resistant *Staphylococcus pseudintermedius* in Small Animal Veterinarians: Indirect Evidence of Zoonotic Transmission. **Zoonoses and Public Health**, v.58, p.533–539, 2011. DOI: 10.1111/j.1863-2378.2011.01398.x.

PENNA, B.; VARGES, R.; MEDEIROS, L.; MARTINS, G.M.; MARTINS, R.R.; LILENBAUM, W. In vitro antimicrobial susceptibility of staphylococci isolated from canine pyoderma in Rio de Janeiro, Brazil. **Brazilian Journal of Microbiology**, v.40, p.490–494, 2009. DOI: 10.1590/S1517-83822009000300011.

PENNA, B.; VARGES, R.; MEDEIROS, L.; MARTINS, G.M.; MARTINS, R.R.; LILENBAUM, W. Species distribution and antimicrobial susceptibility of staphylococci isolated from canine otitis externa: *Staphylococcus* in canine otitis externa. **Veterinary Dermatology**, v.21, p.292–296, 2010. DOI: 10.1111/j.1365-3164.2009.00842.x.

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.

PERRETTEN, V.; KADLEC, K.; SCHWARZ, S.; GRÖNLUND ANDERSSON, U.; FINN, M.; GREKO, C.; MOODLEY, A.; KANIA, S.A.; FRANK, L.A.; BEMIS, D.A.; FRANCO, A.; IURESCIA, M.; BATTISTI, A.; DUIM, B.; WAGENAAR, J.A.; DUIJKEREN, E. VAN; WEESE, J.S.; FITZGERALD, J.R.; ROSSANO, A.; GUARDABASSI, L. Clonal spread of methicillin-resistant *Staphylococcus pseudintermedius* in Europe and North America: an international multicentre study. **The Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v.65, p.1145–1154, 2010. DOI: 10.1093/jac/dkq078.

PERRETTEN, V.; KANIA, S.A.; BEMIS, D. *Staphylococcus ursi* sp. nov., a new member of the ‘*Staphylococcus intermedius* group’ isolated from healthy black bears. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v.70, p.4637–4645, 2020. DOI: 10.1099/ijsem.0.004324.

PERSSON WALLER, K.; ASPÁN, A.; NYMAN, A.; PERSSON, Y.; GRÖNLUND ANDERSSON, U. CNS species and antimicrobial resistance in clinical and subclinical bovine mastitis. **Veterinary Microbiology**, v.152, p.112–116, 2011. DOI: 10.1016/j.vetmic.2011.04.006.

PIRES DOS SANTOS, T.; DAMBORG, P.; MOODLEY, A.; GUARDABASSI, L. 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.1599, 2016. DOI: 10.3389/fmicb.2016.01599.

POMBA, C.; RANTALA, M.; GREKO, C.; BAPTISTE, K.E.; CATRY, B.; DUIJKEREN, E. VAN; MATEUS, A.; MORENO, M.A.; PYÖRÄLÄ, S.; RUŽAUSKAS, M.; SANDERS, P.; TEALE, C.; THRELFALL, E.J.; KUNSAGI, Z.; TORREN-EDO, J.; JUKES, H.; TÖRNEKE, K. Public health risk of antimicrobial resistance transfer from companion animals. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v.72, p.957–968, 2017. DOI: 10.1093/jac/dkw481.

QEKWANA, D.N.; OGUTTU, J.W.; SITHOLE, F.; ODOI, A. Patterns and predictors of antimicrobial resistance among *Staphylococcus* spp. from canine clinical cases presented at a veterinary academic hospital in South Africa. **BMC Veterinary Research**, v.13, p.116, 2017. DOI: 10.1186/s12917-017-1034-3.

QUITOCO, I.M.Z.; RAMUNDO, M.S.; SILVA-CARVALHO, M.C.; SOUZA, R.R.; BELTRAME, C.O.; OLIVEIRA, T.F. DE; ARAÚJO, R.; DEL PELOSO, P.F.; COELHO, L.R.; FIGUEIREDO, A.M.S. 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, p.336, 2013. DOI: 10.1186/1756-0500-6-336.

ROSSI, C.C.; PEREIRA, M.F.; GIAMBIAGI-DEMARVAL, M. Underrated *Staphylococcus* species and their role in antimicrobial resistance spreading. **Genetics and Molecular Biology**, v.43, p.e20190065, 2020. DOI: 10.1590/1678-4685-GMB-2019-0065.

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.

RUIZ-RIPA, L.; GÓMEZ, P.; ALONSO, C.A.; CAMACHO, M.C.; RAMIRO, Y.; PUENTE, J. DE LA; FERNÁNDEZ-FERNÁNDEZ, R.; QUEVEDO, M.Á.; BLANCO, J.M.; BÁGUENA, G.; ZARAZAGA, M.; HÖFLE, U.; TORRES, C. Frequency and Characterization of Antimicrobial Resistance and Virulence Genes of Coagulase-Negative Staphylococci from Wild Birds in Spain. Detection of *tst*-Carrying *S. sciuri* Isolates. **Microorganisms**, v.8, p.1317, 2020. DOI: 10.3390/microorganisms8091317.

SANTANA, J.A.; COLOMBO, S.A.; SILVA, B.A.; DINIZ, A.N.; ALMEIDA, L.R. DE; OLIVEIRA JUNIOR, C.A.; LOBATO, F.C.F.; SOUZA TRINDADE, G. DE; PAGLIA, A.P.; SILVA, R.O.S. *Clostridioides difficile* and multi-drug-resistant staphylococci in free-living rodents and marsupials in parks of Belo Horizonte, Brazil. **Brazilian Journal of Microbiology: [publication of the Brazilian Society for Microbiology]**, 2021. DOI: 10.1007/s42770-021-00640-x.

SANTANA, J.A.; SILVA, B.A.; TREVIZANI, N.A.B.; SOUZA, A.M.A. E; LIMA, G.M.N. DE; FURTADO, N.R.M.; LOBATO, F.C.F.; SILVA, R.O.S. Isolation and antimicrobial resistance of coagulase-negative staphylococci recovered from healthy tortoises in Minas Gerais, Brazil. **Ciência Rural**, v.52, p.e20210354, 2022. DOI: 10.1590/0103-8478cr20210354.

SASAKI, T.; KIKUCHI, K.; TANAKA, Y.; TAKAHASHI, N.; KAMATA, S.; HIRAMATSU, K. Methicillin-Resistant *Staphylococcus pseudintermedius* in a Veterinary Teaching Hospital. **Journal of Clinical Microbiology**, v.45, p.1118–1125, 2007a. DOI: 10.1128/JCM.02193-06.

SASAKI, T.; KIKUCHI, K.; TANAKA, Y.; TAKAHASHI, N.; KAMATA, S.; HIRAMATSU, K. Reclassification of Phenotypically Identified *Staphylococcus intermedius* Strains. **Journal of Clinical Microbiology**, v.45, p.2770–2778, 2007b. DOI: 10.1128/JCM.00360-07.

SCHERER, C.B.; BOTONI, L.S.; COURA, F.M.; SILVA, R.O.; SANTOS, R.D. DOS; HEINEMANN, M.B.; COSTA-VAL, A.P.; SCHERER, C.B.; BOTONI, L.S.; COURA, F.M.; SILVA, R.O.; SANTOS, R.D. DOS; HEINEMANN, M.B.; COSTA-VAL, A.P. Frequency and antimicrobial susceptibility of *Staphylococcus pseudintermedius* in dogs with otitis externa. **Ciência Rural**, v.48, 2018. DOI: 10.1590/0103-8478cr20170738.

SCHISLER, J.R.; HILLIER, A.; DANIELS, J.B.; COLE, L.K.; GEBREYES, W.A. Evaluation of Clinical Laboratory Standards Institute Interpretive Criteria for Methicillin-Resistant *Staphylococcus Pseudintermedius* Isolated from Dogs. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v.21, p.684–688, 2009. DOI: 10.1177/104063870902100514.

SHOEN, H.R.C.; ROSE, S.J.; RAMSEY, S.A.; MORAIS, H. DE; BERMUDEZ, L.E. Analysis of *Staphylococcus* infections in a veterinary teaching hospital from 2012 to 2015. **Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases**, v.66, p.101332, 2019. DOI: 10.1016/j.cimid.2019.101332.

SILVA, A.P. DA; SCHMIDT, C.; VARGAS, A.C. DE; MABONI, G.; RAMPELOTTO, C.; SCHWAB, M.L.; ESCOBAR, T.P.; AMARAL, A.S. DO. Suscetibilidade antimicrobiana de

Staphylococcus spp. isolados de cães com pioderma superficial. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v.34, p.355–361, 2014. DOI: 10.1590/S0100-736X2014000400010.

SILVA, V.; CAPELO, J.L.; IGREJAS, G.; POETA, P. Molecular Epidemiology of *Staphylococcus aureus* Lineages in Wild Animals in Europe: A Review. **Antibiotics**, v.9, p.122, 2020. DOI: 10.3390/antibiotics9030122.

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.; BLACK, C.C.; DUIM, B.; PERRETEN, V.; DUIJKEREN, E. VAN; WAGENAAR, J.A.; EBERLEIN, L.C.; SADEGHI, L.N.; VIDELA, R.; BEMIS, D.A.; KANIA, S.A. Multilocus sequence typing for characterization of *Staphylococcus pseudintermedius*. **Journal of Clinical Microbiology**, v.51, p.306–310, 2013. DOI: 10.1128/JCM.02421-12.

SOMAYAJI, R.; PRIYANTHA, M. A. R.; RUBIN, J.E.; CHURCH, D. Human infections due to *Staphylococcus pseudintermedius*, an emerging zoonosis of canine origin: report of 24 cases. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v.85, p.471–476, 2016. DOI: 10.1016/j.diagmicrobio.2016.05.008.

SPINELLI, T.P.; OLIVEIRA-FILHO, E.F.; SILVA, D.; MOTA, R.; SÁ, F.B. SHORT COMMUNICATION: Normal aerobic bacterial conjunctival flora in the Crab-eating raccoon (*Procyon cancrivorus*) and Coati (*Nasua nasua*) housed in captivity in pernambuco and paraiba (Northeast, Brazil): Normal aerobic bacterial conjunctival flora in the Crab-eating raccoon and Coati. **Veterinary Ophthalmology**, v.13, p.134–136, 2010. DOI: 10.1111/j.1463-5224.2009.00728.x.

STEGMANN, R.; BURNENS, A.; MARANTA, C.A.; PERRETEN, V. Human infection associated with methicillin-resistant *Staphylococcus pseudintermedius* ST71. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v.65, p.2047–2048, 2010. DOI: 10.1093/jac/dkq241.

SUEPAUL, Sharienne 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>>.

STULL, J.W.; BJORVIK, E.; BUB, J.; DVORAK, G.; PETERSEN, C.; TROYER, H.L. 2018 AAHA Infection Control, Prevention, and Biosecurity Guidelines. **Journal of the American Animal Hospital Association**, v.54, p.297–326, 2018. DOI: 10.5326/JAAHA-MS-6903.

STULL, J.W.; WEESE, J.S. Hospital-Associated Infections in Small Animal Practice. **Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice**, v.45, p.217–233, 2015. DOI: 10.1016/j.cvsm.2014.11.009.

SUTHAR, N.; ROY, S.; CALL, D.R.; BESSER, T.E.; DAVIS, M.A. An Individual-Based Model of Transmission of Resistant Bacteria in a Veterinary Teaching Hospital. **PLOS ONE**, v.9, p.e98589, 2014. DOI: 10.1371/journal.pone.0098589.

SWIFT, B.M.C.; BENNETT, M.; WALLER, K.; DODD, C.; MURRAY, A.; GOMES, R.L.; HUMPHREYS, B.; HOBMAN, J.L.; JONES, M.A.; WHITLOCK, S.E.; MITCHELL, L.J.; LENNON, R.J.; ARNOLD, K.E. Anthropogenic environmental drivers of antimicrobial resistance in wildlife. **Science of The Total Environment**, v.649, p.12–20, 2019. DOI: 10.1016/j.scitotenv.2018.08.180.

TAKAHASHI, T.; SATOH, I.; KIKUCHI, N. Phylogenetic relationships of 38 taxa of the genus *Staphylococcus* based on *16S rRNA* gene sequence analysis. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v.49 Pt 2, p.725–728, 1999. DOI: 10.1099/00207713-49-2-725.

TORRES-MEJÍA, A.M.; BLANCO-PEÑA, K.; RODRÍGUEZ, C.; DUARTE, F.; JIMÉNEZ-SOTO, M.; ESPERÓN, F. Zoonotic Agents in Feral Pigeons (*Columba livia*) from Costa Rica: Possible Improvements to Diminish Contagion Risks. **Vector-Borne and Zoonotic Diseases**, v.18, p.49–54, 2018. DOI: 10.1089/vbz.2017.2131.

VAN DEN EEDE, A.; HERMANS, K.; VAN DEN ABEELE, A.; FLORÉ, K.; DEWULF, J.; VANDERHAEGHEN, W.; CROMBÉ, F.; BUTAYE, P.; GASTHUYFS, F.; HAESBROUCK, F.; MARTENS, A. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) on the skin of long-term hospitalised horses. **The Veterinary Journal**, v.193, p.408–411, 2012. DOI: 10.1016/j.tvjl.2011.12.004.

VAN DUIJKEREN, E. VAN; CATRY, B.; GREKO, C.; MORENO, M.A.; POMBA, M.C.; PYÖRÄLÄ, S.; RUŽAUSKAS, M.; SANDERS, P.; THRELFALL, E.J.; TORREN-EDO, J.; TÖRNEKE, K. Review on methicillin-resistant *Staphylococcus pseudintermedius*. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v.66, p.2705–2714, 2011. DOI: 10.1093/jac/dkr367.

VAN DUIJKEREN, E. VAN; MOLEMAN, M.; SLOET VAN OLDRUITENBORGH-OOSTERBAAN, M.M.; MULTEM, J.; TROELSTRA, A.; FLUIT, A.C.; WAMEL, W.J.B. VAN; HOUWERS, D.J.; NEELING, A.J. DE; WAGENAAR, J.A. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in horses and horse personnel: An investigation of several outbreaks. **Veterinary Microbiology**, v.141, p.96–102, 2010. DOI: 10.1016/j.vetmic.2009.08.009.

VITTECOQ, M.; GODREUIL, S.; PRUGNOLLE, F.; DURAND, P.; BRAZIER, L.; RENAUD, N.; ARNAL, A.; ABERKANE, S.; JEAN-PIERRE, H.; GAUTHIER-CLERC, M.; THOMAS, F.; RENAUD, F. Antimicrobial resistance in wildlife. **Journal of Applied Ecology**, v.53, p.519–529, 2016. DOI: 10.1111/1365-2664.12596.

WALTHER, B.; LÜBKE-BECKER, A.; STAMM, I.; GEHLEN, H.; BARTON, A.K.; JANSSEN, T.; WIELER, L.H.; GUENTHER, S. Suspected nosocomial infections with multi-drug resistant *E. coli*, including extended-spectrum beta-lactamase (ESBL)-producing strains,

in an equine clinic. **Berliner Und Munchener Tierarztliche Wochenschrift**, v.127, p.421–427, 2014.

WALTHER, B.; TEDIN, K.; LÜBKE-BECKER, A. Multidrug-resistant opportunistic pathogens challenging veterinary infection control. **Veterinary Microbiology**, v.200, p.71–78, 2017. DOI: 10.1016/j.vetmic.2016.05.017.

WEESE, J.S.; DICK, H.; WILLEY, B.M.; MCGEER, A.; KREISWIRTH, B.N.; INNIS, B.; LOW, D.E. Suspected transmission of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* between domestic pets and humans in veterinary clinics and in the household. **Veterinary Microbiology**, v.115, p.148–155, 2006. DOI: 10.1016/j.vetmic.2006.01.004.

WEESE, J.S.; DUIJKEREN, E. VAN. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus pseudintermedius* in veterinary medicine. **Veterinary Microbiology**, v.140, p.418–429, 2010. DOI: 10.1016/j.vetmic.2009.01.039.

WEESE, J.S.; FAIRES, M.C.; FRANK, L.A.; REYNOLDS, L.M.; BATTISTI, A. Factors associated with methicillin-resistant versus methicillin-susceptible *Staphylococcus pseudintermedius* infection in dogs. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v.240, p.1450–1455, 2012. DOI: 10.2460/javma.240.12.1450.

WEESE, J.S.; BLONDEAU, J.; BOOTHE, D.; GUARDABASSI, L.G.; GUMLEY, N.; PAPICH, M.; JESSEN, L.R.; LAPPIN, M.; RANKIN, S.; WESTROPP, J.L.; SYKES, J. 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** (London, England: 1997), v.247, p.8–25, 2019. DOI: 10.1016/j.tvjl.2019.02.008.

WEGENER, A.; DAMBORG, P.; GUARDABASSI, L.; MOODLEY, A.; MUGHINI-GRAS, L.; DUIM, B.; WAGENAAR, J.A.; BROENS, E.M. Specific staphylococcal cassette chromosome *mec* (SCC*mec*) types and clonal complexes are associated with low-level amoxicillin/clavulanic acid and cefalotin resistance in methicillin-resistant *Staphylococcus pseudintermedius*. **The Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v.75, p.508–511, 2020. DOI: 10.1093/jac/dkz509.

WHO. 2014 Antimicrobial resistance: global report on surveillance 2014. Geneva, Switzerland: World Health Organisation

WIETHOELTER, A.K.; BELTRÁN-ALCRUDO, D.; KOCK, R.; MOR, S.M. Global trends in infectious diseases at the wildlife–livestock interface. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v.112, p.9662–9667, 2015. DOI: 10.1073/pnas.1422741112.

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.

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.

ZIGO, F. Changes in Bacterial Microflora in Young Carrier Pigeons during the Race Season.
International International Journal of Avian & Wildlife Biology, v.2, 2017. DOI:
10.15406/ijawb.2017.02.00013.

5. CAPÍTULO 1: Diversidade e resistência a antimicrobianos em *Staphylococcus* spp. isolados de cães

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

RESUMO

Staphylococcus pseudintermedius é uma importante bactéria comensal da pele e mucosas de cães e um agente oportunista responsável por várias infecções clínicas, tais como piodermite, otite, infecções do trato urinário e infecções de feridas cirúrgicas. O surgimento do *S. pseudintermedius* resistente à meticilina (MRSP) tornou-se um problema de grande preocupação na medicina veterinária e humana, pois é multirresistente (MDR) e pode, também, infectar humanos. Este estudo teve como objetivo identificar a ocorrência de *Staphylococcus* spp. em cães infectados e investigar os perfis de resistência antimicrobiana e a estrutura molecular dos isolados de MRSP. Para isso, foram obtidas amostras de cães com diferentes quadros infecciosos e oriundos de duas clínicas veterinárias diferentes. Colônias sugestivas foram submetidas à identificação pela técnica de espectrometria de massa por desorção/ionização a laser assistida por matriz (MALDI-TOF) e confirmadas ao nível de espécie pela reação em cadeia da polimerase (PCR). Sequenciamento dos genes *16S rRNA* e *rpoB* foram usados em amostras selecionadas que não foram identificadas por MALDI-ToF e pela PCR específica da espécie. A susceptibilidade antimicrobiana e a detecção do gene *mecA* por PCR também foram realizadas. Os isolados de MRSP foram submetidos à tipagem de sequência multilocus (MLST). De todos os estafilococos isolados de casos clínicos (n=131), 98 (74,8%) foram identificados como *S. pseudintermedius*. Multirresistência (resistência a ≥ 3 classes de antimicrobianos) foi observada em 63,2% dos isolados de *S. pseudintermedius*, e 24,5% dos isolados de *S. pseudintermedius* eram MRSP. Metade das estirpes de MRSP foram isoladas de infecções de ferida cirúrgica. Dentre os dez tipos de sequência (ST) identificados, nove foram descritos pela primeira vez. O ST71 foi o mais prevalente e associado à resistência às fluoroquinolonas. Terapia antimicrobiana prévia, hospitalização e infecções de ferida cirúrgica foram apontados como fatores de risco para aquisição de MRSP. O presente estudo mostrou uma alta taxa de estafilococos MDR em cães infectados. Este é o primeiro estudo a

investigar extensivamente a estrutura populacional de MRSP no Brasil, o que revelou a dispersão do CC71 e nove novos ST. Estes achados levantam preocupações tanto para a saúde animal quanto humana devido ao potencial zoonótico desta espécie e às limitadas opções terapêuticas disponíveis para as infecções por MRSP.

Palavras-chave: *S. pseudintermedius*, CC71, multirresistência, MRSP, ferida cirúrgica.

5.1.1 INTRODUÇÃO

Staphylococcus pseudintermedius é um importante agente comensal da pele e mucosas de cães e integra o grupo *S. intermedius* (SIG) juntamente com quatro outras espécies: *S. intermedius*, *S. delphini*, *S. cornubiensis* e *S. ursi* (Bannoehr e Guardabassi, 2012; Murray et al., 2018; Perreten et al., 2020). Embora seja comumente encontrado no nariz e no reto de indivíduos saudáveis, esta bactéria pode ser responsável por várias infecções clínicas, sendo uma das principais causas de piodermite, otite, infecções de feridas e, com menor frequência, infecções do trato urinário (Weese e van Duijkeren, 2010; Bannoehr e Guardabassi, 2012; Duim et al., 2016; Bergot et al., 2018).

Na última década, o surgimento de *S. pseudintermedius* resistente à metilina (MRSP) tornou-se um problema de grande preocupação na medicina veterinária (Duim et al., 2016; Wegener et al., 2018; Gagetti et al., 2019) devido à aquisição do cassete cromossômico estafilocócico *mec* (*SCCmec*), um elemento genético móvel que abriga o gene *mecA* e confere resistência a todos os antimicrobianos beta-lactâmicos, exceto às cefalosporinas, ceftarolina e ceftobiprole de quinta geração (Krapf et al., 2019). As estirpes de MRSP também são comumente resistentes a outras classes de antimicrobianos, tais como aminoglicosídeos, macrolídeos e fluoroquinolonas, representando um desafio às abordagens terapêuticas (Duijkeren, Van et al., 2011b; Kadlec e Schwarz, 2012; Duim et al., 2016; Morris et al., 2017). Além disso, *SCCmec* e/ou outros genes de resistência antimicrobiana podem ser transferidos entre diferentes estafilococos, o que pode levar a sérios problemas de saúde pública, especialmente quando envolvem MRSP e *S. aureus* resistente à metilina (MRSA) (Duijkeren, Van et al., 2011b; Pomba et al., 2017; Kang e Hwang, 2021). Similar ao MRSP em cães, MRSA é um patógeno importante associado tanto a infecções hospitalares, como comunitárias em seres humanos, e é responsável por casos graves de infecções de tecidos moles (Morris et al., 2017; Pomba et al., 2017).

Relatos de casos humanos de carreamento ou infecção por *S. pseudintermedius* têm sido pouco descritos durante os últimos anos (Duijkeren et al., 2011; Guardabassi et al., 2013). *S. pseudintermedius* pode causar uma série de infecções de pele e tecidos moles em seres humanos, e estudos têm demonstrado alta semelhança entre as linhagens isoladas de pacientes humanos e seus cães (Somayaji et al., 2016; Lozano et al., 2017; Ference et al., 2019; Gagetti

et al., 2019; Blondeau et al., 2020). Além disso, parece que o contato a longo prazo com cães pode ser um fator de risco para adquirir a bactéria, sendo os veterinários e tutores de animais de estimação os mais afetados (Stegmann et al., 2010; Duijkeren et al., 2011; Paul et al., 2011; Guardabassi et al., 2013). Neste contexto, o MRSP é um problema de saúde relevante devido a seu risco zoonótico potencial e às opções limitadas de tratamento atualmente disponíveis.

Apesar de sua crescente importância, existem poucos estudos sobre MRSP no Brasil. Até o momento, quase não há informações sobre sua estrutura populacional e padrões de resistência (Penna et al., 2010a; Botoni et al., 2016; Bourguignon et al., 2016; Scherer et al., 2018). Além disso, poucos estudos investigaram a possível relação entre as diferentes manifestações clínicas causadas por *S. pseudintermedius* em cães, os padrões de resistência antimicrobiana (RAM) e o “background” genético. Assim, este estudo visou identificar a ocorrência de estafilococos, com foco principal em *S. pseudintermedius*, em cães clinicamente doentes, assim como investigar sua epidemiologia em Belo Horizonte, Minas Gerais, relatando os perfis de resistência antimicrobiana e analisando a estrutura molecular dos isolados de MRSP.

5.1.2 MATERIAL E MÉTODOS

5.1.2.1 Delineamento experimental

A figura 3 apresenta o delineamento experimental deste estudo.

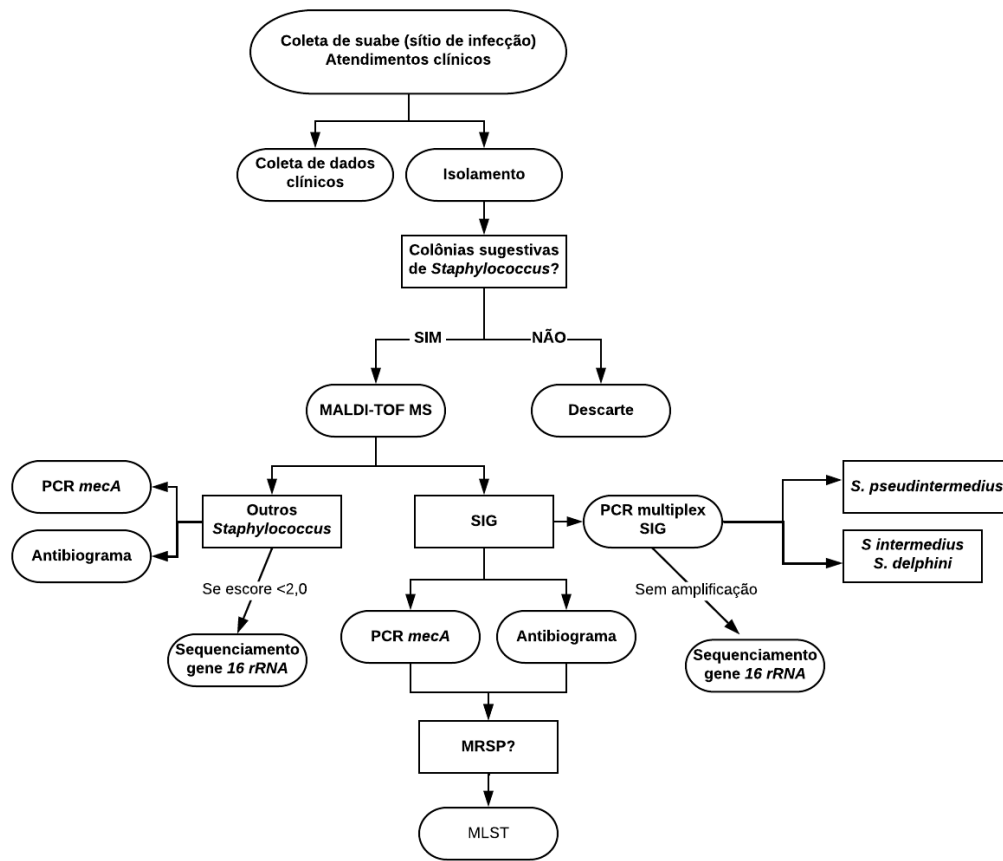


Figura 3 - Fluxograma de etapas de processamento realizadas durante o estudo com animais infectados. As caixas elípticas representam os procedimentos e as caixas retangulares representam os isolados.

5.1.2.2 Coleta, isolamento e identificação das amostras

Os espécimes clínicos (suabes) foram obtidos de cães durante a consulta no Hospital Veterinário da Universidade Federal de Minas Gerais (HV-UFGM) e em uma clínica veterinária (VetMaster, Belo Horizonte, Minas Gerais) de 2017 a 2020. Após o consentimento informado dos tutores, foram incluídas no presente estudo amostras de cães com suspeita de infecção por estafilococos em qualquer sítio corporal. Dados de informação do paciente, incluindo motivos para consulta, idade, sexo, doença, tipo de amostra, uso de terapia antimicrobiana no momento da amostragem e resultado, foram coletados. Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Uso Animal (CEUA) da Universidade Federal de Minas Gerais sob o protocolo 287/2019.

As amostras coletadas foram inseridas em microtubos estéreis, acondicionadas em caixas de transporte com gelo e enviadas ao Laboratório de Bacterioses e Pesquisa da Escola de Veterinária da UFGM para processamento imediato. No laboratório, os suabes foram plaqueados em ágar manitol salgado (Kasvi, Brasil) e incubados por 24 h a 37 °C, em aerobiose.

Colônias sugestivas foram plaqueadas em ágar Müller Hinton (Difco, EUA) e identificadas por MALDI-TOF MS, como descrito anteriormente (Assis et al., 2017). Em resumo, para cada estirpe, 1 µl de ácido fórmico (70%) e 1 µl de matriz de MALDI-TOF MS, consistindo em uma solução saturada de ácido α -ciano-4-hidroxicinâmico (Bruker Daltonics, Bremen, Alemanha), foram aplicados no local e submetidos à secagem ao ar. Os espectros foram adquiridos utilizando o espectrômetro de massa Flex Control MicroFlex LT (Bruker Daltonics) com um laser de nitrogênio de 60-Hz com até 240 disparos de laser. Os parâmetros para detecção da faixa de massa foram definidos para permitir a identificação de 1.960 a 20.137 m/z, onde a voltagem da fonte de íons 1 era 19,99 kv, a voltagem da fonte de íons 2 era 18,24 kv e a voltagem da lente era 6,0 kv para aquisição de dados. Antes das medições, a calibração foi precedida por um padrão de teste bacteriano (*Escherichia coli* DH5 alfa; Bruker Daltonics). Os critérios de escore de identificação em Tempo Real (RT) utilizados foram os recomendados pelo fabricante: escore ≥ 2.000 indica uma identificação em nível de espécie. Os isolados identificados como SIG por MALDI-TOF foram confirmados por PCR do gene *nuc* (Sasaki et al., 2010). Os isolados SIG que não foram amplificados por PCR e os isolados não-SIG com escore MALDI-TOF abaixo de 2.000 foram submetidos ao sequenciamento do gene *16S rRNA* e sequenciamento do gene *rpoB*, quando necessário. Amplificação e sequenciamento dos genes *16S rRNA* e *rpoB* foram realizados como descrito anteriormente (Mellmann et al., 2006; Fox et al., 2011).

5.1.2.3 Teste de suscetibilidade antimicrobiana

A susceptibilidade antimicrobiana de todos os isolados de *Staphylococcus* spp. foi testada pelo método de disco-difusão em ágar e interpretada de acordo com os documentos do Instituto de padrões clínico e laboratoriais (CLSI), M100-Ed31 (CLSI, 2021) e VET01S-Ed5 (CLSI, 2020). Os seguintes antimicrobianos foram testados: oxacilina (OXA, 1 µg), cefoxitina (FOX, 30 µg), penicilina (PEN, 10 IU), gentamicina (GEN, 10 µg), eritromicina (ERI, 15 µg), clindamicina (CLI, 2 µg), tetraciclina (TET, 30 µg), ciprofloxacina (CIP, 5 µg), nitrofurantoína (NIT, 300 µg), trimetoprim-sulfametoxazol (SXT, 1,25/23,75 µg), cloranfenicol (CHL, 30 µg), e rifampicina (RIF, 5 µg) (Oxoid, EUA). *S. aureus* ATCC® 25923 foi usado como controle. Estirpes foram consideradas MDR quando resistentes a três ou mais classes de antimicrobianos (Sweeney et al., 2018).

5.1.2.4 Extração de DNA e detecção do gene *mecA*

A extração de DNA genômico bacteriano foi realizada com tiocianato de guanidina (Pitcher et al., 1989). O DNA extraído foi quantificado usando um espectrofotômetro Nanodrop (Thermo Scientific, Wilmington, DE, EUA). A pureza do DNA extraído foi determinada usando a razão de absorbância a 260/280 nm. Todos os isolados de estafilococos foram testados por PCR para determinar se carregavam o gene *mecA* (Murakami et al., 1991).

5.1.2.5 Tipagem de sequência Multilocus (MLST)

O MLST foi realizado para todos os isolados MRSP, de acordo com a literatura (Solyman et al., 2013; Grönthal et al., 2017). Os STs foram determinados usando o banco de dados de MLST de *S. pseudintermedius* (<https://pubmlst.org/organisms/staphylococcus-pseudintermedius>), e novos STs foram designados pelo curador Vincent Perreten (vincent.perreten@vbi.unibe.ch). O programa PhyloViz v2.0, usando o algoritmo goeBURST (Francisco et al., 2009; Nascimento et al., 2017), foi usado para inferir a estrutura da população, com complexos clonais (CCs) compostos de todas as linhagens que compartilham pelo menos seis alelos idênticos (variante de um único locus). A análise de sequência multilocus (MLSA) foi realizada com base em sequências concatenadas dos sete alelos do esquema MLST. Uma árvore filogenética foi construída usando o modelo de probabilidade máxima aproximada (ML) e modelos Hasegawa-Kishino-Yano de evolução de nucleotídeos foram construídos usando o IQ-TREE (Minh et al., 2020), com uma análise bootstrap com 1000 réplicas, e visualizados e anotados usando o iTol v.4 (Letunic e Bork, 2019).

5.1.2.6 Análise estatística

Os dados foram sumarizados usando tabelas de frequência e percentuais para variáveis categóricas e medianas para variáveis contínuas. Para medir a associação entre as variáveis categóricas e as amostras isoladas, foi realizada uma análise univariada usando o teste exato de Fisher. As associações foram expressas como odds ratios (ORs) e seus intervalos de confiança (IC) de 95%. A significância estatística foi definida em $p \leq 0,05$. Para variáveis quantitativas,

foi usado o teste Mann-Whitney, com um valor de $p \leq 0,05$, e o teste de comparação de Tukey foi aplicado se significância estatística fosse observada. Todas as análises foram realizadas utilizando o software R 4.0.9 (R Development Core Team, NZ).

5.1.3 RESULTADOS

5.1.3.1 Coleta de dados

Cento e dezesseis cães foram incluídos neste estudo, o que forneceu 131 amostras de espécies estafilocócicas. Quando dois isolados do mesmo animal eram obtidos do mesmo sítio corporal e tinham o mesmo perfil de resistência a antimicrobianos, apenas um deles foi mantido no estudo. A maioria dos isolados (95/131-72,5%) foi obtida no HV-UFMG, enquanto 27,5% (36/131) das amostras provenientes de 27 animais foram obtidas em uma clínica privada. Os animais pertenciam a diferentes raças e idades (entre 12 e 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 tinha informação sobre o sexo. Ao menos 64 animais (55,2%) fizeram uso prévio de antimicrobianos, 56 receberam antibióticos sistêmicos diferentes, oito deles tinham usado apenas antibióticos tópicos, e 15 deles usaram produtos sistêmicos e tópicos. Os principais antibióticos prescritos foram cefalexina (29/64), amoxicilina (9/64), uma combinação de amoxicilina e ácido clavulânico (16/64) ou enrofloxacina (11/64). A maioria dos espécimes clínicos estava associada a condições dermatológicas: 58 (44,3%) com piodermite, 28 (21,4%) com otite, 20 (15,3%) com infecções do trato geniturinário, 15 (11,4%) com infecções de ferida cirúrgica (IFC), e 10 (7,6%) de outros sítios corporais.

5.1.3.2 Isolamento e identificação de amostras

Um total de 131 amostras foram obtidas e confirmadas como *Staphylococcus* spp. pelo MALDI-TOF. Um total de 102 isolados (77,9%) foram identificados pela MALDI-TOF como parte do SIG (Tabela 2). Entre estes, a PCR do gene *nuc* confirmou 98 (96,1%) isolados como *S. pseudintermedius* e quatro (3,9%) como *S. delphini*. A sequência do gene *16S rRNA* confirmou todas as espécies, exceto em um caso, no qual a amostra foi enviada para sequenciamento do gene *rpoB* e foi identificada como *S. delphini*, confirmando os resultados

do MALDI-TOF. A espécie mais frequentemente isolada foi *S. pseudintermedius* (98/131, 74,8%), seguida por *S. schleiferi* (20/131, 15,3%) (Figura 4), embora seja importante afirmar que a possível diferenciação de *S. schleiferi* em duas espécies, *S. coagulans* e *S. schleiferi* (Madhaiyan et al., 2020), não foi investigada devido à sua recente reclassificação. Nove animais tinham ambos piodermite e otite no momento da amostragem - dois deles causados por *S. pseudintermedius* e dois causados por *S. schleiferi*; em todos esses casos, os isolados do mesmo animal apresentaram o mesmo perfil de resistência antimicrobiana. Os outros cinco animais apresentaram otite e piodermite causados por espécies diferentes, mais especificamente uma combinação de *S. pseudintermedius* e *S. schleiferi* em quatro deles e o outro com uma combinação de *S. pseudintermedius* e *S. delphini*. Dois cães com piodermite carregavam *S. pseudintermedius* sensível à meticilina (MSSP) com diferentes padrões de resistência antimicrobiana, um carregava MSSP e MRSP e dois carregavam *S. pseudintermedius* e *S. aureus*.

Tabela 2 - Distribuição e proporção de espécies de estafilococos isolados de diferentes sítios de infecção de 116 cães atendidos em um hospital e uma clínica veterinária de Belo Horizonte, Brasil, entre 2017 e 2020.

Sítio de infecção	Espécie
-------------------	---------

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)
Ouvido (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)
	<i>S. warneri</i> (n=1)
Ferida cirúrgica (n=15 – 11.4%)	<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)

* A diferenciação recentemente aprovada de *S. schleiferi* em duas espécies (*S. coagulans* e *S. schleiferi*) não foi considerada no presente trabalho.

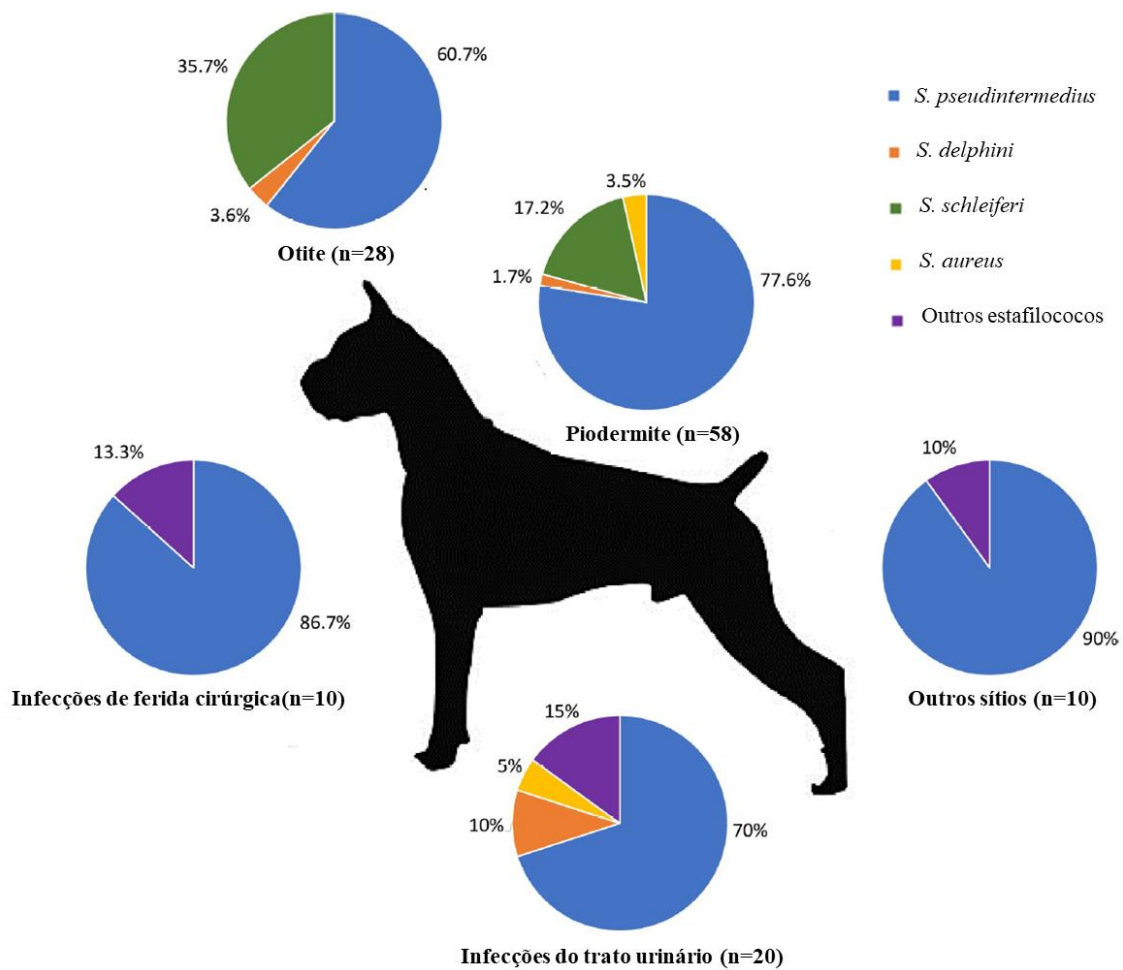


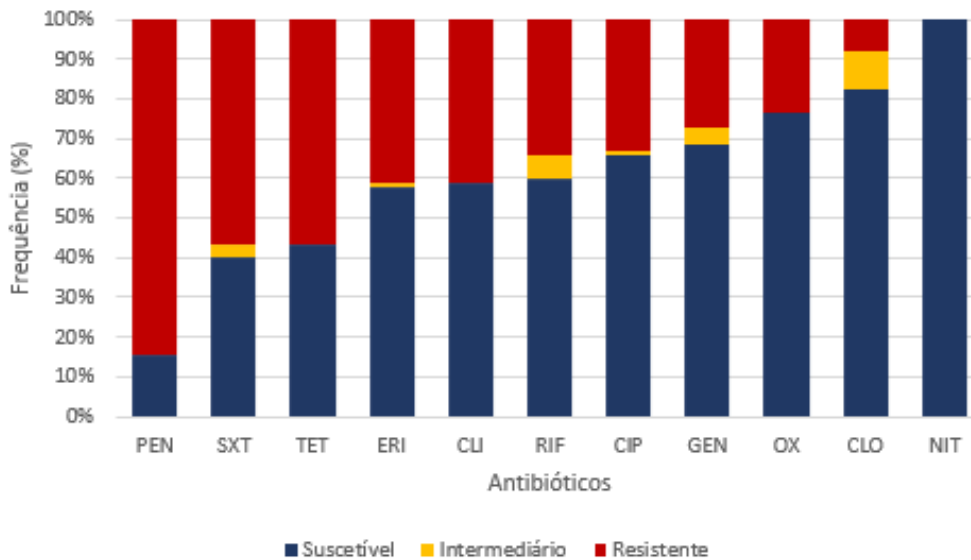
Figura 4 - Distribuição e proporção de espécies de estafilococos isoladas em diferentes sítios infecciosos de 116 cães atendidos em duas diferentes clínicas veterinárias de Belo Horizonte, entre 2017 e 2020. A diferenciação recentemente aprovada de *S. schleiferi* em duas espécies (*S. coagulans* e *S. schleiferi*) não foi considerada no presente trabalho.

5.1.3.3 Suscetibilidade a antimicrobianos

Os resultados de resistência a antimicrobianos de todas as espécies de estafilococos são descritos na Tabela 3. Um total de 88,2% (90/102) de isolados SIG foram resistentes a pelo menos um antibiótico. Cerca de 86,7% (85/98) de *S. pseudintermedius* foram resistentes à penicilina e 24,5% (24/98) foram resistentes à oxacilina. Em sequência, 59,2% (58/98) dos isolados foram resistentes à trimetoprim/sulfametoxazol, 58,2% (57/98) foram resistentes à tetraciclina e 42,9% (42/98) foram resistentes à clindamicina e à eritromicina. Todos os isolados foram suscetíveis à nitrofurantoína. Os isolados de IFC apresentaram taxas de resistência a nove dos antibióticos testados ($p < 0,05$; Figura 5b). Sessenta e dois isolados (63,3%) foram

considerados MDR. Destes, 43,5% (27/62) foram isolados de piodermite, 21% (13/62) de IFCs, 14,5% (9/62) de otites, 11,3% (7/62) de infecções do trato geniturinário e 9,7% (6/62) de outros sítios corporais. Apenas uma estirpe de *S. delphini* mostrou resistência antimicrobiana, sendo resistente à penicilina e à tetraciclina.

a



b

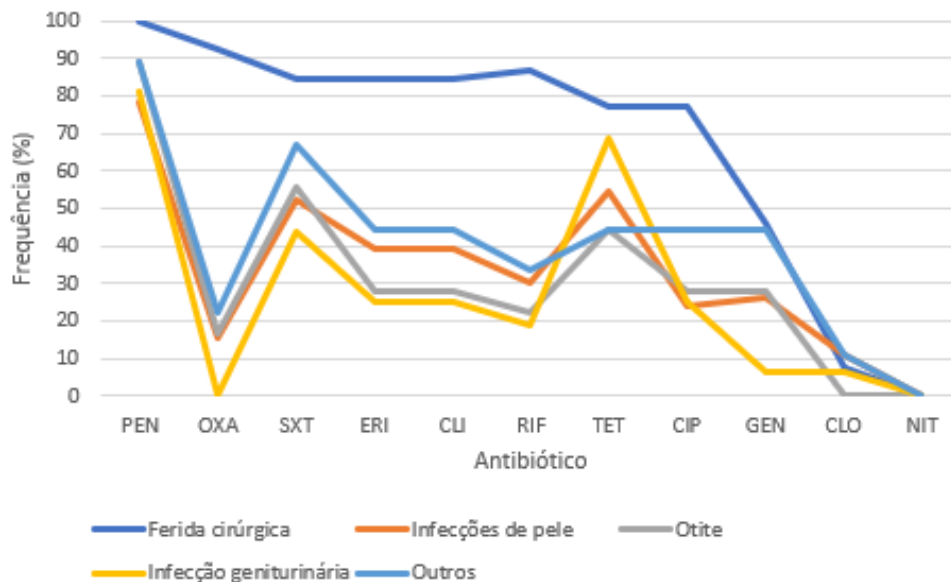


Figura 5 – Resistência antimicrobiana entre isolados clínicos do SIG obtidos de cães atendidos em duas diferentes clínicas de Belo Horizonte, entre 2017 e 2020. **a)** Prevalência de acordo com o antimicrobiano; **b)** de acordo com o tipo de infecção. OXA: oxacilina; PEN: penicilina; ERI: eritromicina; CLI: clindamicina; SXT: trimetoprim/sulfametoxazol; RIF: rifampicina; GEN: gentamicina; TET: tetraciclina; CIP: ciprofloxacina; CLO: cloranfenicol; NIT: nitrofurantóina.

Tabela 3 - Resistência antimicrobiana entre os estafilococos isolados de cães infectados atendidos em uma clínica e um hospital veterinário, no período entre 2017 e 2020, em Belo Horizonte, Brasil.

Espécie	Isolados	OXA/CEF	PEN	ERI	CLI	SXT	RIF	GEN	TET	CIP	CLO	NIT	MDR
<i>S. pseudintermedius</i>	98 (74,8%)	24 (18,3%)	85 (64,9%)	42 (32,1%)	42 (32,1%)	58 (44,3%)	35 (26,7%)	28 (21,4%)	57 (43,5%)	34 (26,0%)	8 (6,1%)	0 (0%)	62 (47,3%)
<i>S. delphini</i>	4 (3,1%)	0 (0%)	1 (0,8%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	1 (0,8%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)
<i>S. schleiferi</i> *	20 (15,3%)	0 (0%)	2 (1,5%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	2 (1,5%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)
<i>S. aureus</i>	3 (2,3%)	0 (0%)	2 (1,5%)	1 (0,8%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	1 (0,8%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)
<i>S. capitis</i>	2 (1,5%)	0 (0%)	2 (1,5%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)
<i>S. epidermidis</i>	1 (0,8%)	1 (0,8%)	1 (0,8%)	0 (0%)	1 (0,8%)	1 (0,8%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	1 (0,8%)
<i>S. simulans</i>	2 (1,5%)	0 (0%)	1 (0,8%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)
<i>S. warneri</i>	1 (0,8%)	0 (0%)	1 (0,8%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)
Total	131 (100%)	25 (19,1%)	95 (72,5%)	43 (32,8%)	43 (32,8%)	59 (45,0%)	35 (26,7%)	30 (22,9%)	59 (45,0%)	34 (26,0%)	8 (6,1%)	0 (0%)	63 (48,1%)

OXA = oxacilina, CEF = cefoxitina, PEN = penicilina, ERI = eritromicina, CLI = clindamicina, SXT = trimetoprim/sulfametoxazol, RIF = rifampicina, GEN = gentamicina, TET = tetraciclina, CIP = ciprofloxacina, CLO = cloranfenicol, NIT = nitrofurantoína, MDR = multi-drug resistance.

* A diferenciação recentemente aprovada de *S. schleiferi* em duas espécies (*S. coagulans* e *S. schleiferi*) não foi considerada no presente trabalho.

Entre os isolados não-SIG, 18 (62,1%) foram suscetíveis a todos os antimicrobianos. Nove isolados (31%) foram resistentes à penicilina, que foi a maior taxa de resistência observada entre estas estirpes. Dois isolados (6,9% - 2/29) foram resistentes a gentamicina e dois isolados resistentes a penicilina também foram resistentes a eritromicina (3,4% - 1/29) ou tetraciclina (3,4% - 1/29). Um isolado (3,4% - 1/29) foi resistente a ceftioxime, penicilina, clindamicina e sulfametoprim e positivo para o gene *mecA*, sendo assim o único isolado considerado multirresistente.

S. pseudintermedius foi significativamente associado à resistência a rifampicina (OR 5,82, 95%CI), ciprofloxacina (OR 5,83, IC 95%), clindamicina (OR 7,82, IC 95%), eritromicina (OR 7,82, IC 95%), penicilina (OR 10,11, IC 95%), oxacilina (OR 13,11, IC 95%), sulfametoprim (OR 14,73, IC 95%) e tetraciclina (OR 14,73, I 95%). As estirpes de *S. pseudintermedius* também foram associadas com MDR (OR 18,6, IC 95% 5.3-65.1) quando comparadas com outras estirpes de estafilococos.

5.1.3.4 Estafilococos resistente à meticilina

Aproximadamente 23,5% (24/102) dos isolados SIG foram positivos para o gene *mecA*, todos eles identificados como *S. pseudintermedius*. Três (10,3%) dos isolados não-SIG também foram positivos para o gene *mecA*. Destes, dois eram *S. schleiferi* e um era *S. epidermidis*. Entretanto, apenas *S. epidermidis* foi fenotipicamente resistente à oxacilina ou ceftioxime (halo de inibição = 24mm para CEF). Esta estirpe foi obtida de um cão com infecção nosocomial do trato geniturinário. Nenhum isolado de MRSA foi identificado neste estudo.

5.1.3.5 MRSP

Vinte e quatro isolados de *S. pseudintermedius* foram resistentes à oxacilina e positivos para o gene *mecA* por PCR, sendo assim considerados MRSP (Tabela 4). Destes, 50% (12/24) eram de feridas cirúrgicas, 29,2% (7/24) de lesões cutâneas, 12,5% (3/24) de otite, e 8,3% (2/24) de outros locais. Quando classificadas pelo tipo de infecção, as taxas de MRSP foram 15,6% (7/45) em cães com infecções cutâneas, 17,6% (3/17) em cães com otite, 92,3% (12/13) em cães com IFCs, e 22,2% (2/9) em outros locais. Nenhuma das linhagens de MRSP foi isolada de cães com infecção do trato geniturinário. Todos os isolados foram resistentes a pelo menos três classes de antibióticos não β -lactâmicos. Os perfis de resistência antimicrobiana mais

comuns foram OXA-PEN-ERI-CLI-SXT-RIF-CIP-TET-GEN (16,7% - 4/24) e OXA-PEN-ERI-CLI-SXT-RIF-TET-GEN (16,7% - 4/24).

Tabela 4 - Perfil de resistência a antimicrobianos de estirpes MRSP isoladas de cães (Belo Horizonte, Brasil) de acordo com os STs e sítios de infecção.

ST	CC	Perfil de resistência a antimicrobianos	Sítio de infecção
71 (n=9)	71	OXA, PEN, ERI, CLI, SXT, RIF, CIP, TET, GEN	Ferida cirúrgica (2)
			Pele (1)
		OXA, PEN, ERI, CLI, SXT, RIF, CIP, GEN	Ferida cirúrgica (1)
			Pele (1)
			Outros (1)
2124 (n=2)	NA	OXA, PEN, ERI, CLI, SXT, RIF, CIP, TET	Ferida cirúrgica (3)
		OXA, PEN, ERI, CLI, SXT, CIP, GEN	Otite (1)
		OXA, PEN, SXT, RIF, CIP, TET, GEN	Outros (1)
2125 (n=3)	NA	OXA, PEN, ERI, CLI, SXT, RIF, CIP, GEN	Ferida cirúrgica (1)
		OXA, PEN, ERI, CLI, SXT, CIP, GEN	Pele (1)
		OXA, PEN, ERI, CLI, SXT, CIP	Ferida cirúrgica (1)
2126 (n=4)	NA	OXA, PEN, ERI, CLI, SXT, RIF, TET, GEN	Pele (2)
			Ferida cirúrgica (1)
			Otite (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, ERI, CLI, CLO, CIP, TET, GEN	Ferida cirúrgica (1)
2130 (n=1)	71	OXA, PEN, ERI, CLI, SXT, RIF, CIP, TET, GEN	Otite (1)
2131 (n=1)	NA	OXA, PEN, ERI, CLI, SXT, RIF, TET	Ferida cirúrgica (1)
2164 (n=1)	NA	OXA, PEN, ERI, CLI, SXT, RIF, CHL, CIP, TET, GEN	Pele (1)

OXA = oxacilina, PEN = penicilina, ERI = eritromicina, CLI = clindamicina, SXT = trimetoprim/sulfametoxazol, RIF = rifampicina, GEN = gentamicina, TET = tetraciclina, CIP = ciprofloxacina, CLO = cloranfenicol.

*NA= não aplicável

Dez diferentes perfis de ST foram identificados, incluindo nove novos STs (ST2124 - ST2131 e ST2164) (Figura 6). Na análise do goeBURST, dez isolados (ST71 e ST2130) pertenciam ao conhecido CC71 (Figura 7e); o ST2124 estava relacionado ao CC2166 (Figura 7b); os STs 2125 e 2128 parecem estar relacionados ao CC781 (Figura 7d), enquanto o ST2127 estava mais próximo do CC558 - que evoluiu do CC781 (Figura 7d); os STs 2126 e 2131 estavam mais próximos do subfundador ST1709 (Figura 7d); e os STs 2129 e 2164 estavam mais próximos do CC1758 (Figura 7c). Na análise estatística, o CC71 foi associado à resistência à ciprofloxacina ($p < 0,05$).

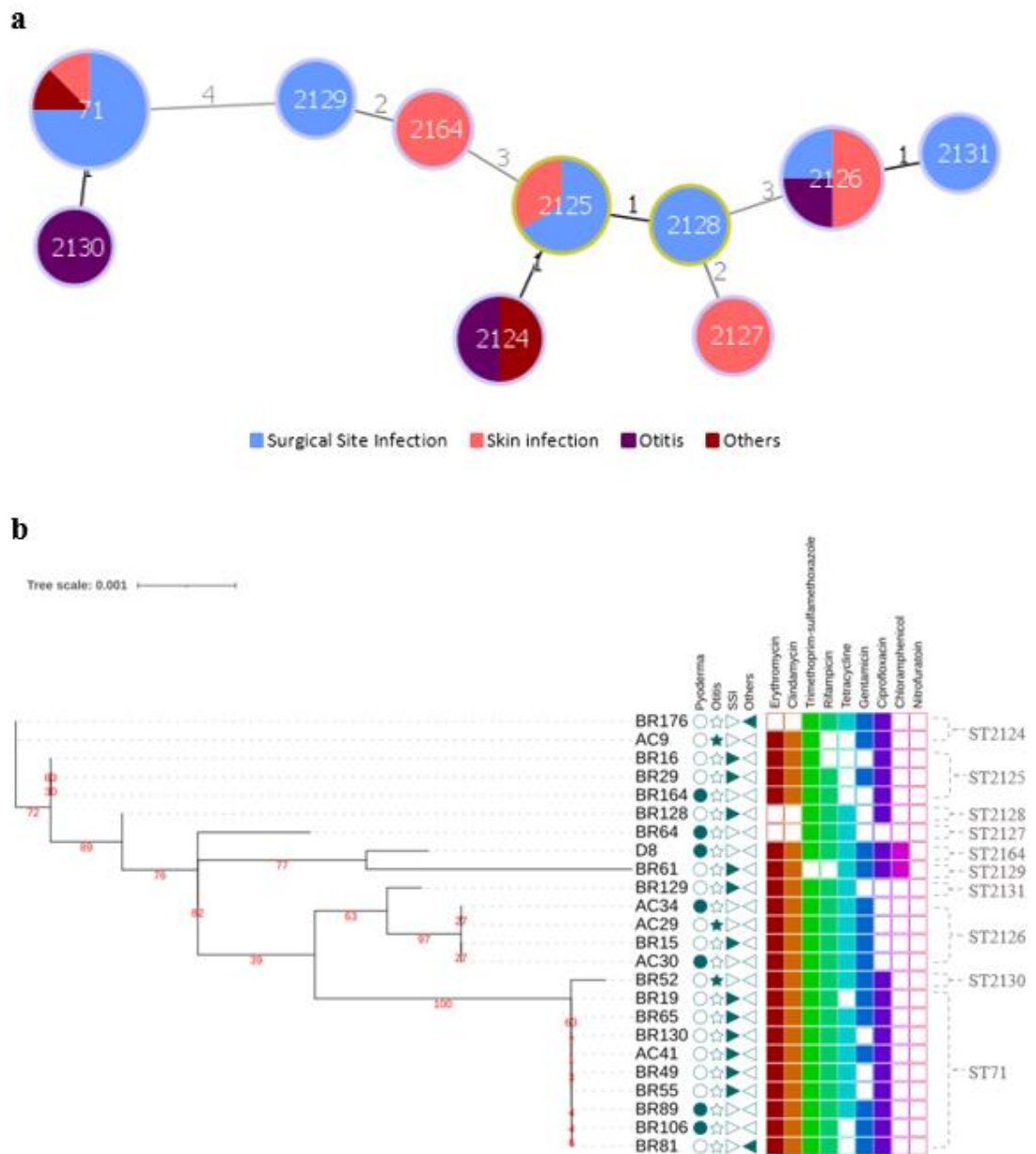


Figura 6 - Relação genética de estirpes MRSP de cães de Belo Horizonte (2017-2020). a) Snapshot da população de STs encontrados no presente estudo, utilizando-se a análise goeBURST full MST. Linhas e sombras indicam o número de variações alélicas entre os STs, e cores indicam o tipo de infecção relacionado 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.

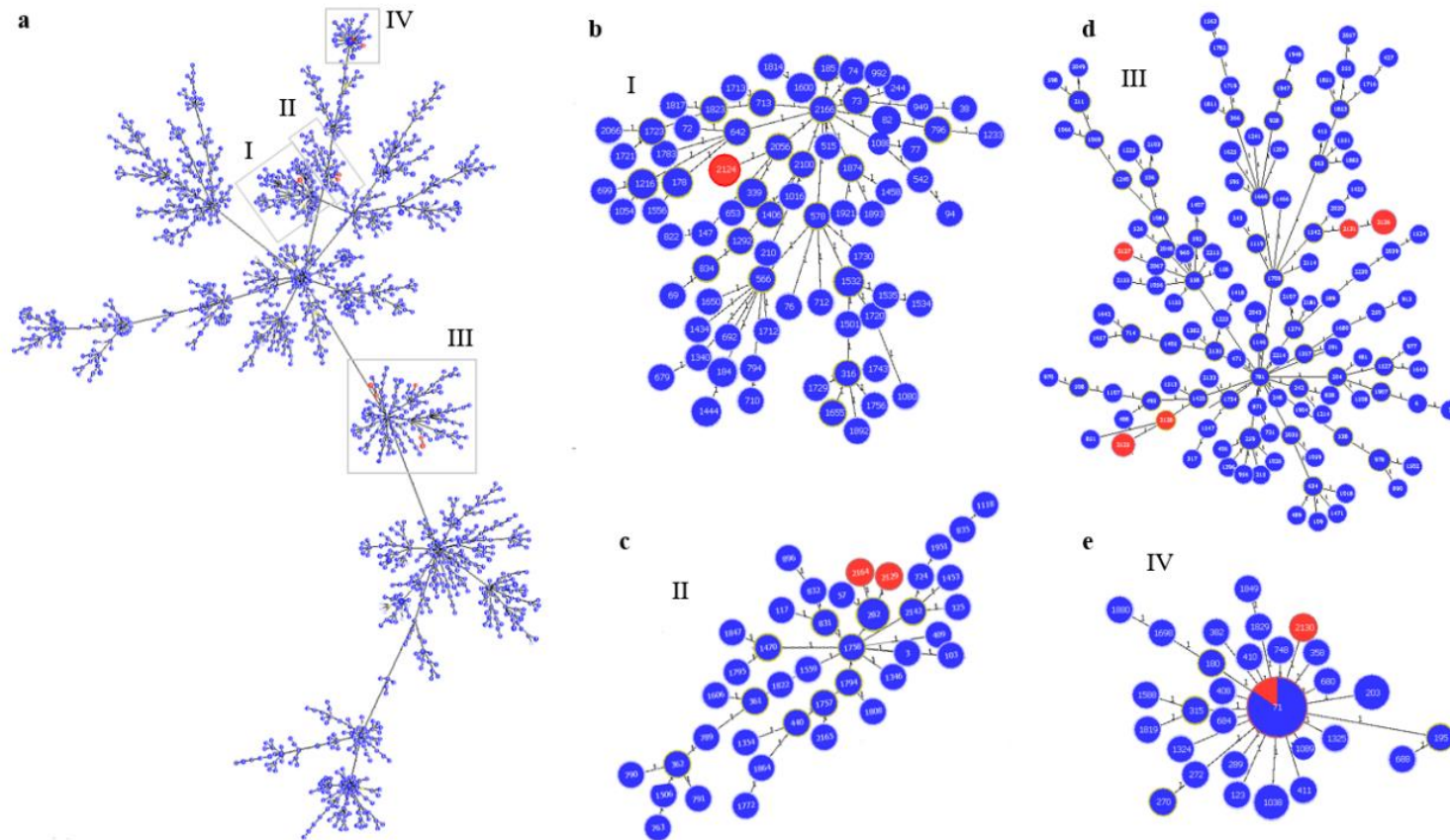


Figura 7 - Snapshot da população de *S. pseudintermedius* considerando-se variação de apenas um locus. A cor azul representa *sequence types* (STs) de todo o mundo já encontrados e depositados no banco de dados do PubMLST e vermelho indica os STs MRSP identificados no presente estudo; **a)** Estrutura populacional principal de *S. pseudintermedius*. Clusters de isolados ligados indicam complexos clonais (CCs); *singletons* não demonstrados na figura. Caixas cinzas indicam a localização 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.

5.1.3.6 Preditores para MRSP

Não houve diferença significativa na proporção de MRSP isolados entre cães fêmeas e machos ou entre grupos etários. Entretanto, tratamentos antimicrobianos anteriores (OR 9,21 CI 95% 2,05-41,25) e infecções hospitalares foram associados com o isolamento de estirpes de MRSP. Ao considerar a condição clínica apresentada pelos animais, as IFCs foram significativamente associadas ao isolamento de MRSP: um cão com IFC tinha maior probabilidade de transportar uma estirpe MRSP do que uma estirpe MSSP (OR 3,7 IC 95% 1,5-9,4). Além disso, estirpes MRSP tinham maior probabilidade de ser isoladas de IFCs do que de piodermite, otite, infecção do trato geniturinário ou infecções de outros sítios ($p < 0,05$).

5.1.4 DISCUSSÃO

No presente estudo, foi caracterizada a ocorrência de diferentes espécies de *Staphylococcus* isoladas de vários tecidos diferentes em cães e avaliou-se sua resistência a antimicrobianos. *S. pseudintermedius* foi a espécie mais prevalente neste estudo. Como é o principal agente causador do piodermite em cães, a maioria dos espécimes clínicos foi obtida de lesões cutâneas (Bannoehr e Guardabassi, 2012; Hensel et al., 2016). A segunda espécie mais frequentemente observada foi *S. schleiferi*, mas é importante lembrar que a diferenciação recentemente aprovada de *S. schleiferi* em *S. coagulans* e *S. schleiferi* (Madhaiyan et al., 2020) não foi considerada no presente trabalho. De qualquer forma, o *S. schleiferi* é raramente encontrado em portadores saudáveis e é comumente isolado de cães com otite ou piodermite (Morris et al., 2006; Morris et al., 2017; Lee et al., 2019). Alguns animais foram infectados tanto por MSSP quanto por MRSP, ou mesmo por duas espécies diferentes de *Staphylococcus*, semelhante a relatos anteriores (Bannoehr e Guardabassi, 2012; Morris et al., 2017). Como estas bactérias podem compartilhar elementos genéticos móveis, como o SCCmec, é preocupante que estirpes anteriormente suscetíveis possam adquirir genes de resistência e/ou virulência quando em contato com linhagens virulentas/resistentes (Kadlec e Schwarz, 2012; Pomba et al., 2017).

Altas taxas de RAM foram observadas entre os isolados do SIG para a maioria dos antimicrobianos testados neste estudo. A RAM é considerada um fenômeno natural, mas o uso excessivo ou inadequado de medicamentos antimicrobianos na medicina humana e veterinária acelera sua ocorrência (OIE, 2020). Mais da metade dos animais incluídos no estudo haviam

sido previamente tratados com pelo menos um antibiótico sistêmico, o que pode estar ligado às altas taxas de RAM encontradas. Infelizmente, esta frequência não é surpreendente, considerando as principais manifestações clínicas apresentadas por estes animais. Na clínica de pequenos animais, as infecções de pele são comumente vistas na rotina, sendo a principal razão para a administração de antimicrobianos em cães, respondendo por quase um terço das prescrições de antimicrobianos em clínicas de pequenos animais (Larsen et al., 2018). Similarmente, otite e doença bacteriana do trato geniturinário são causas comuns de morbidade em cães e estão entre as principais causas de uso de antimicrobianos (Penna et al., 2010b; Weese et al., 2019; Lynch e Helbig, 2021); e a cirurgia frequentemente requer profilaxia antimicrobiana e administração pós-operatória de antimicrobianos (Nelson, 2011; BSAVA, 2018). Os principais antibióticos prescritos foram cefalexina, amoxicilina, amoxicilina/ácido clavulânico e enrofloxacin. Os beta-lactâmicos são geralmente o grupo antimicrobiano mais utilizado em pequenos animais, especialmente quando a cultura bacteriana não está disponível (Guardabassi et al., 2013; Pomba et al., 2017; Weese et al., 2019).

Com exceção dos antibióticos que contêm penicilinase, o MSSP geralmente apresenta taxas satisfatórias de suscetibilidade antimicrobiana relatadas na literatura (Frank e Loeffler, 2012; Kadlec e Schwarz, 2012; Moodley et al., 2014; McCarthy et al., 2015). Entretanto, nossos resultados revelaram altas taxas de resistência antimicrobiana a várias classes de antibióticos, incluindo agentes antimicrobianos de importância crítica veterinária (OIE, 2018), tanto nas estirpes de MSSP quanto MRSP, com ocorrência significativa de MDR. Em contraste, cloranfenicol e nitrofurantoína foram os antibióticos com maiores taxas de susceptibilidade entre as estirpes de *S. pseudintermedius*, o que é esperado, já que ambos são proibidos para uso veterinário no Brasil (Brasil, 2003).

O presente estudo identificou uma ocorrência geral de 24,5% de MRSP entre todos os isolados de *S. pseudintermedius*, o que está dentro da faixa esperada, já que a literatura relata taxas variáveis de prevalência de MRSP em cães, variando de 0% a 60% (Weese e Duijkeren, 2010; Duijkeren et al., 2011a; Pires Dos Santos et al., 2016). Estudos anteriores realizados no Brasil mostraram taxas semelhantes ou maiores de MRSP em animais com piodermite, otite e infecção do trato geniturinário (Penna et al., 2010b; Penna et al., 2010a; Botoni et al., 2016; Bourguignon et al., 2016; Scherer et al., 2018) quando comparados com o presente trabalho. É importante ressaltar que não é simples fazer comparações entre diferentes estudos, pois a prevalência de MRSP depende não apenas da região geográfica, mas também do tipo de

amostra, da população incluída e da metodologia do estudo (Bannoehr e Guardabassi, 2012; Hritcu et al., 2020).

Curiosamente, mais de 90% das estirpes de *S. pseudintermedius* isoladas de feridas cirúrgicas foram MRSP. A análise estatística revelou que as IFCs, tratamento antimicrobiano prévio e infecções nosocomiais estão associados à ocorrência de MRSP. Isto está de acordo com a literatura, que demonstrou que a exposição prévia a antimicrobianos, hospitalização e lesões cutâneas e/ou feridas cirúrgicas estão associadas a um risco maior de adquirir MRSP (Duijkeren et al., 2011a; Weese et al., 2012; Grönthal et al., 2014; Grönthal et al., 2017; Saputra et al., 2017). Além disso, é possível que o grande uso de amoxicilina/ácido clavulânico, cefalosporinas e fluoroquinolonas, que foram os principais antimicrobianos prescritos aos cães incluídos neste estudo, possam estar ligados à seleção de MRSP (Guardabassi et al., 2013; Pomba et al., 2017).

Estudos anteriores utilizando MLST forneceram informações sobre a estrutura populacional do MRSP e mostraram que a disseminação deste patógeno está ligada a algumas linhagens clonais de sucesso, particularmente CC71 e CC258 na Europa, CC68 na América do Norte, e ambos CC45 e CC112 na Ásia (Perreten et al., 2010; Pires Dos Santos et al., 2016; Meroni et al., 2019). No Brasil, apenas um estudo relatou o CC de seus isolados - uma única linhagem MRSP ST71 isolada da fossa nasal de um cão saudável (Quitoco et al., 2013), de modo que não há um conhecimento extenso sobre o histórico genético de *S. pseudintermedius* que circula atualmente no país. No presente estudo, aproximadamente 41,7% (10/24) das estirpes de MRSP pertenciam ao CC71, o que também foi relatado anteriormente no Brasil (Quitoco et al., 2013). Estudos demonstraram que o CC71 é frequentemente resistente a todos os antimicrobianos utilizados na rotina de pequenos animais, incluindo macrolídeos, aminoglicosídeos e fluoroquinolonas, e que pode ser associado a maiores taxas de resistência à oxacilina, amoxicilina/ácido clavulânico, cefalotina e ampicilina (Paul et al., 2011; Duim et al., 2016; Wegener et al., 2020). De fato, os isolados pertencentes ao CC71 no presente estudo foram todos resistentes a pelo menos seis classes de antimicrobianos não beta-lactâmicos, incluindo as fluoroquinolonas, que estão associadas à propagação bem-sucedida das linhagens MDR MRSP (McCarthy et al., 2015). A maioria das linhagens CC71 foram isoladas de IFCs no mesmo hospital veterinário (dados não mostrados), o que levantou a preocupação de uma possível transmissão nosocomial, como relatado anteriormente (Grönthal et al., 2014). Uma caracterização molecular adicional é necessária para confirmar esta hipótese.

Estudos recentes na Europa, América do Norte e Oceania mostraram que a prevalência de novas linhagens está aumentando, possivelmente superando a prevalência do CC71 dentro de anos (Duim et al., 1999; Duim et al., 2016; Grönthal et al., 2017; Bergot et al., 2018; Meroni et al., 2019; Nisa et al., 2019). No presente estudo, 62,5% (15/24) das linhagens de 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. Esta observação corrobora a hipótese de que eventos de transferência horizontal de genes podem ser tão relevantes quanto a dispersão clonal para MRSP e destaca a necessidade de mais estudos no Brasil para entender melhor a evolução destas novas linhagens (Bannoehr e Guardabassi, 2012; Duim et al., 2016; Pires Dos Santos et al., 2016; Grönthal et al., 2017).

Este é o primeiro estudo a investigar extensivamente as características fenotípicas e moleculares dos isolados de *S. pseudintermedius* no Brasil. Além disso, este estudo identificou fatores de risco para aquisição de MRSP e analisou a estrutura populacional de estirpes de MRSP, o que contribui para compreender a dispersão de MRSP não apenas no Brasil, mas também na América do Sul, onde ainda há uma falta de informação sobre o mesmo. O presente estudo confirmou que *S. pseudintermedius* é a principal espécie estafilocócica isolada de cães infectados em Belo Horizonte. A alta taxa de MDR observada, especialmente as linhagens MRSP-MDR, é motivo de grande preocupação. O CC71 está atualmente circulando entre as clínicas veterinárias brasileiras e representa um desafio aos protocolos terapêuticos devido a sua resistência à maioria das classes antimicrobianas de uso diário na prática de pequenos animais e sua rápida dispersão. Entretanto, os novos STs encontrados neste estudo indicam que a propagação do MRSP via transferência horizontal de genes pode ser tão relevante quanto a dispersão clonal. Para nosso conhecimento, este é o primeiro relato brasileiro que identificou o MRSP ST71 em cães doentes e revelou novos STs circulantes no país.

5.1.5 AGRADECIMENTOS

Agradecemos a Adriane Pimenta da Costa-Val Bicalho pelo apoio e pelas amostras dos animais. Agradecemos a Renato Faria por sua valiosa contribuição na análise estatística.

5.1.6 REFERÊNCIAS

ASSIS, G.B.N.; PEREIRA, F.L.; ZEGARRA, A.U.; TAVARES, G.C.; LEAL, C.A.;

FIGUEIREDO, H.C.P. Use of MALDI-TOF Mass Spectrometry for the Fast Identification of Gram-Positive Fish Pathogens. **Frontiers in Microbiology**, v.8, p.1492, 2017. DOI: 10.3389/fmicb.2017.01492.

BANNOEHR, J.; GUARDABASSI, L. *Staphylococcus pseudintermedius* in the dog: taxonomy, diagnostics, ecology, epidemiology and pathogenicity. **Veterinary Dermatology**, v.23, p.253-e52, 2012. DOI: 10.1111/j.1365-3164.2012.01046.x.

BERGOT, M.; MARTINS-SIMÕES, P.; KILIAN, H.; CHÂTRE, P.; WORTHING, K.A.; NORRIS, J.M.; MADEC, J.-Y.; LAURENT, F.; HAENNI, M. Evolution of the Population Structure of *Staphylococcus pseudintermedius* in France. **Frontiers in Microbiology**, v.9, 2018.

BLONDEAU, L.D.; RUBIN, J.E.; DENEER, H.; KANTHAN, R.; MORRISON, B.; SANCHE, S.; RYPIEN, C.; DUECK, D.; BECK, G.; BLONDEAU, J.M. Persistent infection with *Staphylococcus pseudintermedius* in an adult oncology patient with transmission from a family dog. **Journal of Chemotherapy (Florence, Italy)**, v.32, p.151–155, 2020. DOI: 10.1080/1120009X.2020.1735142.

BOTONI, L.S.; SCHERER, C.B.; SILVA, R.O.; COURA, F.M.; HEINEMANN, M.B.; PAES-LEME, F.O.; COSTA-VAL, A.P.; BOTONI, L.S.; SCHERER, C.B.; SILVA, R.O.; COURA, F.M.; HEINEMANN, M.B.; PAES-LEME, F.O.; COSTA-VAL, A.P. Prevalence and in vitro susceptibility of methicillin-resistant *Staphylococcus pseudintermedius* (MRSP) from skin and nostrils of dogs with superficial pyoderma. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v.36, p.1178–1180, 2016. DOI: 10.1590/s0100-736x2016001200006.

BOURGUIGNON, E.; VIÇOSA, G.N.; CORSINI, C.M.M.; MOREIRA, M. A. S.; NERO, L.A.; CONCEIÇÃO, L.G.; BOURGUIGNON, E.; VIÇOSA, G.N.; CORSINI, C.M.M.; MOREIRA, M. A. S.; NERO, L.A.; CONCEIÇÃO, L.G. Description of Methicillin-resistant *Staphylococcus pseudintermedius* from canine pyoderma in Minas Gerais state, Brazil. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.68, p.299–306, 2016. DOI: 10.1590/1678-4162-8150.

BRASIL. MAPA, 2003. Instrução normativa n. 9 de 27 de junho de 2003. Brasília. Diário oficial da União, Seção 1. 2003: p. 4. Available at <https://www.gov.br/agricultura/pt-br/assuntos/insumos-agropecuarios/insumos-pecuarios/alimentacao-animal/arquivos-alimentacao-animal/legislacao/instrucao-normativa-no-9-de-27-de-junho-de-2003.pdf/view>

BRITISH SMALL ANIMAL VETERINARY ASSOCIATION. BSAVA/SAMSoc Guide to Responsible Use of Antibacterials: PROTECT ME. 2018. Available at <https://www.bsavalibrary.com/content/book/10.22233/9781910443644#overview>.

CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE (CLSI). Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing. 31st ed. CLSI supplement M100; ISBN 978-1-68440-105-5. Clinical and Laboratory Standards Institute, USA, 2021.

CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE (CLSI). Performance Standards for Antimicrobial Disk and Dilution Susceptibility Tests for Bacteria Isolated From Animals. 5th ed. CLSI supplement VET01S; ISBN 978-1-68440-093-5. Clinical and Laboratory Standards Institute, USA, 2020.

DUIJKEREN, E. VAN; CATRY, B.; GREKO, C.; MORENO, M.A.; POMBA, M.C.; PYÖRÄLÄ, S.; RUŽAUSKAS, M.; SANDERS, P.; THRELFALL, E.J.; TORREN-EDO, J.; TÖRNEKE, K. Review on methicillin-resistant *Staphylococcus pseudintermedius*. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v.66, p.2705–2714, 2011a. DOI: 10.1093/jac/dkr367.

DUIJKEREN, E. VAN; KAMPHUIS, M.; MIJE, I.C. VAN DER; LAARHOVEN, L.M.; DUIM, B.; WAGENAAR, J.A.; HOUWERS, D.J. Transmission of methicillin-resistant *Staphylococcus pseudintermedius* between infected dogs and cats and contact pets, humans and the environment in households and veterinary clinics. **Veterinary Microbiology**, v.150, p.338–343, 2011b. DOI: 10.1016/j.vetmic.2011.02.012.

DUIM, B.; VERSTAPPEN, K.M.; BROENS, E.M.; LAARHOVEN, L.M.; DUIJKEREN, E. VAN; HORDIJK, J.; HEUS, P. DE; SPANINKS, M.; TIMMERMAN, A.J.; WAGENAAR, J.A. Changes in the Population of Methicillin-Resistant *Staphylococcus pseudintermedius* and Dissemination of Antimicrobial-Resistant Phenotypes in the Netherlands. **Journal of Clinical Microbiology**, v.54, p.283–288, 2016. DOI: 10.1128/JCM.01288-15.

DUIM, B.; WASSENAAR, T.M.; RIGTER, A.; WAGENAAR, J. High-Resolution Genotyping of *Campylobacter* Strains Isolated from Poultry and Humans with Amplified Fragment Length Polymorphism Fingerprinting. **Applied and Environmental Microbiology**, v.65, p.2369–2375, 1999.

ERENCE, E.H.; DANIELIAN, A.; KIM, H.W.; YOO, F.; KUAN, E.C.; SUH, J.D. Zoonotic *Staphylococcus pseudintermedius* sinonasal infections: risk factors and resistance patterns. **International Forum of Allergy & Rhinology**, v.9, p.724–729, 2019. DOI: 10.1002/alr.22329.

FOX, J.; GE, Z.; WHARY, M.; ERDMAN, S.; HORWITZ, B. *Helicobacter hepaticus* infection in mice: Models for understanding lower bowel inflammation and cancer. **Mucosal immunology**, v.4, p.22–30, 2011. DOI: 10.1038/mi.2010.61.

FRANCISCO, A.P.; BUGALHO, M.; RAMIREZ, M.; CARRIÇO, J.A. Global optimal eBURST analysis of multilocus typing data using a graphic matroid approach. **BMC Bioinformatics**, v.10, p.152, 2009. DOI: 10.1186/1471-2105-10-152.

FRANK, L.A.; LOEFFLER, A. Methicillin-resistant *Staphylococcus pseudintermedius*: clinical challenge and treatment options. **Veterinary Dermatology**, v.23, p.283-e56, 2012. DOI: 10.1111/j.1365-3164.2012.01047.x.

GAGETTI, P.; WATTAM, A.R.; GIACOBONI, G.; DE PAULIS, A.; BERTONA, E.; CORSO, A.; ROSATO, A.E. Identification and molecular epidemiology of methicillin resistant *Staphylococcus pseudintermedius* strains isolated from canine clinical samples in Argentina. **BMC veterinary research**, v.15, p.264, 2019. DOI: 10.1186/s12917-019-1990-x.

GRÖNTHAL, T.; EKLUND, M.; THOMSON, K.; PIIPARINEN, H.; SIRONEN, T.; RANTALA, M. Antimicrobial resistance in *Staphylococcus pseudintermedius* and the

molecular epidemiology of methicillin-resistant *S. pseudintermedius* in small animals in Finland. **The Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v.72, p.1021–1030, 2017. DOI: 10.1093/jac/dkw559.

GRÖNTHAL, T.; MOODLEY, A.; NYKÄSENOJA, S.; JUNNILA, J.; GUARDABASSI, L.; THOMSON, K.; RANTALA, M. Large Outbreak Caused by Methicillin Resistant *Staphylococcus pseudintermedius* ST71 in a Finnish Veterinary Teaching Hospital – From Outbreak Control to Outbreak Prevention. **PLoS ONE**, v.9, 2014. DOI: 10.1371/journal.pone.0110084.

GUARDABASSI, L.; LARSEN, J.; WEESE, J.S.; BUTAYE, P.; BATTISTI, A.; KLUYTMANS, J.; LLOYD, D.H.; SKOV, R.L. Public health impact and antimicrobial selection of methicillin-resistant staphylococci in animals. **Journal of Global Antimicrobial Resistance**, v.1, p.55–62, 2013. DOI: 10.1016/j.jgar.2013.03.011.

HENSEL, N.; ZABEL, S.; HENSEL, P. Prior antibacterial drug exposure in dogs with methicillin-resistant *Staphylococcus pseudintermedius* (MRSP) pyoderma. **Veterinary Dermatology**, v.27, p.72-78e20, 2016. DOI: 10.1111/vde.12292.

HRITCU, O.M.; SCHMIDT, V.M.; SALEM, S.E.; MACIUCA, I.E.; MORARU, R.F.; LIPOVAN, I.; MAREŞ, M.; SOLCAN, G.; TIMOFTE, D. 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, 2020.

KADLEC, K.; SCHWARZ, S. Antimicrobial resistance of *Staphylococcus pseudintermedius*. **Veterinary Dermatology**, v.23, p.276-e55, 2012. DOI: 10.1111/j.1365-3164.2012.01056.x.

KANG, J.-H.; HWANG, C.-Y. 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. DOI: 10.1016/j.vetmic.2020.108957.

KRAPF, M.; MÜLLER, E.; REISSIG, A.; SLICKERS, P.; BRAUN, S.D.; MÜLLER, E.; EHRLICH, R.; MONECKE, S. Molecular characterisation of methicillin-resistant *Staphylococcus pseudintermedius* from dogs and the description of their SCCmec elements. **Veterinary Microbiology**, v.233, p.196–203, 2019. DOI: 10.1016/j.vetmic.2019.04.002.

LARSEN, R.F.; BOYSEN, L.; JESSEN, L.R.; GUARDABASSI, L.; DAMBORG, P. 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, p.291-e100, 2018. DOI: 10.1111/vde.12549.

LEE, G.Y.; LEE, H.-H.; HWANG, S.Y.; HONG, J.; LYOO, K.-S.; YANG, S.-J. Carriage of *Staphylococcus schleiferi* from canine otitis externa: antimicrobial resistance profiles and virulence factors associated with skin infection. **Journal of Veterinary Science**, v.20, p.e6, 2019. DOI: 10.4142/jvs.2019.20.e6.

LETUNIC, I.; BORK, P. Interactive Tree Of Life (iTOL) v4: recent updates and new developments. **Nucleic Acids Research**, v.47, p.W256–W259, 2019. DOI: 10.1093/nar/gkz239.

LOZANO, C.; REZUSTA, A.; FERRER, I.; PÉREZ-LAGUNA, V.; ZARAZAGA, M.; RUIZ-RIPA, L.; REVILLO, M.J.; TORRES, C. *Staphylococcus pseudintermedius* Human Infection Cases in Spain: Dog-to-Human Transmission. **Vector-Borne and Zoonotic Diseases**, v.17, p.268–270, 2017. DOI: 10.1089/vbz.2016.2048.

LYNCH, S.A.; HELBIG, K.J. The Complex Diseases of *Staphylococcus pseudintermedius* in Canines: Where to Next? **Veterinary Sciences**, v.8, p.11, 2021. DOI: 10.3390/vetsci8010011.

MADHAIYAN, M.; WIRTH, J.S.; SARAVANAN, V.S. Phylogenomic analyses of the *Staphylococcaceae* family suggest the reclassification of five species within the genus *Staphylococcus* as heterotypic synonyms, the promotion of five subspecies to novel species, the taxonomic reassignment of five *Staphylococcus* species to *Mammaliococcus* gen. nov., and the formal assignment of *Nosocomiicoccus* to the family Staphylococcaceae. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v.70, p.5926–5936, 2020. DOI: 10.1099/ijsem.0.004498.

MCCARTHY, A.J.; HARRISON, E.M.; STANCZAK-MROZEK, K.; LEGGETT, B.; WALLER, A.; HOLMES, M.A.; LLOYD, D.H.; LINDSAY, J.A.; LOEFFLER, A. Genomic insights into the rapid emergence and evolution of MDR in *Staphylococcus pseudintermedius*. **The Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v.70, p.997–1007, 2015. DOI: 10.1093/jac/dku496.

MELLMANN, A.; BECKER, K.; EIFF, C. VON; KECKEVOET, U.; SCHUMANN, P.; HARMSSEN, D. Sequencing and Staphylococci Identification. **Emerging Infectious Diseases**, v.12, p.333–336, 2006. DOI: 10.3201/eid1202.050962.

MERONI, G.; SOARES FILIPE, J.F.; DRAGO, L.; MARTINO, P.A. Investigation on Antibiotic-Resistance, Biofilm Formation and Virulence Factors in Multi Drug Resistant and Non Multi Drug Resistant *Staphylococcus pseudintermedius*. **Microorganisms**, v.7, p.E702, 2019. DOI: 10.3390/microorganisms7120702.

MINH, B.Q.; SCHMIDT, H.A.; CHERNOMOR, O.; SCHREMPF, D.; WOODHAMS, M.D.; HAESLER, A. VON; LANFEAR, R. IQ-TREE 2: New Models and Efficient Methods for Phylogenetic Inference in the Genomic Era. **Molecular Biology and Evolution**, v.37, p.1530–1534, 2020. DOI: 10.1093/molbev/msaa015.

MOODLEY, A.; DAMBORG, P.; NIELSEN, S.S. Antimicrobial resistance in methicillin susceptible and methicillin resistant *Staphylococcus pseudintermedius* of canine origin: literature review from 1980 to 2013. **Veterinary Microbiology**, v.171, p.337–341, 2014. DOI: 10.1016/j.vetmic.2014.02.008.

MORRIS, D.O.; LOEFFLER, A.; DAVIS, M.F.; GUARDABASSI, L.; WEESE, J.S. Recommendations for approaches to methicillin-resistant staphylococcal infections of small animals: diagnosis, therapeutic considerations and preventative measures. **Veterinary Dermatology**, v.28, p.304–e69, 2017. DOI: 10.1111/vde.12444.

MORRIS, D.O.; ROOK, K.A.; SHOFER, F.S.; RANKIN, S.C. 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, p.332–337, 2006. DOI: 10.1111/j.1365-3164.2006.00536.x.

MURAKAMI, K.; MINAMIDE, W.; WADA, K.; NAKAMURA, E.; TERAOKA, H.; WATANABE, S. Identification of methicillin-resistant strains of staphylococci by polymerase chain reaction. **Journal of Clinical Microbiology**, v.29, p.2240–2244, 1991. DOI: 10.1128/JCM.29.10.2240-2244.1991.

MURRAY, A.K.; LEE, J.; BENDALL, R.; ZHANG, L.; SUNDE, M.; SCHAUSLETTEMEÅS, J.; GAZE, W.; PAGE, A.J.; VOS, M. *Staphylococcus cornubiensis* sp. nov., a member of the *Staphylococcus intermedius* Group (SIG). **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v.68, p.3404–3408, 2018. DOI: 10.1099/ijsem.0.002992.

NASCIMENTO, M.; SOUSA, A.; RAMIREZ, M.; FRANCISCO, A.P.; CARRIÇO, J.A.; VAZ, C. PHYLOViZ 2.0: providing scalable data integration and visualization for multiple phylogenetic inference methods. **Bioinformatics (Oxford, England)**, v.33, p.128–129, 2017. DOI: 10.1093/bioinformatics/btw582.

NELSON, L.L. Surgical site infections in small animal surgery. **The Veterinary Clinics of North America. Small Animal Practice**, v.41, p.1041–1056, viii, 2011. DOI: 10.1016/j.cvsm.2011.05.010.

NISA, S.; BERCKER, C.; MIDWINTER, A.C.; BRUCE, I.; GRAHAM, C.F.; VENTER, P.; BELL, A.; FRENCH, N.P.; BENSCHOP, J.; BAILEY, K.M.; WILKINSON, D.A. Combining MALDI-TOF and genomics in the study of methicillin resistant and multidrug resistant *Staphylococcus pseudintermedius* in New Zealand. **Scientific Reports**, v.9, p.1271, 2019. DOI: 10.1038/s41598-018-37503-9.

PAUL, N.C.; MOODLEY, A.; GHIBAUDO, G.; GUARDABASSI, L. Carriage of Methicillin-Resistant *Staphylococcus pseudintermedius* in Small Animal Veterinarians: Indirect Evidence of Zoonotic Transmission. **Zoonoses and Public Health**, v.58, p.533–539, 2011. DOI: 10.1111/j.1863-2378.2011.01398.x.

PENNA, B.; VARGES, R.; MARTINS, R.; MARTINS, G.; LILENBAUM, W. In vitro antimicrobial resistance of staphylococci isolated from canine urinary tract infection. **The Canadian Veterinary Journal**, v.51, p.738–742, 2010a.

PENNA, B.; VARGES, R.; MEDEIROS, L.; MARTINS, G.M.; MARTINS, R.R.; LILENBAUM, W. Species distribution and antimicrobial susceptibility of staphylococci isolated from canine otitis externa: *Staphylococcus in canine otitis externa*. **Veterinary Dermatology**, v.21, p.292–296, 2010b. DOI: 10.1111/j.1365-3164.2009.00842.x.

PERRETEN, V.; KADLEC, K.; SCHWARZ, S.; GRÖNLUND ANDERSSON, U.; FINN, M.; GREKO, C.; MOODLEY, A.; KANIA, S.A.; FRANK, L.A.; BEMIS, D.A.; FRANCO, A.; IURESCIA, M.; BATTISTI, A.; DUIM, B.; WAGENAAR, J.A.; DUIJKEREN, E. VAN; WEESE, J.S.; FITZGERALD, J.R.; ROSSANO, A.; GUARDABASSI, L. Clonal spread of methicillin-resistant *Staphylococcus pseudintermedius* in Europe and North America: an international multicentre study. **The Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v.65, p.1145–1154, 2010. DOI: 10.1093/jac/dkq078.

PERRETEN, V.; KANIA, S.A.; BEMIS, D. *Staphylococcus ursi* sp. nov., a new member of the ‘*Staphylococcus intermedius* group’ isolated from healthy black bears. **International**

Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, v.70, p.4637–4645, 2020. DOI: 10.1099/ijsem.0.004324.

PIRES DOS SANTOS, T.; DAMBORG, P.; MOODLEY, A.; GUARDABASSI, L. 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.1599, 2016. DOI: 10.3389/fmicb.2016.01599.

PITCHER, D.G.; SAUNDERS, N.A.; OWEN, R.J. Rapid extraction of bacterial genomic DNA with guanidium thiocyanate. **Letters in Applied Microbiology**, v.8, p.151–156, 1989. DOI: 10.1111/j.1472-765X.1989.tb00262.x.

POMBA, C.; RANTALA, M.; GREKO, C.; BAPTISTE, K.E.; CATRY, B.; DUIJKEREN, E. VAN; MATEUS, A.; MORENO, M.A.; PYÖRÄLÄ, S.; RUŽAUSKAS, M.; SANDERS, P.; TEALE, C.; THRELFALL, E.J.; KUNSAGI, Z.; TORREN-EDO, J.; JUKES, H.; TÖRNEKE, K. Public health risk of antimicrobial resistance transfer from companion animals. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v.72, p.957–968, 2017. DOI: 10.1093/jac/dkw481.

QUITOCO, I.M.Z.; RAMUNDO, M.S.; SILVA-CARVALHO, M.C.; SOUZA, R.R.; BELTRAME, C.O.; OLIVEIRA, T.F. DE; ARAÚJO, R.; DEL PELOSO, P.F.; COELHO, L.R.; FIGUEIREDO, A.M.S. 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, p.336, 2013. DOI: 10.1186/1756-0500-6-336.

SAPUTRA, S.; JORDAN, D.; WORTHING, K.A.; NORRIS, J.M.; WONG, H.S.; ABRAHAM, R.; TROTT, D.J.; ABRAHAM, S. Antimicrobial resistance in coagulase-positive staphylococci isolated from companion animals in Australia: A one year study. **PloS One**, v.12, p.e0176379, 2017. DOI: 10.1371/journal.pone.0176379.

SASAKI, T.; TSUBAKISHITA, S.; TANAKA, Y.; SAKUSABE, A.; OHTSUKA, M.; HIROTAKI, S.; KAWAKAMI, T.; FUKATA, T.; HIRAMATSU, K. Multiplex-PCR method for species identification of coagulase-positive staphylococci. **Journal of Clinical Microbiology**, v.48, p.765–769, 2010. DOI: 10.1128/JCM.01232-09.

SCHERER, C.B.; BOTONI, L.S.; COURA, F.M.; SILVA, R.O.; SANTOS, R.D. DOS; HEINEMANN, M.B.; COSTA-VAL, A.P.; SCHERER, C.B.; BOTONI, L.S.; COURA, F.M.; SILVA, R.O.; SANTOS, R.D. DOS; HEINEMANN, M.B.; COSTA-VAL, A.P. Frequency and antimicrobial susceptibility of *Staphylococcus pseudintermedius* in dogs with otitis externa. **Ciência Rural**, v.48, 2018. DOI: 10.1590/0103-8478cr20170738.

SOLYMAN, S.M.; BLACK, C.C.; DUIM, B.; PERRETEN, V.; DUIJKEREN, E. VAN; WAGENAAR, J.A.; EBERLEIN, L.C.; SADEGHI, L.N.; VIDELA, R.; BEMIS, D.A.; KANIA, S.A. Multilocus sequence typing for characterization of *Staphylococcus pseudintermedius*. **Journal of Clinical Microbiology**, v.51, p.306–310, 2013. DOI: 10.1128/JCM.02421-12.

SOMAYAJI, R.; PRIYANTHA, M. A. R.; RUBIN, J.E.; CHURCH, D. Human infections due to *Staphylococcus pseudintermedius*, an emerging zoonosis of canine origin: report of 24 cases. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v.85, p.471–476, 2016. DOI: 10.1016/j.diagmicrobio.2016.05.008.

STEGMANN, R.; BURNENS, A.; MARANTA, C.A.; PERRETEN, V. Human infection associated with methicillin-resistant *Staphylococcus pseudintermedius* ST71. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v.65, p.2047–2048, 2010. DOI: 10.1093/jac/dkq241.

WEESE, J.S.; BLONDEAU, J.; BOOTHE, D.; GUARDABASSI, L.G.; GUMLEY, N.; PAPICH, M.; JESSEN, L.R.; LAPPIN, M.; RANKIN, S.; WESTROPP, J.L.; SYKES, J. 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 (London, England: 1997)**, v.247, p.8–25, 2019. DOI: 10.1016/j.tvjl.2019.02.008.

WEESE, J.S.; DUIJKEREN, E. VAN. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus pseudintermedius* in veterinary medicine. **Veterinary Microbiology**, v.140, p.418–429, 2010. DOI: 10.1016/j.vetmic.2009.01.039.

WEESE, J.S.; FAIRES, M.C.; FRANK, L.A.; REYNOLDS, L.M.; BATTISTI, A. Factors associated with methicillin-resistant versus methicillin-susceptible *Staphylococcus pseudintermedius* infection in dogs. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v.240, p.1450–1455, 2012. DOI: 10.2460/javma.240.12.1450.

WEGENER, A.; BROENS, E.M.; ZOMER, A.; SPANINKS, M.; WAGENAAR, J.A.; DUIM, B. Comparative genomics of phenotypic antimicrobial resistances in methicillin-resistant *Staphylococcus pseudintermedius* of canine origin. **Veterinary Microbiology**, v.225, p.125–131, 2018. DOI: 10.1016/j.vetmic.2018.09.013.

WEGENER, A.; DAMBORG, P.; GUARDABASSI, L.; MOODLEY, A.; MUGHINI-GRAS, L.; DUIM, B.; WAGENAAR, J.A.; BROENS, E.M. Specific staphylococcal cassette chromosome *mec* (SCC*mec*) types and clonal complexes are associated with low-level amoxicillin/clavulanic acid and cefalotin resistance in methicillin-resistant *Staphylococcus pseudintermedius*. **The Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v.75, p.508–511, 2020. DOI: 10.1093/jac/dkz509.

WORLD ORGANISATION FOR ANIMAL HEALTH (OIE). OIE List of Antimicrobial Agents of Veterinary Importance. OIE Int Committee. 2018. Available at: <http://www.oie.int>

WORLD ORGANISATION FOR ANIMAL HEALTH (OIE), 2020. Antimicrobial resistance. Available at <https://www.oie.int/en/what-we-do/global-initiatives/antimicrobial-resistance/>

5.2 Isolamento, caracterização, resistência a antimicrobianos e dinâmica de colonização de *Staphylococcus* spp. em cães internados na Unidade de Terapia Intensiva do Hospital veterinário da UFMG

RESUMO

No ambiente hospitalar veterinário, a Unidade de terapia intensiva (UTI) geralmente fornece uma boa condição de seleção e sobrevivência para patógenos multirresistentes, já que estes podem suportar o uso extensivo de diferentes antimicrobianos. Estafilococos, principalmente estafilococos resistentes à meticilina (MRS), são bactérias com ampla capacidade de adquirir e transmitir determinantes de resistência. Apesar disso, inexistem estudos avaliando a dinâmica de colonização desse gênero bacteriano em UTIs de hospitais veterinários. O objetivo deste estudo foi isolar, caracterizar e avaliar a dinâmica de colonização e a resistência a antimicrobianos de estirpes de *Staphylococcus* spp., principalmente *S. pseudintermedius* resistente à meticilina (MRSP), isoladas de cães internados na UTI do Hospital Veterinário da Universidade Federal de Minas Gerais (HV-UFMG). Para isso, foi realizado um estudo longitudinal, em que foram coletadas amostras de 54 cães internados na UTI do HV-UFMG em Belo Horizonte, Minas gerais, entre agosto de 2018 e abril de 2019, totalizando um período de 264 dias. Cada indivíduo inserido no estudo foi submetido à coleta de amostras por meio de suabes estéreis, de três sítios corporais distintos (narina, axila e reto), uma vez ao dia, do primeiro ao último dia de internação, incluindo aqueles que vieram a óbito, por diversas causas. As amostras isoladas foram identificadas pela técnica de espectrometria de massa por dessorção/ionização a laser assistida por matriz (MALDI-TOF) e confirmadas pela reação em cadeia da polimerase (PCR) ou sequenciamento do gene *16S rRNA*. Foram realizados teste de susceptibilidade antimicrobiana e detecção por PCR do gene *mecA* em todas as amostras. Cerca de 94% dos cães apresentaram isolamento de *Staphylococcus* spp. e a espécie mais isolada foi *S. pseudintermedius* (88,2%). Multirresistência (MDR) foi observada em 64,4% dos cães e cerca 39% foram positivos para MRS, sendo 21,6% MRSP e 1,9% *S. aureus* resistente à meticilina (MRSA). Estirpes MRSP resistentes a 9 classes de antimicrobianos com perfis de resistência idênticos foram observadas em pacientes diferentes e em dias diferentes. Animais colonizados por estas estirpes apresentaram tempo de internação maior que aqueles que carreavam outras estirpes MRS. A aquisição de MRSP durante a internação na UTI foi associada ao: sexo (fêmeas), idade (>7 anos) e cães que fizeram uso prévio de antimicrobianos.

Os resultados encontrados são de relevância para a saúde pública, uma vez que esta bactéria apresenta importante potencial zoonótico e as opções terapêuticas disponíveis são limitadas.

Palavras-chave: resistência à metilina, *S. pseudintermedius*, *S. aureus*, infecção nosocomial, multirresistência.

5.2.1 INTRODUÇÃO

Nas últimas décadas, muitos avanços técnicos foram obtidos na medicina veterinária com o objetivo de melhorar e prolongar a vida dos animais. Porém, em contrapartida, procedimentos cirúrgicos invasivos, terapias imunossupressoras, antimicrobianos, hospitalizações prolongadas e cuidados mais intensivos têm contribuído para o aumento de infecções nosocomiais e para a disseminação de patógenos multirresistentes em hospitais veterinários (Stull e Weese, 2015). *S. pseudintermedius* resistente à metilina (MRSP) é descrito como causa comum de infecções nosocomiais em todo o mundo (Sasaki et al., 2007; Ishihara et al., 2010; Nienhoff et al., 2011b; Grönthal et al., 2014; Lehner et al., 2014; Qekwana et al., 2017; Shoen et al., 2019). Embora frequentemente isolada de pacientes ambulatoriais, esta bactéria tem sido também isolada do próprio ambiente, incluindo superfícies, equipamentos e fômites, assim como de funcionários e de pacientes internados (Sasaki et al., 2007a; Bergström et al., 2012; Hamilton et al., 2012; Shoen et al., 2019).

Apesar da importância, a dinâmica de colonização de MRSP no ambiente hospitalar continua pouco entendida. Nesse contexto, destaca-se a unidade de terapia intensiva (UTI), como um ambiente que fornece condição favorável à seleção e sobrevivência de patógenos multirresistentes, devido ao uso extensivo de diferentes antimicrobianos (Stull et al., 2018; Shoen et al., 2019). Uma avaliação interna dos registros clínicos de pacientes internados na UTI do Hospital Veterinário da UFMG (HV-UFMG), conduzida pelo Laboratório de Bacterioses e Pesquisa, revelou MRSP como uma das principais causas de infecção em animais internados nestes leitos, o que gerou a hipótese de que poderia estar ocorrendo colonização dos animais por MRSP após internação na UTI do HV-UFMG, além do questionamento sobre quais fatores de risco poderiam estar contribuindo para a ocorrência de tal evento. Adicionalmente, um estudo recente realizado durante atendimentos clínicos no mesmo hospital demonstrou a circulação de estirpes MRSP clonais em cães com diferentes tipos de infecções por *Staphylococcus* spp. (Viegas et al., 2022), o que acrescentou a ideia de que estirpes clonais de

MRSP poderiam estar circulando em diferentes áreas do HV-UFGM, podendo configurar transmissão nosocomial entre diferentes pacientes de diferentes setores. Dessa forma, o objetivo deste estudo foi isolar, caracterizar e avaliar a dinâmica de colonização e a resistência a antimicrobianos de estirpes de *Staphylococcus* spp., principalmente MRSP, isoladas de cães internados na UTI do HV-UFGM.

5.2.2 MATERIAL E MÉTODOS

5.2.2.1 Delineamento experimental

A figura 8 apresenta o delineamento experimental deste estudo.

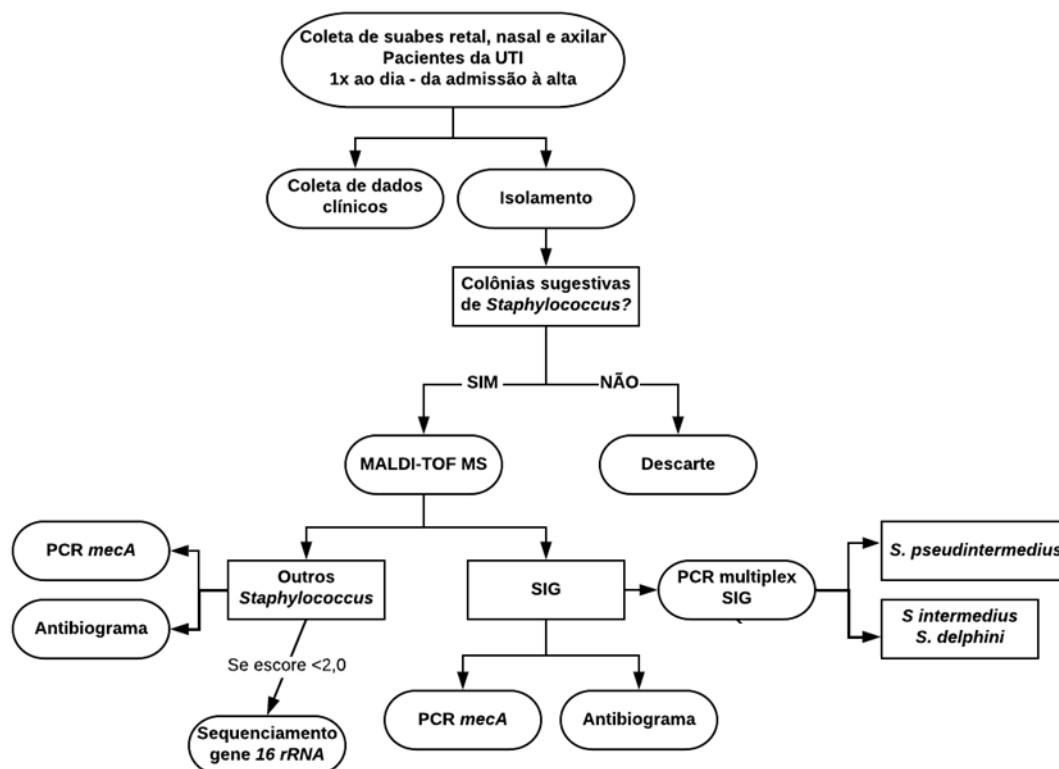


Figura 8 – Fluxograma de etapas de processamento realizadas durante o estudo com cães internados na UTI. As caixas elípticas representam os procedimentos e as caixas retangulares representam os isolados.

5.2.2.2 Coleta, isolamento e identificação das amostras

Foi realizado um estudo longitudinal, em que foram coletadas amostras de 54 cães internados na UTI do HV-UFGM em Belo Horizonte, Minas gerais, entre agosto de 2018 e abril de 2019, totalizando um período de 264 dias. Cada indivíduo inserido no estudo foi submetido à coleta de suabes estéreis de três sítios corporais distintos (narina, axila e reto), uma vez ao

dia, do primeiro ao último dia de internação, incluindo aqueles que vieram a óbito. No total, 501 suabes foram coletados e processados no Laboratório de Bacterioses e Pesquisa da Escola de Veterinária da UFMG no mesmo dia da coleta. Dados epidemiológicos foram obtidos através da avaliação das fichas clínicas dos participantes. Foram computadas informações sobre: idade, sexo, raça, porte, motivo e tempo de internação, comorbidades, uso de antimicrobianos prévio ou durante a internação, profissão do tutor (profissionais de saúde ou outros), convívio com outros animais e óbito. O estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Uso Animal (CEUA) da UFMG sob o protocolo 287/2019.

Todas as amostras foram plaqueadas em ágar manitol salgado (Kasvi, Brasil) e incubadas por 24 h a 37 °C. Colônias sugestivas de cada amostra foram subcultivadas em ágar Müller Hinton (Difco, EUA) e identificadas pela técnica de espectrometria de massa por desorção/ionização a laser assistida por matriz (MALDI-TOF MS) (Assis et al., 2017). Em resumo, para cada estirpe, 1 µl de ácido fórmico (70%) e 1 µl de matriz de MALDI-TOF MS, consistindo em uma solução saturada de ácido α -ciano-4-hidroxicinâmico (Bruker Daltonics, Bremen, Alemanha), foram aplicados no local e submetidos à secagem ao ar. Os espectros foram adquiridos utilizando o espectrômetro de massa Flex Control MicroFlex LT (Bruker Daltonics) com um laser de nitrogênio de 60-Hz com até 240 disparos de laser. Os parâmetros para detecção da faixa de massa foram definidos para permitir a identificação de 1.960 a 20.137 m/z, onde a voltagem da fonte de íons 1 era 19,99 kv, a voltagem da fonte de íons 2 era 18,24 kv e a voltagem da lente era 6,0 kv para aquisição de dados. Antes das medições, a calibração foi precedida por um padrão de teste bacteriano (*Escherichia coli* DH5 alfa; Bruker Daltonics). Os critérios de escore de identificação em Tempo Real (RT) utilizados foram os recomendados pelo fabricante: escore ≥ 2.000 indica uma identificação em nível de espécie. Os isolados identificados como representantes do Grupo *S. intermedius* (SIG) por MALDI-TOF foram confirmados por reação em cadeia da polimerase (PCR) do gene *nuc* (Sasaki et al., 2010). Os isolados não-SIG com escore MALDI-TOF abaixo de 2.000 foram submetidos ao sequenciamento do gene *16S rRNA* (Fox et al., 2011).

5.2.2.3 Teste de suscetibilidade antimicrobiana

A susceptibilidade antimicrobiana de todos os isolados de *Staphylococcus* spp. foi avaliada pelo método de disco-difusão em ágar e interpretada de acordo com os documentos do Instituto de padrões clínicos e laboratoriais (CLSI), M100-Ed31 (CLSI, 2021) e VET01S-Ed5

(CLSI, 2020). Os seguintes antimicrobianos foram testados: oxacilina (OXA, 1 µg), cefoxitina (CEF, 30 µg), penicilina (PEN, 10 IU), gentamicina (GEN, 10 µg), eritromicina (ERI, 15 µg), clindamicina (CLI, 2 µg), tetraciclina (TET, 30 µg), ciprofloxacina (CIP, 5 µg), nitrofurantoína (NIT, 300 µg), trimetoprim-sulfametoxazol (SXT, 1,25/23,75 µg), cloranfenicol (CLO, 30 µg), enrofloxacina (ENO, 5 µg) e rifampicina (RIF, 5 µg) (Oxoid, EUA). *S. aureus* ATCC® 25923 foi usado como controle. Estirpes foram consideradas resistentes a múltiplas drogas (MDR) quando resistentes a três ou mais classes de antimicrobianos (Sweeney et al., 2018).

5.2.2.4 Extração de DNA e detecção do gene *mecA*

A extração de DNA genômico bacteriano foi realizada com tiocianato de guanidina, segundo Pitcher et al. (1989). O DNA extraído foi quantificado usando um espectrofotômetro Nanodrop (Thermo Scientific, Wilmington, DE, EUA). A pureza do DNA foi determinada usando a razão de absorvância a 260/280 nm. Todos os isolados de estafilococos foram testados por PCR para determinar se carregavam o gene *mecA* (Murakami et al., 1991).

5.2.2.5 Análise estatística

Teste Qui-quadrado de aderência foi aplicado para identificar a distribuição dos dados. O comportamento do contágio em relação aos fatores de interesse foi avaliado utilizando tabelas de contingência. Para medir a associação entre variáveis categóricas e estirpes isoladas, foi realizada uma análise univariada usando o teste exato de Fisher. As associações foram expressas como odds ratios (ORs) e seus intervalos de confiança de 95% (ICs). Para variáveis quantitativas, foi usado o teste Mann-Whitney, sendo o teste de comparação de Tukey realizado caso significância estatística fosse observada. Regressão linear foi aplicada para avaliar a relação entre a duração da hospitalização e os fatores de interesse. Para todos os testes foi considerado o nível de significância de 5%. Todas as análises foram realizadas utilizando o software R 4.0.9 (R Development Core Team, NZ).

5.2.3 RESULTADOS

5.2.3.1 Coleta de dados

Em 264 dias de experimento, 54 cães foram admitidos na UTI do HV-UFMG e submetidos a 167 coletas de esfregaços nasais, retais e axilares, totalizando 501 amostras de esfregaço, que forneceram 211 isolados de *Staphylococcus* spp. (42% - 211/501) de 51 cães (94% - 51/54). O tempo de hospitalização dos cães variou de um a dez dias, com uma média de três dias ($\pm 2,1$). Os animais pertenciam a diferentes raças e idades variando de quinze dias a 219 meses, com uma média de 88 meses ($\pm 61,4$). Para realizar as análises estatísticas para a idade, os animais foram categorizados em escores de acordo com Harvey et al. (2021), sendo escore 1 para jovens (≤ 12 meses), escore 2 para adultos (> 12 e ≤ 84 meses), e escore 3 para idosos (≥ 84 meses). Após a categorização, seis animais foram considerados jovens (6/46 - 13%), dezessete adultos (37% - 17/46), vinte e três idosos (50%) e oito não tiveram idade informada. Trinta e quatro animais eram fêmeas (64% - 34/53), dezenove eram machos (36% - 19/53), e um não tinha informação sobre o sexo. Dezessete cães eram de grande porte (32% - 17/53), dezesseis eram de pequeno porte (30% - 16/53), vinte eram de médio porte (38% - 20/53), e um não tinha continha essa informação. Trinta cães tiveram contato com outros animais (70% - 30/43), treze não tiveram (30% - 13/43), e onze não continham essa informação. Vinte animais usaram antimicrobianos previamente à admissão na UTI (49% - 20/41), vinte e um não usaram (51% - 21/41), e esta informação não foi obtida para treze animais. Vinte e cinco animais apresentavam alguma comorbidade quando admitidos na UTI (47% - 25/53), vinte e oito não apresentavam (53% - 28/53), e não há informações sobre um animal. Quarenta e um cães receberam tratamento antimicrobiano durante sua estadia na UTI (77% - 41/53), apenas doze não receberam (23% - 12/53), e não há informações sobre um animal. Vinte animais morreram durante a internação (38% - 20/53), trinta e três não (62% - 33/53), e não há informações sobre um animal.

5.2.3.2 Isolamento

Duzentos e onze isolados estafilocócicos (42%) foram obtidos de 51 cães (94%) admitidos na UTI de HV-UFMG. A descrição de cães hospitalizados, cães positivos e isolados de *Staphylococcus* spp., *S. pseudintermedius* e MRSP recuperados por dia está sumarizada na tabela 5.

Tabela 5 - Frequência de isolamento total e por dia de internação de *Staphylococcus* spp., *S. pseudintermedius* e MRSP recuperados de 54 cães internados na UTI do HV-UFGM entre agosto de 2018 e abril de 2019.

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

Dos 211 isolados de *Staphylococcus* spp. obtidos, 85 (50,9%), 72 (43,1%) e 54 (32,3%) foram recuperados dos sítios nasal, retal e axilar, respectivamente (Tabela 6). Houve diferença estatística significativa na frequência de isolamento de *Staphylococcus* spp. entre os sítios amostrados ($p=0,05$), sendo o isolamento no sítio nasal igual ao isolamento no sítio retal ($p=0,226$) e maior que no sítio axilar ($p=0,001$). Já a frequência de isolamento no sítio retal foi estatisticamente igual à do sítio axilar ($p=0,07$) (Tabela 6).

5.2.3.3 Distribuição de espécies de *Staphylococcus*

Doze espécies de *Staphylococcus* foram encontradas entre os 211 isolados obtidos (Tabela 6). *S. pseudintermedius* foi a espécie mais frequente (71,1%), tendo, ao menos, seis vezes mais chances de ser isolada que qualquer outra espécie identificada neste estudo ($p<0,001$). Este agente foi recuperado de 45 (88,2%) dos 51 cães que obtiveram isolamento estafilocócico e apresentou isolamento estatisticamente maior nos sítios nasal (39,3% - $p=0,002$) e retal (38% - $p=0,005$) quando comparados ao sítio axilar (22,7%).

S. aureus foi a segunda espécie mais observada (12,8%), porém, com exceção de *S. pseudintermedius*, não houve diferença estatística entre sua frequência de isolamento e a soma das frequências dos demais agentes ($p=0,4861$). Esta bactéria foi isolada de 13 cães (25,5%) e

encontrada, principalmente, no sítio nasal, apresentando 5,6 vezes mais chances de isolamento neste sítio do que na soma dos demais ($p=0,005$).

As outras dez espécies identificadas apresentaram frequência de isolamento total abaixo de 7% (Tabela 6). A diversidade de espécies por sítio foi avaliada e apresentou diferença estatística significativa ($p=0,037$). O sítio axilar apresentou 11 espécies das 12 encontradas (91,7%), indicando diversidade estatisticamente maior que o sítio nasal (41,6% - $p=0,027$). Porém, quando comparado ao sítio retal (9/12 – 75%), o sítio axilar foi considerado estatisticamente igual ($p=0,590$). Os sítios retal e nasal também foram considerados estatisticamente iguais quanto à diversidade de espécies isoladas ($p=0,213$).

Tabela 6 – Distribuição de espécies e frequência de isolados (total e por sítio de coleta).

Espécie	Isolados totais	Isolados nasais	Isolados retais	Isolados axilares
SIG	151/211 (71,5%)	59/151 (39,1%)	57/151 (37,7%)	35/151 (23,2%)
<i>S. pseudintermedius</i>	150/211 (71,1%)	59/150 (39,3%) ^d	57/150 (38,0%) ^d	34/150 (22,7%) ^e
<i>S. delphini</i> Grupo A	1/211 (0,5%)	0/1 (0%)	0/1 (0%)	1/1 (100,0%)
Não-SIG	60/211 (28,4%)	26/60 (43,3%)	15/60 (25,0%)	19/60 (31,7%)
<i>S. aureus</i>	27/211 (12,8%)	19/27 (70,4%) ^f	2/27 (7,4%) ^g	6/27 (22,2%) ^g
<i>S. haemolyticus</i>	13/211 (6,2%)	5/13 (38,5%)	4/13 (30,8%)	4/13 (30,8%)
<i>S. devriese</i>	4/211 (1,9%)	0/4 (0%)	1/4 (25,0%)	3/4 (75,0%)
<i>S. felis</i>	3/211 (1,4%)	0/3 (0%)	3/3 (100,0%)	0/3 (0%)
<i>S. epidermidis</i>	3/211 (1,4%)	0/3 (0%)	1/3 (33,3%)	2/3 (66,7%)
<i>S. hominis</i>	3/211 (1,4%)	1/3 (33,3%)	1/3 (33,3%)	1/3 (33,3%)
<i>S. simulans</i>	3/211 (1,4%)	0/3 (0%)	2/3 (66,7%)	1/3 (33,3%)
<i>S. saprophyticus</i>	2/211 (1,0%)	1/2 (50,0%)	0/2 (0%)	1/2 (50,0%)
<i>S. schleiferi</i>	1/211 (0,5%)	0/1 (0%)	1/1 (100,0%)	0/1 (0%)
<i>S. equorum</i>	1/211 (0,5%)	0/1 (0%)	0/1 (0%)	1/1 (100,0%)
Total**	211 (100%)	85/211 (50,9%)^a	72/211 (43,1%)^{ab}	54/211 (32,3%)^b

*A recente diferenciação aprovada de *S. schleiferi* em duas espécies (*S. coagulans* e *S. schleiferi*) não foi considerada no presente trabalho. **Letras iguais nas linhas indicam que não houve diferença estatística. Letras diferentes indicam que houve diferença estatística ao nível de 5% ($p<0,05$ – Teste de Qui-quadrado).

5.2.3.4 Resistência a antimicrobianos

5.2.3.4.1 Resistência geral

Dos 211 isolados, 158 (74,9%) foram resistentes a pelo menos um dos antimicrobianos testados, 92 (43,6%) foram multirresistentes (Figura 9), e apenas 53 (25,1%) foram totalmente suscetíveis. Avaliando os cães que tinham isolados estafilocócicos, 45 (88,2%) tinham estirpes resistentes, 33 (64,7%) carregavam estirpes multirresistentes e 30 (39,2%) carregavam estirpes MRS. A relação de isolados resistentes a diferentes classes de antimicrobianos é descrita na tabela 7.

Tabela 7 - Frequência de isolados susceptíveis e resistentes a diferentes classes de antimicrobianos.

Susceptibilidade a antimicrobianos	Isolados	%
Susceptíveis	53	25,1
Resistentes a 1 classe	36	17,1
Resistentes a 2 classes	30	14,2
Resistentes a 3 ou mais classes	92	43,6
Total	211	100,0

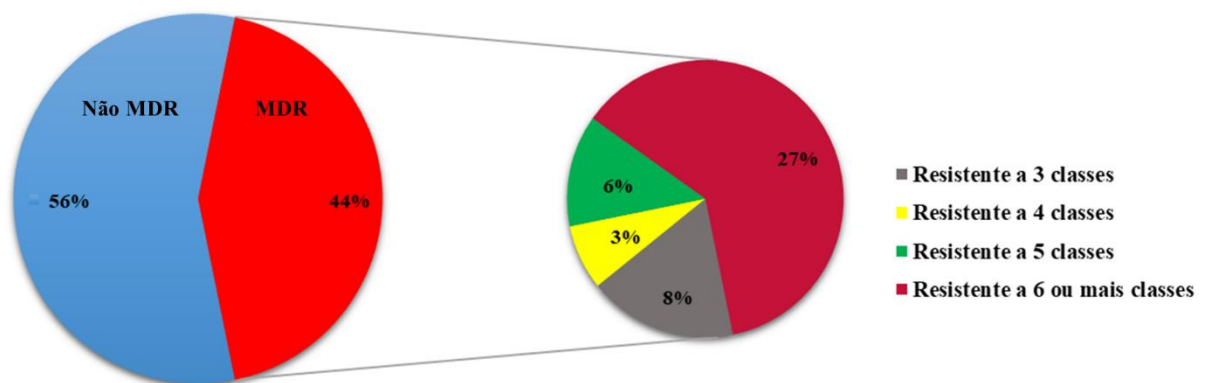


Figura 9 – Frequência (%) total de estafilococos resistentes a múltiplos antimicrobianos (MDR) e frequência (%) de isolados resistentes a 3 ou mais classes de antimicrobianos.

Penicilina G (57,8%) foi o antimicrobiano com mais isolados resistentes (Tabela 8), sendo estatisticamente igual à tetraciclina (52,1%) ($p=0,281$), mas superior aos demais ($p=0,008$). A tabela 8 apresenta a frequência de resistência encontrada para todos os antimicrobianos testados. A maioria deles apresentou frequências de resistência entre 20 e 50%, sendo apenas cloranfenicol (7,6%) e nitrofurantóina (1,9%) abaixo deste intervalo.

Tabela 8 - Resistência antimicrobiana entre os estafilococos isolados de cães internados na UTI do HV-UFGM em Belo Horizonte, Minas Gerais, entre agosto de 2018 e abril de 2019.

Espécie	Isolados	OXA/FOX	PEN	TET	SXT	ERI	CLI	RIF	CIP	GEN	ENO	CHL	NIT	MRS	MDR
SIG	151 (71,5%)	38 (18,0%)	97 (46,0%)	88 (41,7%)	75 (35,5%)	52 (24,6%)	52 (24,6%)	44 (20,8%)	42 (19,9%)	42 (19,9%)	41 (19,4%)	13 (6,2%)	1 (0,5%)	38 (18,0%)	69 (32,7%)
<i>S. pseudintermedius</i>	150 (71,1%)	38 (18,0%)	96 (45,5%)	87 (41,2%)	75 (35,5%)	52 (24,6%)	52 (24,6%)	44 (20,8%)	42 (19,9%)	42 (19,9%)	41 (19,4%)	13 (6,2%)	1 (0,5%)	38 (18,0%)	69 (32,7%)
<i>S. delphini</i>	1 (0,5%)	0 (0%)	1 (0,5%)	1 (0,5%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)
Grupo A	60 (28,4%)	14 (6,6%)	25 (11,8%)	22 (10,4%)	19 (9,0%)	24 (11,4%)	22 (10,4%)	6 (2,8%)	15 (7,1%)	10 (4,7%)	15 (7,1%)	3 (1,4%)	3 (1,4%)	19 (9,0%)	23 (10,9%)
<i>S. aureus</i>	27 (12,8%)	4 (1,9%)	11 (5,2%)	10 (4,7%)	7 (3,3%)	9 (4,3%)	8 (3,8%)	3 (1,4%)	6 (2,8%)	5 (2,4%)	6 (2,8%)	2 (0,9%)	2 (0,9%)	4 (1,9%)	8 (3,8%)
<i>S. haemolyticus</i>	13 (6,2%)	2 (0,9%)	6 (2,8%)	5 (2,4%)	2 (0,9%)	6 (2,8%)	3 (1,4%)	1 (0,5%)	2 (0,9%)	1 (0,5%)	2 (0,9%)	0 (0%)	0 (0%)	7 (3,3%)	3 (1,4%)
<i>S. devriese</i>	4 (1,9%)	0 (0%)	2 (0,9%)	0 (0%)	0 (0%)	2 (0,9%)	2 (0,9%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	1 (0,5%)	2 (0,9%)
<i>S. felis</i>	3 (1,4%)	3 (1,4%)	2 (0,9%)	2 (0,9%)	2 (0,9%)	2 (0,9%)	2 (0,9%)	1 (0,5%)	2 (0,9%)	2 (0,9%)	2 (0,9%)	0 (0%)	0 (0%)	2 (0,9%)	3 (1,4%)
<i>S. epidermidis</i>	3 (1,4%)	2 (0,9%)	0 (0%)	2 (0,9%)	3 (1,4%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	2 (0,9%)	0 (0%)	2 (0,9%)	0 (0%)	0 (0%)	1 (0,5%)	2 (0,9%)
<i>S. hominis</i>	3 (1,4%)	1 (0,5%)	2 (0,9%)	1 (0,5%)	2 (0,9%)	3 (1,4%)	2 (0,9%)	1 (0,5%)	1 (0,5%)	1 (0,5%)	1 (0,5%)	1 (0,5%)	1 (0,5%)	2 (0,9%)	2 (0,9%)
<i>S. simulans</i>	3 (1,4%)	1 (0,5%)	1 (0,5%)	1 (0,5%)	1 (0,5%)	1 (0,5%)	3 (1,4%)	0 (0%)	1 (0,5%)	0 (0%)	1 (0,5%)	0 (0%)	0 (0%)	1 (0,5%)	2 (0,9%)
<i>S. saprophyticus</i>	2 (1,0%)	1 (0,5%)	1 (0,5%)	1 (0,5%)	1 (0,5%)	1 (0,5%)	1 (0,5%)	0 (0%)	1 (0,5%)	1 (0,5%)	1 (0,5%)	0 (0%)	0 (0%)	1 (0,5%)	1 (0,5%)
<i>S. schleiferi</i> *	1 (0,5%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	1 (0,5%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)
<i>S. equorum</i>	1 (0,5%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	1 (0,5%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)
Total	211 (100%)	52^c (24,6%)	122^f (57,8%)	110^{ef} (52,1%)	94^{de} (44,5%)	76^d (36,0%)	74^d (35,0%)	50^c (23,7%)	57^c (27,0%)	52^c (24,6%)	56^c (26,5%)	16^b (7,6%)	4^a (1,9%)	57 (27,0%)	92 (43,6%)

*A recente diferenciação aprovada de *S. schleiferi* em duas espécies (*S. coagulans* e *S. schleiferi*) não foi considerada no presente trabalho.

5.2.3.4.2 Resistência à meticilina (MRS)

Dos 211 isolados, 57 (27,0%) foram MRS (Tabela 8) e pertenciam a 20 (39,2%) dos 51 cães que apresentaram isolamento estafilocócico (Tabela 9). Trinta e oito (18%) isolados MRSP foram obtidos de 11 cães (21,6%) e quatro MRSA (1,9%) foram obtidos de três cães (5,9%). A tabela 9 apresenta também as frequências de cães com estirpes MDR das espécies *S. pseudintermedius* e *S. aureus*.

Tabela 9 - Frequência de *Staphylococcus* spp., *S. pseudintermedius* e *S. aureus* resistentes à meticilina (MRS) e resistentes a múltiplos antimicrobianos (MDR) em cães que apresentaram isolamento estafilocócico.

Isolado	Cães (%)	
	Estirpes MRS	Estirpes MDR
<i>Staphylococcus</i> spp.	20/51 (39,2%)	33/51 (64,7%)
<i>S. pseudintermedius</i>	11/51 (21,6%)	25/51 (49,0%)
<i>S. aureus</i>	3/51 (5,9%)	6/51 (11,8%)

5.2.3.4.3 Resistência genotípica (gene *mecA*)

Das 57 estirpes MRS, 48 (84,2%) foram positivas para o gene *mecA* e nove (15,8%) foram fenotipicamente resistentes à cefoxitina. Os 48 (22,7%) isolados positivos para o gene *mecA* pertenciam a 17 (33,3%) cães. Cinco espécies diferentes apresentaram esse gene (tabela 10), mas a frequência de *S. pseudintermedius* (79,2%) foi excessivamente maior, podendo, nesta condição, ter *mecA* pelo menos 22,2 vezes mais que as demais espécies ($p < 0,001$). A frequência de MRSP também foi avaliada nos três sítios amostrados (nasal: 16/85 - 18,9%; retal: 15/72 - 20,83% e axilar: 7/54 - 13,0%) e todos foram considerados estatisticamente iguais ($p = 0,511$).

Quarenta das 48 (83,3%) estirpes MRS foram resistentes fenotipicamente à oxacilina/cefoxitina (teste preditor do gene *mecA* em estafilococos). Com exceção de MRSP, todas as quatro espécies restantes apresentaram fenótipos susceptíveis neste teste, gerando resultados incompatíveis com o teste genotípico (Tabela 10). Dentre os oito isolados, seis

(12,5%) foram susceptíveis a cefoxitina e penicilina e dois foram susceptíveis à cefoxitina e resistentes à penicilina.

Tabela 10 – Total de isolados, frequência e espécies estafilocócicas que apresentaram o gene *mecA*.

Espécie	Total de Isolados e Frequência (%)	<i>mecA</i>+ e susceptibilidade a CEF/OXA
<i>S. pseudintermedius</i>	38/48 (79,2%)	0/38 (0%)
<i>S. haemolyticus</i>	7/48 (14,6%)	5/7 (71,4%)
<i>S. hominis</i>	1/48 (2,1%)	1/1 (100,0%)
<i>S. epidermidis</i>	1/48 (2,1%)	1/1 (100,0%)
<i>S. devriesei</i>	1/48 (2,1%)	1/1 (100,0%)
Total	48/48 (100,0%)	8/48 (16,7%)

5.2.3.4.4 Resistência fenotípica à meticilina (resistência à cefoxitina)

Nove (4,3%) isolados de 7 (13,7%) cães apresentaram perfil fenotípico condizente com MRS (resistência à cefoxitina, penicilina e, no mínimo, mais duas classes diferentes de antimicrobianos), mesmo não sendo positivos para o gene *mecA*. Cinco espécies diferentes foram encontradas (Tabela 11), entre elas MRSA, porém, diferença estatística não foi observada entre suas frequências ($p=0,2925$).

Tabela 11 – Espécies estafilocócicas e total de isolados que apresentaram perfil fenotípico de resistência à meticilina (MRS).

Espécie	Frequência (%)
<i>S. aureus</i>	4/9 (44,4%)
<i>S. felis</i>	2/9 (14,6%)
<i>S. hominis</i>	1/9 (11,1%)
<i>S. simulans</i>	1/9 (11,1%)
<i>S. saprophyticus</i>	1/9 (11,1%)
Total	9/48 (100,0%)

5.2.3.5 Dinâmica de colonização de estirpes MRSP nos cães internados na UTI do HV-UFMG

Quando avaliada a dinâmica de isolamento durante os dias de internação (Tabela 5), foi observada uma relação linear significativa entre os dias e a proporção de isolados MRSP (p-valor = 0,001, $R^2 = 0,733$) em que, para cada dia de internação, observou-se um crescimento de 9,142% de isolados nesta proporção (Figura 10a). Quando avaliada por animal, essa relação também foi significativa (p-valor = 0,003, $R^2 = 0,656$), em que, para cada dia de internação, foi observado um crescimento de 9,748% de cães positivos para MRSP nesta proporção (Figura 10b).

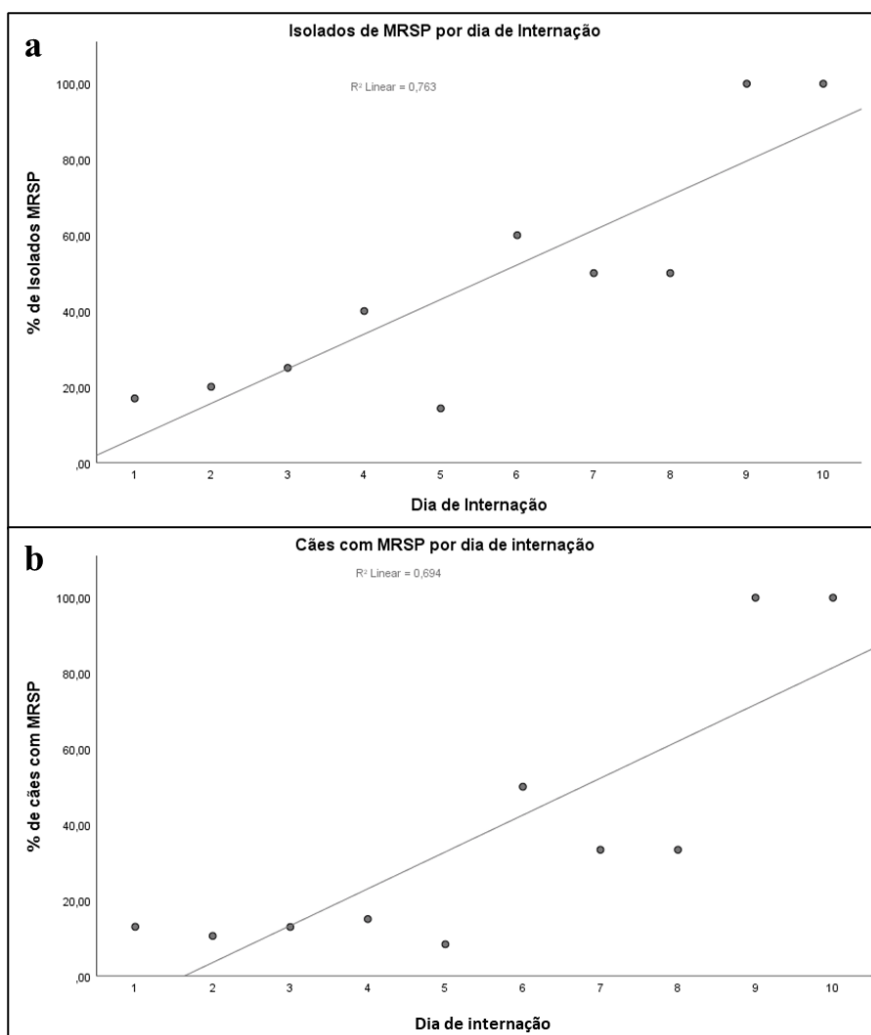


Figura 10 – Relação entre o dia de internação e a proporção de estirpes MRSP (a); Relação entre o dia de internação e a proporção de cães positivos para estirpes MRSP.

Algumas análises sobre a influência de estirpes MRSP no tempo de internação dos animais também foram realizadas. Não foi encontrada diferença no tempo de internação entre cães que são MSSP e MRSP já no primeiro dia de internação, assim como em cães que adquiriram MRSP após o segundo dia de internação. No entanto, a análise de estirpes MRSP resistentes a diferentes classes de antimicrobianos apresentou diferença estatística (Figura 11). Cães com estirpes MRSP resistentes a 9 classes de antimicrobianos (19 delas com perfil idêntico, conforme descrito na Tabela 12) ficaram internados, em média, 6,4 dias, enquanto a média geral de todos os cães com outras estirpes MRSP foi 2,4 dias ($p = 0,009$).

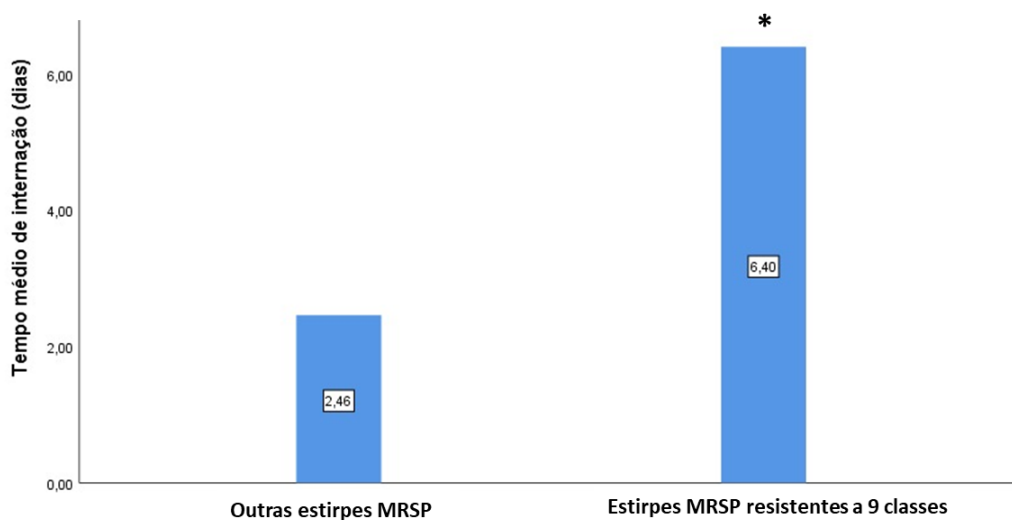


Figura 11 – Comparação do tempo médio de dias de internação entre cães com estirpes MRSP resistentes a nove classes de antimicrobianos e cães com outras estirpes MRSP. * Diferença estatística significativa ($p = 0,009$).

Alguns perfis de resistência de estirpes MRSP foram observados repetidas vezes durante o período do experimento. Dos 38 isolados MRSP, sete (18,4%), obtidos todos do mesmo cão (32), apresentaram o mesmo perfil de resistência a dez classes de antimicrobianos (perfil 4 - tabela 12), sendo estes isolados os únicos que apresentaram resistência à cloranfenicol.

Dezenove isolados (50,0%) foram resistentes a nove classes diferentes de antimicrobianos, sendo que 18 deles apresentaram perfis idênticos de resistência (perfil 2 - tabela 12) e foram recuperados de seis animais diferentes que foram internados na UTI entre os dias 13 e 263 (tabela 12). O animal 5 foi o primeiro a apresentar um MRSP com este perfil de resistência já no primeiro dia de internação (dia 13). O mesmo tinha histórico de uso prévio de antimicrobianos e apresentou, também no primeiro dia, outra estirpe MRSP com perfil

resistente a 7 classes (perfil 3 - tabela 12), idêntico ao perfil de resistência registrado posteriormente em um MRSP isolado do animal 10 no dia 34. O perfil 2 também foi encontrado nos animais 16 (MRSP - do 4º ao 6º dias de internação – dias 48 a 50), 53 (MRSP - 6º e 9º dias de internação – dias 236 e 239), 54 (MRSP - 3º e 4º dias de internação – dias 234 e 235) e 57 (MRSP - 1º, 2º e 4º dias de internação - dias 260, 261 e 263).

O animal 53 também apresentou outro MRSP com perfil de resistência diferente (perfil 7 - Tabela 12) no 3º, 5º e 10º dia de internação (dias 233, 235 e 240, respectivamente). Este animal foi aquele que ficou mais tempo internado (10 dias). Ele chegou à UTI sem isolamento de MRSP e parece ter adquirido estas estirpes a partir do 3º dia de internação (dia 233).

O animal 55 apresentou MRSP no 1º e 2º dias de internação (dias 246 e 247, respectivamente) com perfil diferente dos demais já isolados (perfil 8) que não foi encontrado posteriormente em outros animais.

Todos os animais acima citados portadores de MRSP usaram antimicrobianos durante a internação (Tabela 12), incluindo beta-lactâmicos. Três deles também fizeram uso prévio de antimicrobianos, sendo que dos outros três não foi possível recuperar esta informação.

Tabela 12 – Dia de internação, dia real do experimento, uso prévio de antimicrobianos e perfis de resistência dos isolados MRSP recuperados de cães internados na UTI do HV-UFGM entre agosto de 2018 e abril de 2019.

Animal	Isolados MRSP	Dia UTI*	Dia real**	ATB UTI	Perfil de resistência fenotípica	Perfil de resistência
1	S1.3N	3	3	Não	OXA-RIF-PEN-TET	1
	S5.1N	1	13	Sim	OXA-ERI-CLI-SUT-ENO-RIF-PEN-CIP-TET-GEN	2
5	S5.1R	1	13	Sim	OXA-ERI-CLI-SUT-ENO-PEN-CIP-GEN	3
	S5.2N	2	14	Sim	OXA-ERI-CLI-SUT-ENO-RIF-PEN-CIP-TET-GEN	2
10	S10.1R	1	34	Sim	OXA-ERI-CLI-SUT-ENO-PEN-CIP-GEN	3
	S16.4R	4	48	Sim		
	S16.4A	4	48	Sim		
16	S16.5R	5	49	Sim	OXA-ERI-CLI-SUT-ENO-RIF-PEN-CIP-TET-GEN	2
	S16.6N	6	50	Sim		
	S16.6R	6	50	Sim		
	S32.1N	1	188	Não	OXA-ERI-CLI-SUT-ENO-RIF-PEN-CLO-CIP-TET-GEN	4
	S32.1R	1	188	Não		
	S32.2N	2	189	Não	OXA-ERI-CLI-SUT-ENO-PEN-CLO-CIP-TET-GEN	5
32	S32.2R	2	189	Não		
	S32.3N	3	190	Não		
	S32.3R	3	190	Não	OXA-ERI-CLI-SUT-ENO-RIF-PEN-CLO-CIP-TET-GEN	4
	S32.4N	4	191	Não		
	S32.4R	4	191	Não		
	S50.1N	1	228	Não		
50	S50.1R	1	228	Não	OXA-ERI-CLI-SUT-PEN-TET	6
	S50.1A	1	228	Não		
	S53.3N	3	233	Sim		
	S53.5A	5	235	Sim	OXA-ERI-CLI-SUT-ENO-RIF-PEN-CIP-GEN	7
53	S53.6R	6	236	Sim	OXA-ERI-CLI-SUT-ENO-RIF-PEN-CIP-TET-GEN	2
	S53.9N	9	239	Sim		
	S53.10N	10	240	Sim	OXA-ERI-CLI-SUT-ENO-RIF-PEN-CIP-GEN	7
	S54.3N	3	234	Sim		
54	S54.4N	4	235	Sim	OXA-ERI-CLI-SUT-ENO-RIF-PEN-CIP-TET-GEN	2
	S54.4R	4	235	Sim		
	S54.4A	4	235	Sim		
55	S55.1R	1	246	Sim	OXA-ERI-CLI-SUT-RIF-PEN-TET-GEN	8
	S55.2A	2	247	Sim		
	S57.1A	1	260	Sim		
	S57.2N	2	261	Sim		
57	S57.4N	4	263	Sim	OXA-ERI-CLI-SUT-ENO-RIF-PEN-CIP-TET-GEN	2
	S57.4R	4	263	Sim		
	S57.4A	4	263	Sim		
59	S59.1R	1	261	Sim	OXA-ERI-CLI-SUT-RIF-PEN-TET	9

A: axilar; N: nasal; R: retal

*Dia UTI: Dia de internação do animal.

** Dia real: Dia do experimento, considerando o total de 264 dias.

5.2.3.6 Preditores para MRSP em cães internados na UTI do HV-UFGM

Alguns dados clínicos foram avaliados como possíveis fatores de risco para aquisição de estirpes MRSP na UTI do HV-UFGM. A Tabela 14 apresenta todas as variáveis que foram avaliadas. A frequência de isolados MRSP foi estatisticamente maior em cadelas ($p < 0,001$; $OR = 7,31$), cães idosos ($p = 0,016$; $OR = 2,64$) e em cães que fizeram uso prévio de antimicrobianos ($p = 0,017$; $OR = 2,53$).

Tabela 13 - Variáveis avaliadas como possíveis fatores de risco para aquisição de MRSP na UTI do HV-UFGM entre agosto de 2018 e abril de 2019.

Variável	Isolados MRSP	p-valor	OR
Sexo			
Machos	4/84 (5%)	< 0,001	7,31
Fêmeas	34/127 (27%)		
Porte			
Pequeno (P)	14/79 (18%)	PxM = 0,522; PxG = 0,656; MxG = 0,180	NA
Médio (M)	14/60 (23%)		
Grande (G)	10/72 (14%)		
Idade			
Jovem (≤ 12 meses) (J)	4/24 (17%)	(J+A) x I = 0,016	2,64
Adulto (> 12 e ≤ 84 meses) (A)	7/56 (13%)		
Idoso (> 84 meses) (I)	27/91 (30%)		
Convívio com outros animais			
Sim	31/119 (26%)	0,272	NA
Não	6/37 (16%)		
Comorbidade			
Sim	22/123 (18%)	1,0	NA
Não	16/88 (18%)		
Uso prévio de antimicrobianos			
Sim	24/74 (32%)	0,017	2,53
Não	11/69 (16%)		
Uso de antimicrobianos durante a internação			
Sim	26/155 (17%)	0,425	NA
Não	12/56 (21%)		
Uso de beta-lactâmicos durante a internação			
Sim	26/129 (20%)	0,706	NA
Não	12/71 (17%)		
Óbito			
Sim	1/20 (5%)	0,135	NA
Não	37/191 (19%)		

5.2.4 DISCUSSÃO

Durante aproximadamente nove meses de estudo, 82% dos cães admitidos na UTI do HV-UFMG estavam colonizados por *S. pseudintermedius* e 15,6% por MRSP. A ocorrência de *S. pseudintermedius* encontrada nos cães deste estudo condiz com os dados da literatura que variam de 40% a até mais de 90%, reafirmando a predileção dessa espécie pelo hospedeiro canino (Sasaki et al., 2007; Bannoehr e Guardabassi, 2012; Fungwithaya et al., 2017; Smith et al., 2020). Para MRSP, a frequência tem variado de 0 a 4,6% em cães saudáveis, seja na comunidade, ou em atendimentos em hospitais veterinários (Weese e Duijkeren, 2010; Gómez-Sanz et al., 2011; Kjellman et al., 2015). Para cães admitidos em UTI, apenas o estudo de Cocca et al. (2021), até o momento, relatou a frequência de 16,4% de MRSP neste local, um valor muito próximo do encontrado neste estudo e superior àquele encontrado em outros ambientes, o que realça a UTI como um recinto altamente propício para seleção e isolamento de estirpes multirresistentes a antimicrobianos, como MRSP.

Considerando o total de 501 amostras coletadas durante os diferentes dias de internação na UTI do HV-UFMG, 42,1% de isolados de *Staphylococcus* spp. foram obtidos, e destes, 71% foram identificados como *S. pseudintermedius*. Este agente foi recuperado de 45 (88,2%) dos 51 cães que obtiveram isolamento estafilocócico, tendo, ao menos, seis vezes mais chances de ser isolado que qualquer outra espécie identificada neste estudo ($p < 0,001$). De fato, cães são conhecidos como hospedeiros naturais dessa espécie, sendo comum encontrá-la em diversas mucosas desses animais (Griffeth et al., 2008; Bannoehr e Guardabassi, 2012; Paul et al., 2012). O presente estudo sugeriu, ainda, que a amostragem dos sítios nasal e retal apresentam maior probabilidade de isolamento que o sítio axilar, o que também é similar ao que é sugerido em trabalhos anteriores (Griffeth et al., 2008; Bannoehr e Guardabassi, 2012; Paul et al., 2012). Da mesma forma, a detecção de *S. aureus* também foi superior no sítio nasal, apresentando 5,6 vezes mais chances de isolamento neste sítio do que na soma dos demais ($p = 0,005$). Juntos, esses resultados sugerem que os sítios nasal e retal são de grande relevância para estudos sobre a dinâmica de colonização por *S. pseudintermedius* e *S. aureus* em cães (Griffeth et al., 2008; Weese e Duijkeren, 2010; Bannoehr e Guardabassi, 2012; Paul et al., 2012).

Ao avaliar a diversidade de espécies por sítio de coleta, o sítio axilar apresentou onze das doze espécies estafilocócicas isoladas, sendo estatisticamente maior que o número observado para o sítio nasal. Essa maior diversidade pode estar relacionada à contaminação da axila pelo

contato com o ambiente externo e, principalmente, pela manipulação do animal, que na grande maioria das vezes ocorre por este local (Perkins et al., 2020). Somado a isso, a grande maioria das espécies encontradas são comumente relatadas como colonizadoras de seres humanos (Becker et al., 2014), o que reforça a hipótese de contaminação e demonstra que o sítio axilar, além do baixo índice de isolamento, não é confiável para estudos de colonização.

Três em cada quatro isolados foram resistentes a pelo menos um dos antimicrobianos testados e quase metade foram MDR, incluindo 27% de isolados MRS. No estudo realizado por Cocca et al. (2021), a taxa de estafilococos MDR foi um pouco superior (58,2%), mas também muito próxima à observada neste estudo. A alta taxa de resistência a antimicrobianos identificada, inclusive, em estirpes MRS e MDR, era esperada, uma vez que UTIs são ambientes com amplo uso de antimicrobianos, o que é muito apropriado para seleção de microrganismos multirresistentes (Nienhoff et al., 2011a; Shoen et al., 2019).

Dentre todos os isolados MRS, 18% foram identificados como MRSP, tanto pela presença do gene *mecA*, quanto pela resistência à oxacilina, corroborando com as diretrizes do CLSI (2021). Já para MRSA (1,9%), apesar do resultado negativo para o gene *mecA*, as quatro estirpes apresentaram resistência à cefoxitina, penicilina e, no mínimo, mais duas classes diferentes de antimicrobianos, sendo designadas como amostras fenotipicamente resistentes à meticilina (CLSI, 2021). Neste contexto, é importante salientar que apesar de não ter sido detectado o gene *mecA* nestas estirpes, é bem provável que outro determinante de resistência da família deste gene esteja envolvido, como por exemplo, o gene *mecC*, já identificado em amostras MRSA de bovinos aqui no Brasil (Silva et al., 2021). No mais, além da preocupação com MRSP, a possível circulação de MRSA na UTI do HV-UFGM é extremamente alarmante, visto as graves implicações que este patógeno representa para os seres humanos (Shoen et al., 2019; Silva et al., 2020).

Alguns perfis de resistência de estirpes MRSP foram observados repetidas vezes ao longo dos 264 dias de experimento (Tabela 12). Seis diferentes perfis de resistência a antimicrobianos que se repetiram pelo menos uma vez no mesmo animal ou em animais diferentes foram observados (perfis 2, 3, 4, 6, 7 e 8). Dois deles (perfis 2 e 3) foram observados em dias diferentes e em animais diferentes. Curiosamente, os dois perfis foram verificados pela primeira vez no estudo no dia 13 e eram carreados pelo mesmo animal (5), sendo o perfil 2 isolado da narina e o 3 isolado do reto. O perfil 3 foi observado mais uma vez no dia 34, também no isolado retal de outro animal (10). Já o perfil 2 foi observado no isolado nasal do mesmo animal (5) no

segundo dia de internação (dia 14), e em mais cinco animais, sendo quatro deles após o terceiro dia de internação e um no primeiro dia de internação. Essas repetições tiveram início no 13º do estudo e foram observadas até o 263º dia de estudo. A aparição do perfil 2 durante todo o estudo, na maioria das vezes após o terceiro dia de internação, traz o questionamento se não se trata de uma estirpe MRSP clonal que poderia estar sendo transmitida dentro da UTI do HV-UFG. Alguns animais coabitaram a UTI durante a verificação desse perfil (Tabela 12), o que poderia indicar a transmissão entre pacientes. Porém, a perpetuação durante todo o estudo, gera a suspeita se esta estirpe estaria sendo compartilhada através de outros meios, como fômites, equipamentos e funcionários, como já descrito em ambientes hospitalares em outros trabalhos (Grönthal et al., 2014; Shoen et al., 2019; Cuny et al., 2022). Em um estudo recente, realizado por este mesmo grupo, abrangendo o mesmo período (2017-2020), estirpes MRSP do complexo clonal CC71 foram detectadas em cães com diferentes quadros infecciosos atendidos no HV-UFG (Viegas et al., 2022). Curiosamente, as estirpes identificadas tinham o mesmo perfil de resistência que foi observado nos cães da UTI durante todo este estudo, incluindo resistência a fluoroquinolonas – classe que está associada à disseminação bem-sucedida de linhagens MRSP MDR, incluindo MRSP CC 71 (McCarthy *et al.*, 2015; Viegas et al., 2022). No trabalho em questão, Viegas et al. (2022) afirma que a maioria das estirpes CC71 foram isoladas de infecções de sítios cirúrgicos provenientes do HV-UFG e sugere que uma possível transmissão nosocomial possa estar ocorrendo. Frente à semelhança entre os perfis de resistência, à aquisição tardia de MRSP com o perfil 2, às repetidas aparições durante todo o estudo e ao fato de que clones de MRSP foram identificados no mesmo período de realização deste estudo no HV-UFG, é altamente possível que os perfis de resistência idênticos encontrados na UTI sejam clones MRSP, e que transmissão nosocomial esteja ocorrendo neste ambiente (Grönthal *et al.*, 2014). Porém, a caracterização molecular destas estirpes é necessária para a comprovação desta hipótese.

Algumas análises foram feitas para avaliar a dinâmica de isolamento das estirpes MRSP na UTI do HV-UFG (Tabela 5). Neste estudo, foi observada uma relação linear significativa entre os dias de internação e a proporção de isolados MRSP em que, para cada dia de internação, observou-se um crescimento de 9,142% de isolados nesta proporção (Figura 10a). Para cães, a relação foi a mesma, em que, para cada dia de internação, observou-se um crescimento de 9,748% de cães positivos para MRSP nesta proporção (Figura 10b). A perpetuação de estirpes MRSP ao longo dos dias de internação na UTI do HV-UFG é justificável, pois os perfis de

resistência detectados são resistentes a praticamente todos os antimicrobianos utilizados na rotina veterinária. Dessa forma, a estirpe não é combatida e se perpetua ao longo dos dias de internação. (Viegas et al., 2022).

Outra relação avaliada foi se cães com estirpes MRSP resistentes a diferentes classes de antimicrobianos poderiam influenciar no tempo de internação dos animais. Nesta análise, foi observado que cães com estirpes MRSP pertencentes ao perfil 2 (Tabela 12) ficaram internados, em média, 6,4 dias, enquanto a média geral de todos os cães com outras estirpes MRSP foi 2,4 dias ($p = 0,09$). A predominância deste perfil nesta relação pode ser mais uma evidência de que se trata de estirpes clonais de dispersão bem-sucedida (Viegas et al., 2022). A caracterização destas estirpes é necessária para responder a estes questionamentos que, caso sejam confirmados, necessitam de um plano de controle para combater a transmissão e disseminação dessas bactérias, não apenas na UTI, mas em todo o ambiente do HV-UFMG (Figura 11).

Neste estudo também foram avaliadas variáveis que possivelmente seriam fatores de risco para a aquisição de estirpes MRSP na UTI do HV-UFMG. Neste ínterim, fêmeas, cães idosos (<7 anos) e uso prévio de antimicrobianos foram detectados como fatores de risco para aquisição de MRSP na UTI. O uso prévio de antimicrobianos é um fator de risco frequentemente detectado em estudos com estirpes MRSP realizados em ambientes hospitalares (Walther et al., 2017; Shoen et al., 2019), sendo também identificado recentemente por Viegas et al. (2022) no HV-UFMG em atendimentos clínicos de cães infectados por *Staphylococcus* spp. A maior probabilidade de colonização em cães idosos não foi descrita anteriormente como fator de risco para aquisição de MRSP, mas algumas circunstâncias poderiam justificar esse achado, como a maior propensão destes indivíduos à imunossupressão e, conseqüentemente, à predisposição a doenças, assim como à maior ocorrência de terapias recorrentes e internações hospitalares (Pereira et al., 2019). Em relação a ser fêmea, nenhum outro estudo identificou esta variável como fator de risco. É possível que fêmeas sejam mais susceptíveis que machos por questões fisiológicas relacionadas às fases do ciclo estral, uma vez que na fase progesterônica, assim como nas gestações, as fêmeas são mais suscetíveis à infecção/colonização por microrganismos devido à redução da atividade leucocitária e conseqüente imunossupressão (Feldman e Nelson, 2003).

Este foi o primeiro estudo a avaliar a frequência, resistência antimicrobiana e dinâmica de colonização de estirpes MRSP em cães internados em UTI no Brasil. Os achados descrevem altas taxas de *Staphylococcus* spp. MDR e sugere que clones podem estar circulando e sendo

transmitidos neste ambiente. Caracterização molecular das estirpes encontradas é necessária para confirmação das hipóteses levantadas, para que, caso sejam confirmadas, um plano de controle de infecção e monitoramento seja implementado para combater a disseminação da resistência a antimicrobianos na UTI do HV-UFMG.

5.2.5 AGRADECIMENTOS

Agradecemos às agências de fomento CNPq, Fapemig, CAPES, PRPq-UFMG e INCT. Agradecimentos a todos os colaboradores da Escola de Veterinária pela coleta de amostras.

5.2.6 REFERÊNCIAS

- ASSIS, G.B.N.; PEREIRA, F.L.; ZEGARRA, A.U.; TAVARES, G.C.; LEAL, C.A.; FIGUEIREDO, H.C.P. Use of MALDI-TOF Mass Spectrometry for the Fast Identification of Gram-Positive Fish Pathogens. *Frontiers in Microbiology*, v.8, p.1492, 2017. DOI: 10.3389/fmicb.2017.01492.
- BANNOEHR, J.; GUARDABASSI, L. *Staphylococcus pseudintermedius* in the dog: taxonomy, diagnostics, ecology, epidemiology and pathogenicity. *Veterinary Dermatology*, v.23, p.253-e52, 2012. DOI: 10.1111/j.1365-3164.2012.01046.x.
- BECKER, K.; HEILMANN, C.; PETERS, G. Coagulase-negative staphylococci. *Clinical Microbiology Reviews*, v.27, p.870–926, 2014. DOI: 10.1128/CMR.00109-13.
- BERGSTRÖM, A.; GUSTAFSSON, C.; LEANDER, M.; FREDRIKSSON, M.; GRÖNLUND, U.; TROWALD-WIGH, G. Occurrence of methicillin-resistant Staphylococci in surgically treated dogs and the environment in a Swedish animal hospital. *Journal of Small Animal Practice*, v.53, p.404–410, 2012. DOI: 10.1111/j.1748-5827.2012.01238.x.
- 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.
- COCCA, G.; PIVA, S.; MAGNO, S.D.; SCARPELLINI, R.; GIACOMETTI, F.; SERRAINO, A.; GIUNTI, M. Prevalence and Patterns of Antimicrobial Resistance among *Escherichia coli* and *Staphylococcus* spp. in a Veterinary University Hospital. *Veterinary Sciences*, v.8, p.308, 2021. DOI: 10.3390/vetsci8120308.
- CUNY, C.; LAYER-NICOLAOU, F.; WEBER, R.; KÖCK, R.; WITTE, W. Colonization of Dogs and Their Owners with *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus pseudintermedius* in Households, Veterinary Practices, and Healthcare Facilities. *Microorganisms*, v.10, p.677, 2022. DOI: 10.3390/microorganisms10040677.
- FELDMAN, E. C.; NELSON, R. W. Canine and feline endocrinology and reproduction. 3. ed. Philadelphia: Willians & Wilkins, 1344 p. 2003
- FOX, J.G.; GE, Z.; WHARY, M.T.; ERDMAN, S.E.; HORWITZ, B.H. *Helicobacter hepaticus* infection in mice: models for understanding lower bowel inflammation and cancer. *Mucosal Immunology*, v.4, p.22–30, 2011. DOI: 10.1038/mi.2010.61.
- FUNGWITHAYA, P.; BRIKSHAVANA, P.; CHANCHAITHONG, P.; PRAPASARAKUL, N. Distribution of methicillin-resistant coagulase-positive staphylococci (MRCoPS) in a surgical unit and cystotomy operation sites in a veterinary teaching hospital. *Journal of Veterinary Medical Science*, v.79, p.359–365, 2017. DOI: 10.1292/jvms.16-0146.

GÓMEZ-SANZ, E.; TORRES, C.; LOZANO, C.; SÁENZ, Y.; ZARAZAGA, M. Detection and characterization of methicillin-resistant *Staphylococcus pseudintermedius* in healthy dogs in La Rioja, Spain. **Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases**, v.34, p.447–453, 2011. DOI: 10.1016/j.cimid.2011.08.002.

GRIFFETH, Gregory C. et al. Screening for skin carriage of methicillin-resistant coagulasepositive staphylococci and *Staphylococcus schleiferi* in dogs with healthy and inflamed skin. *Veterinary Dermatology*, v. 19, n. 3, p. 142–149, 2008.

GRÖNTHAL, T.; MOODLEY, A.; NYKÄSENOJA, S.; JUNNILA, J.; GUARDABASSI, L.; THOMSON, K.; RANTALA, M. Large Outbreak Caused by Methicillin Resistant *Staphylococcus pseudintermedius* ST71 in a Finnish Veterinary Teaching Hospital – From Outbreak Control to Outbreak Prevention. **PLoS ONE**, v.9, 2014. DOI: 10.1371/journal.pone.0110084.

HAMILTON, E.; KANEENE, J.B.; MAY, K.J.; KRUGER, J.M.; SCHALL, W.; BEAL, M.W.; HAUPTMAN, J.G.; DECAMP, C.E. Prevalence and antimicrobial resistance of *Enterococcus* spp. and *Staphylococcus* spp. isolated from surfaces in a veterinary teaching hospital. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v.240, p.1463–1473, 2012. DOI: 10.2460/javma.240.12.1463.

ISHIHARA, K.; UENO, H.; MURAMATSU, Y.; KADOSAWA, T.; YANAGISAWA, C.; HANAKI, H.; NAKAJIMA, C.; SUZUKI, Y.; TAMURA, Y. Occurrence and Molecular Characteristics of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* and Methicillin-Resistant *Staphylococcus pseudintermedius* in an Academic Veterinary Hospital. **Applied and Environmental Microbiology**, v.76, p.5165–5174, 2010. DOI: 10.1128/AEM.02780-09.

KJELLMAN, E.E.; SLETTEMEÅS, J.S.; SMALL, H.; SUNDE, M. Methicillin-resistant *Staphylococcus pseudintermedius* (MRSP) from healthy dogs in Norway - occurrence, genotypes and comparison to clinical MRSP. **Microbiology Open**, v.4, p.857–866, 2015. DOI: 10.1002/mbo3.258.

LEHNER, G.; LINEK, M.; BOND, R.; LLOYD, D.H.; PRENGER-BERNINGHOFF, E.; THOM, N.; STRAUBE, I.; VERHEYEN, K.; LOEFFLER, A. Case–control risk factor study of methicillin-resistant *Staphylococcus pseudintermedius* (MRSP) infection in dogs and cats in Germany. **Veterinary Microbiology**, v.168, p.154–160, 2014. DOI: 10.1016/j.vetmic.2013.10.023.

MCCARTHY, A.J.; HARRISON, E.M.; STANCZAK-MROZEK, K.; LEGGETT, B.; WALLER, A.; HOLMES, M.A.; LLOYD, D.H.; LINDSAY, J.A.; LOEFFLER, A. Genomic insights into the rapid emergence and evolution of MDR in *Staphylococcus pseudintermedius*. *The Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, v.70, p.997–1007, 2015. DOI: 10.1093/jac/dku496.

MURAKAMI, K.; MINAMIDE, W.; WADA, K.; NAKAMURA, E.; TERAOKA, H.; WATANABE, S. Identification of methicillin-resistant strains of staphylococci by polymerase chain reaction. **Journal of Clinical Microbiology**, v.29, p.2240–2244, 1991. DOI: 10.1128/JCM.29.10.2240-2244.1991.

NIENHOFF, U.; KADLEC, K.; CHABERNY, I.F.; VERSPOHL, J.; GERLACH, G.-F.; KREIENBROCK, L.; SCHWARZ, S.; SIMON, D.; NOLTE, I. Methicillin-resistant *Staphylococcus pseudintermedius* among dogs admitted to a small animal hospital. **Veterinary Microbiology**, v.150, p.191–197, 2011a. DOI: 10.1016/j.vetmic.2010.12.018.

NIENHOFF, U.; KADLEC, K.; CHABERNY, I.F.; VERSPOHL, J.; GERLACH, G.-F.; SCHWARZ, S.; KREIENBROCK, L.; NOLTE, I.; SIMON, D. Methicillin-resistant *Staphylococcus pseudintermedius* among cats admitted to a veterinary teaching hospital. **Veterinary Microbiology**, v.153, p.414–416, 2011b. DOI: 10.1016/j.vetmic.2011.05.045.

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.

PEREIRA, M.; VALÉRIO-BOLAS, A.; SARAIVA-MARQUES, C.; ALEXANDRE-PIRES, G.; PEREIRA DA FONSECA, I.; SANTOS-GOMES, G. Development of Dog Immune System: From in Uterus to Elderly. **Veterinary Sciences**, v.6, p.E83, 2019. DOI: 10.3390/vetsci6040083.

PERKINS, A.V.; SELTON, D.C.; GAY, J.M.; LOFGREN, E.T.; MOORE, D.A.; JONES, L.P.; DAVIS, M.A. Prevalence of methicillin-resistant *Staphylococcus pseudintermedius* on hand-contact and animal-contact surfaces in companion animal community hospitals. **The Canadian Veterinary Journal**, v.61, p.613–620, 2020.

PITCHER, D.G.; SAUNDERS, N.A.; OWEN, R.J. Rapid extraction of bacterial genomic DNA with guanidium thiocyanate. **Letters in Applied Microbiology**, v.8, p.151–156, 1989. DOI: 10.1111/j.1472-765X.1989.tb00262.x.

QEKWANA, D.N.; OGUTTU, J.W.; SITHOLE, F.; ODOI, A. Patterns and predictors of antimicrobial resistance among *Staphylococcus* spp. from canine clinical cases presented at a veterinary academic hospital in South Africa. **BMC Veterinary Research**, v.13, p.116, 2017. DOI: 10.1186/s12917-017-1034-3.

SASAKI, T.; KIKUCHI, K.; TANAKA, Y.; TAKAHASHI, N.; KAMATA, S.; HIRAMATSU, K. Methicillin-Resistant *Staphylococcus pseudintermedius* in a Veterinary Teaching Hospital. **Journal of Clinical Microbiology**, v.45, p.1118–1125, 2007. DOI: 10.1128/JCM.02193-06.

SASAKI, T.; KIKUCHI, K.; TANAKA, Y.; TAKAHASHI, N.; KAMATA, S.; HIRAMATSU, K. Reclassification of Phenotypically Identified *Staphylococcus intermedius* Strains. **Journal of Clinical Microbiology**, v.45, p.2770–2778, 2007. DOI: 10.1128/JCM.00360-07.

SASAKI, T.; TSUBAKISHITA, S.; TANAKA, Y.; SAKUSABE, A.; OHTSUKA, M.; HIROTAKI, S.; KAWAKAMI, T.; FUKATA, T.; HIRAMATSU, K. Multiplex-PCR method for species identification of coagulase-positive staphylococci. **Journal of Clinical Microbiology**, v.48, p.765–769, 2010. DOI: 10.1128/JCM.01232-09.

SHOEN, H.R.C.; ROSE, S.J.; RAMSEY, S.A.; MORAIS, H. DE; BERMUDEZ, L.E. Analysis of *Staphylococcus* infections in a veterinary teaching hospital from 2012 to 2015. **Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases**, v.66, p.101332, 2019. DOI: 10.1016/j.cimid.2019.101332.

SILVA, J.G.; ARAUJO, W.J.; LEITE, E.L.; DIAS, L.M.; VASCONCELOS, P.C.; SILVA, N.M.V.; OLIVEIRA, R.P.; SENA, M.J.; OLIVEIRA, C.J.B.; MOTA, R.A. First report of a livestock-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* ST126 harbouring the *mecC* variant in Brazil. **Transboundary and Emerging Diseases**, v.68, p.1019–1025, 2021. DOI: 10.1111/tbed.13771.

SMITH, J.T.; AMADOR, S.; MCGONAGLE, C.J.; NEEDLE, D.; GIBSON, R.; ANDAM, C.P. Population genomics of *Staphylococcus pseudintermedius* in companion animals in the United States. **Communications Biology**, v.3, p.1–11, 2020. DOI: 10.1038/s42003-020-1009-y.

STULL, J.W.; BJORVIK, E.; BUB, J.; DVORAK, G.; PETERSEN, C.; TROYER, H.L. 2018 AAHA Infection Control, Prevention, and Biosecurity Guidelines. *Journal of the American Animal Hospital Association*, v.54, p.297–326, 2018. DOI: 10.5326/JAAHA-MS-6903.

SWEENEY, M.T.; LUBBERS, B.V.; SCHWARZ, S.; WATTS, J.L. Applying definitions for multidrug resistance, extensive drug resistance and pandrug resistance to clinically significant livestock and companion animal bacterial pathogens. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, v.73, p.1460–1463, 2018. DOI: 10.1093/jac/dky043. WALTHER, B.; TEDIN, K.; LÜBKE-BECKER, A. Multidrug-resistant opportunistic pathogens challenging veterinary infection control. **Veterinary Microbiology**, v.200, p.71–78, 2017. DOI: 10.1016/j.vetmic.2016.05.017.

VIEGAS, F.M.; SANTANA, J.A.; SILVA, B.A.; XAVIER, R.G.C.; BONISSON, C.T.; CÂMARA, J.L.S.; RENNÓ, M.C.; CUNHA, J.L.R.; FIGUEIREDO, H.C.P.; LOBATO, F.C.F.; SILVA, R.O.S. Occurrence and characterization of methicillin-resistant *Staphylococcus* spp. in diseased dogs in Brazil. *PLOS ONE*, v.17, p.e0269422, 2022. DOI: 10.1371/journal.pone.0269422. WEESE, J.S.; DUIJKEREN, E. VAN. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus pseudintermedius* in veterinary medicine. **Veterinary Microbiology**, v.140, p.418–429, 2010. DOI: 10.1016/j.vetmic.2009.01.039.

6. CAPÍTULO 2: Diversidade e resistência a antimicrobianos em *Staphylococcus* spp. de animais silvestres de diferentes origens

RESUMO

Sabe-se que animais silvestres, sobretudo sinantrópicos, podem atuar como vetores de microrganismos causadores de infecção em seres humanos, incluindo bactérias do gênero *Staphylococcus*. Em adição, cada vez mais têm-se discutido o papel de animais silvestres como reservatórios de microrganismos multirresistentes a antimicrobianos, outro ponto de grande relevância para saúde pública. No presente trabalho, a colonização por *Staphylococcus* spp. e a resistência a antimicrobianos dos isolados foi investigada em columbiformes, roedores, marsupiais, répteis (jabutis) e carnívoros silvestres. Amostras desses animais foram plaqueadas em ágar manitol salgado para isolamento de estafilococos e a identificação de espécies foi realizada utilizando MALDI-TOF MS, PCR do gene *nuc* e sequenciamento dos genes *16S rRNA* e *rpoB*, quando necessário. A susceptibilidade antimicrobiana foi avaliada pelo método de disco-difusão em ágar, e a presença do gene *mecA* foi investigada por PCR para detectar a resistência à meticilina. *S. xylosus*, *S. sciuri* e *S. saprophyticus* foram as espécies mais encontradas em columbiformes, jabutis e roedores, respectivamente. Uma alta frequência de espécies de *Staphylococcus* do grupo *S. intermedius* (SIG) foram encontrados em quatis (*S. delphini*) e lobos-guarás (*S. pseudintermedius*). Com exceção dos jabutis, isolados de *Staphylococcus* spp. multirresistentes (MDR) foram encontrados em todas as espécies trabalhadas, variando de 4,7% em carnívoros a 10,8% em roedores. O presente trabalho revelou a presença de *Staphylococcus* spp. comumente envolvidos em quadros de infecção em seres humanos em diversas espécies, sobretudo em roedores. Dois novos hospedeiros naturais do SIG foram encontrados, o que pode ajudar a elucidar a epidemiologia desse grupo de grande relevância. Já a detecção de estirpes multirresistentes enfatiza o papel de diferentes espécies silvestres como reservatórios de genes de resistência a antimicrobianos.

Palavras-chave: multirresistência a antimicrobianos; roedores; pombos; carnívoros; répteis

6.1 INTRODUÇÃO

O crescimento da resistência a antimicrobianos (RAM), uma séria ameaça à saúde humana e animal, é comumente associado ao uso indevido ou inadequado de antimicrobianos. No entanto, um aumento significativo de relatos de RAM em bactérias isoladas de ambientes e animais não expostos a estes agentes tem sido observado, sendo a transferência horizontal de genes apontada como uma explicação para este fenômeno (Laborda et al., 2022). Neste contexto, os estafilococos são conhecidos como excelentes portadores e transmissores de genes de resistência (Otto, 2013; Becker et al., 2014), que podem, também, causar uma grande variedade de infecções oportunistas em seres humanos e animais (Wieler et al., 2011; Walther et al., 2017; Heilmann et al., 2019). Porém, pouco se sabe sobre a colonização e perfil de resistência a antimicrobianos destas bactérias em grande parte dos animais, principalmente, nos animais silvestres que, atualmente, estão cada vez mais inseridos nos ambientes urbanos.

Nas últimas décadas, ambientes urbanos ao redor do mundo têm apresentado um crescimento exponencial das populações de animais sinantrópicos, tais como pombos e roedores, já conhecidos por transportar e transmitir uma ampla gama de patógenos zoonóticos (Tarsitano et al., 2010; Perez-Sancho et al., 2020). Diante disso, é notório que o contato próximo com estes animais e suas fezes representa um risco para aqueles que frequentam e compartilham do mesmo ambiente (Rocha-e-Silva et al., 2014; Matias et al., 2018). Atualmente, este é o cenário para seres humanos e animais presentes em algumas áreas urbanas de Belo Horizonte, como o Hospital Veterinário da UFMG (HV-UFMG), no qual a quantidade de pombos da espécie *Columbia livia* tem aumentado acentuadamente nos últimos anos, e os parques municipais, onde uma alta densidade de espécies de roedores interagem direta e indiretamente com a população (Spinelli et al., 2010; Silva et al., 2014; Torres-Mejía et al., 2018). Apesar da grande relevância, estudos sobre estafilococos e RAM nestas espécies são limitados (Himsworth et al., 2014; Ge et al., 2019), pois a maioria deles é direcionada à investigação em seres humanos e animais domésticos. Porém, em geral, sabe-se que os sinantrópicos podem atuar como reservatórios para bactérias resistentes a antimicrobianos, transmitindo e disseminando estes microrganismos por diferentes rotas, incluindo fezes e urina (Jahan et al., 2020).

Em adição a espécies sinantrópicas, sabe-se que espécies com hábitos generalistas, tais como marsupiais e quatis, são também relevantes nesta cadeia, pois são encontrados próximos

uns dos outros e em alta densidade na maioria dos centros urbanos (Spinelli et al., 2010; Silva et al., 2014; Torres-Mejía et al., 2018). Os quatis (*Nasua nasua*) são procionídeos com hábitos generalistas, da ordem Carnívora, e estão amplamente distribuídos no continente sul-americano. Estes animais são facilmente vistos em pequenas áreas florestais, inclusive no Parque Municipal das Mangabeiras, também localizado em Belo Horizonte, Minas Gerais (Beisiegel, 2001; Spinelli et al., 2010). Este parque é cercado por uma área urbana e, com densidade maior do que a registrada em ambientes naturais (Hemetrio, 2011), os quatis são comumente vistos alimentando-se das lixeiras do local, assim como em casas e estabelecimentos comerciais próximos. Devido à visível pressão antrópica e ao amplo potencial destes animais como transmissores de doenças infecciosas para a comunidade, alguns estudos com diferentes patógenos já foram realizados (Silva et al., 2014; Silva et al., 2016; Costa et al., 2018; Almeida et al., 2020; Estevam et al., 2020). Entretanto, *Staphylococcus* spp., um gênero de grande importância para a saúde humana e veterinária, ainda não foi avaliado.

Em contraste com os sinatrópicos e os quatis, os carnívoros silvestres estão sob crescente ameaça de redução de populações (Chiarello et al., 2008). De acordo com a Lista Vermelha de Espécies Ameaçadas da IUCN (International Union for Conservation of Nature), o lobo-guará (*Chrysocyon brachyurus*) e a onça-pintada (*Panthera onca*) são atualmente classificadas como espécies quase ameaçadas, enquanto outras, como o leão (*Panthera leo*), já são consideradas vulneráveis (Paula et al., 2015; Bauer et al., 2016; Quigley et al., 2017). Esta situação acaba levando à reprodução de espécimes destas espécies em cativeiro, tais como parques e zoológicos, aumentando ainda mais o contato com seres humanos e, conseqüentemente, a possibilidade de transmissão mútua de microrganismos zoonóticos e, até mesmo, resistentes a antimicrobianos, como *Staphylococcus* spp. (Feßler et al., 2018). Apesar disso, pouco se sabe sobre a epidemiologia desta bactéria na maioria das espécies de felídeos e canídeos silvestres, sendo a literatura limitada a poucos relatos de casos clínicos (Jee et al., 2007; Esson et al., 2019; Yang et al., 2022).

Nas últimas décadas, houve ainda um aumento global na adoção de répteis como animais de companhia. De acordo com dados do último censo, o Brasil tem a nona maior população de répteis do mundo (IBGE, 2013). Esses pets não convencionais, especialmente jabutis e cágados, ganharam popularidade devido à sua aparência e natureza agradável (Hossain et al., 2020). Apesar desta crescente popularidade, estudos têm demonstrado que estes animais representam uma ameaça potencial à saúde pública (CDC, 2019; Ramos et al., 2019). Répteis

podem atuar como reservatórios e disseminadores potenciais de microrganismos patogênicos, incluindo *Salmonella* spp., *E. coli* patogênica, e *Leptospira* spp., e podem, também, contribuir para a disseminação de genes de resistência a antimicrobianos (Ebani, 2017; Ramos et al., 2019). Apesar disso, são raros os estudos sobre estafilococos isolados de répteis saudáveis e a maioria destes não avaliou a resistência a antimicrobianos dos isolados (Taddei et al., 2010; Di Ianni et al., 2015; Oriá et al., 2015; Cardoso-Brito et al., 2019).

É evidente e preocupante a limitação de estudos sobre colonização e perfil de resistência a antimicrobianos de estafilococos na vida selvagem, uma vez que estes animais estão cada vez mais inseridos nos ambientes urbanos e submetidos, direta ou indiretamente, à atividade antrópica. Conhecer as diferentes espécies de estafilococos que os colonizam, assim como a carga de resistência que carregam, pode levar ao entendimento do potencial risco que representam para a comunidade e à provisão de medidas de controle e prevenção, caso seja necessário. Afinal, grande parte dos estafilococos já foi relatada em infecções oportunistas, muitas vezes multirresistentes, na saúde humana e animal. Assim, com o intuito de ampliar os conhecimentos acerca da diversidade e resistência a antimicrobianos de *Staphylococcus* spp. em animais silvestres, o presente estudo teve como objetivo avaliar a frequência, distribuição e padrão de resistência a antimicrobianos de espécies estafilocócicas isoladas de pombos, roedores, quatis, felídeos, canídeos e jabutis de Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil.

6.2 MATERIAL E MÉTODOS

6.2.1 Amostras

6.2.1.1 Amostras de pombos (*Columbia livia*)

Este estudo foi realizado no HV-UFMG, um hospital que recebe cerca de 35.000 animais por ano, incluindo cães, gatos, equinos, gado e espécies selvagens. Embora esteja situado em Belo Horizonte, está localizado dentro da universidade e cercado por uma grande área de vegetação natural (Figura 12). O estudo foi motivado pelo aumento da população de pombos nos últimos anos nos arredores do HV-UFMG, levantando a necessidade de entender melhor os riscos associados a estes animais. Ao invés de suaves, fezes foram escolhidas como material para isolamento devido à grande quantidade de excretas a que todos estão

constantemente expostos neste ambiente. Após três campanhas de captura (janeiro/2019, julho/2019 e janeiro/2020), um total de 47 pombos (*Columba livia*) foram amostrados. Os animais foram capturados por redes durante as primeiras manhãs, no local de alimentação dos grandes animais. Após a contenção física, eles receberam anéis coloridos para fins de identificação e monitoramento, e aspectos relativos à sua saúde foram avaliados por um veterinário experiente. Os pombos foram deixados em repouso entre a captura e a manipulação, onde fezes frescas foram coletadas das gaiolas individuais imediatamente após a queda, e transferidas para microtubos estéreis. As gaiolas foram limpas com água e sabão, desinfetadas com hipoclorito de sódio a 2,5% e também tiveram a cobertura plástica descartável do piso trocada para cada animal, para evitar contaminação. Todas as amostras foram armazenadas em uma caixa de transporte com gelo e enviadas dentro de duas horas para o Laboratório de Bacterioses e Pesquisa da Escola de Veterinária da UFMG, para processamento imediato. Este estudo foi aprovado pela CEUA da UFMG sob o protocolo 361/2018 e pelo Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade (ICMBio) sob o protocolo 66535-2.

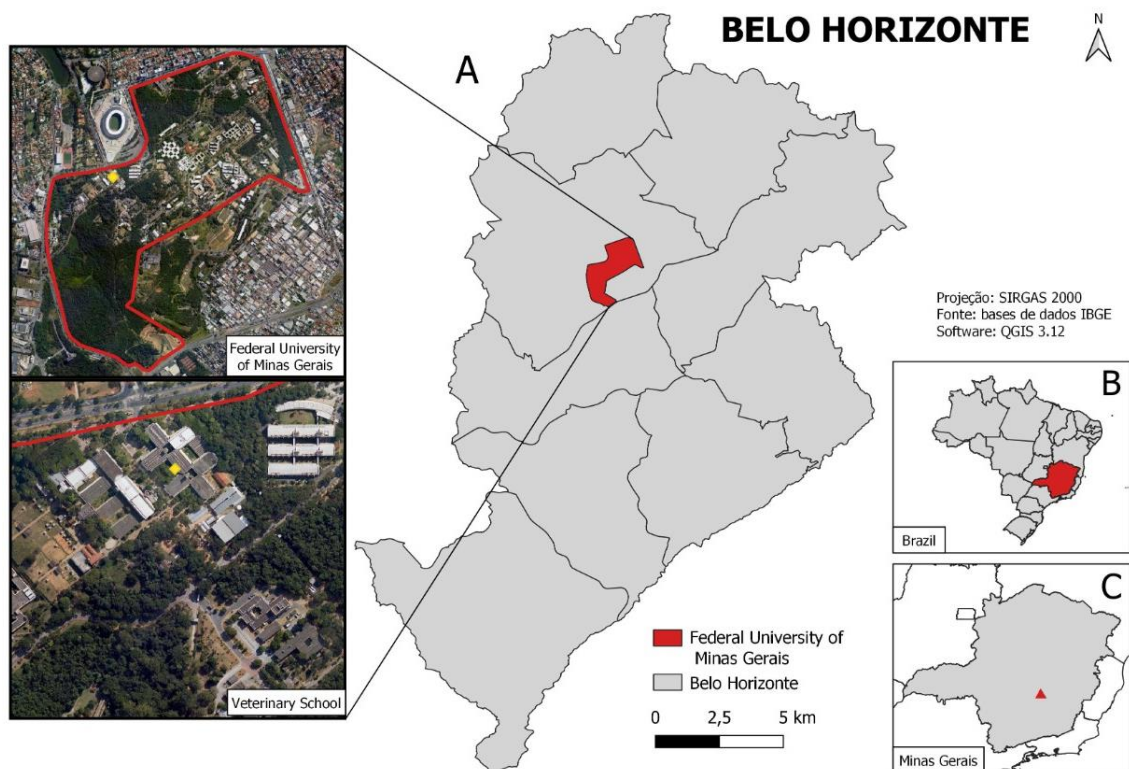


Figura 12 - Mapeamento do HV-UFMG na cidade de Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil. **A.** Mapa de Belo Horizonte com a localização da escola veterinária da UFMG. **B.** Mapa do Brasil com a localização do estado de Minas Gerais. **C.** Mapa do estado de Minas Gerais com a localização de Belo Horizonte.

6.2.1.2 Amostras de roedores e marsupiais de vida livre

A captura foi realizada em dois parques urbanos em Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil. O Parque 1, chamado "Parque Municipal Jacques Cousteau" (19°58' S e 43°59' O), possui uma área total de 335 mil metros quadrados. O Parque 2, "Parque Municipal das Mangabeiras" (19°56' S e 43°54' O), tem uma área total de 2,4 milhões de metros quadrados (Figura 13). Estes parques servem como centros de recreação e áreas de lazer para a população e, geralmente, recebem um grande número de visitantes todos os dias ao longo do ano. O Parque 1 está localizado completamente dentro da cidade. O espaço funcionou como um aterro para Belo Horizonte durante vinte anos (1951-1971), e depois foi transformado em um parque e jardim hortícola para a produção de mudas de árvores e plantas utilizadas para paisagismo. O local possui nascentes e cursos de água perenes que são impactados pelos efluentes de esgoto da cidade (Parque Municipal Jacques Cousteau, 2019). O Parque 2 é considerado um dos maiores parques urbanos do Brasil, com, aproximadamente, vinte mil visitantes por mês. Está localizado em uma área urbana em contato com alguns bairros, mas é cercado por vegetação nativa e outras áreas de preservação ambiental. Possui nascentes de água ao redor e em todo o seu percurso, mas os cursos não são impactados por águas residuais (Parque Municipal das Mangabeiras, 2020).

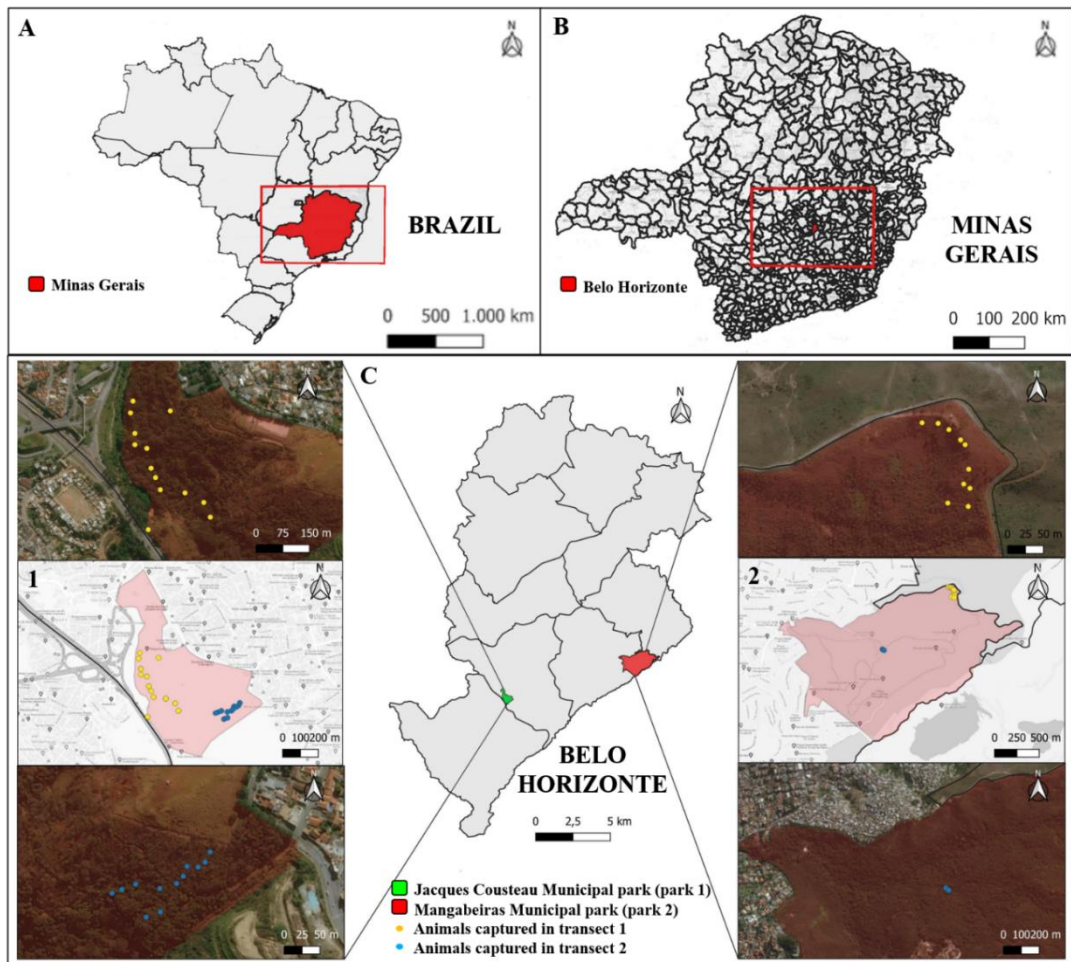


Figura 13 - Mapeamento dos parques 1 e 2 localizados na cidade de Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil. **A.** Mapa do Brasil com a localização do estado de Minas Gerais. **B.** Mapa do estado de Minas Gerais com a localização de Belo Horizonte. **C1.** Parque Municipal Jacques Cousteau (parque 1). **C2.** Parque Municipal de Mangabeiras (parque 2). Os pontos amarelos e azuis representam os locais onde os animais foram capturados nos transectos 1 e 2, respectivamente.

Um total de 159 animais de vida livre, incluindo 136 roedores e 23 marsupiais, foram amostrados entre abril de 2018 e março de 2019 (Tabela 16). Assim como para os pombos, fezes foram escolhidas como espécime para isolamento, uma vez que os visitantes dos parques normalmente estão mais expostos às excretas do que aos próprios animais. Para a captura, foram estabelecidos dois transectos para o Parque 1 e três transectos para o Parque 2. Cada transecto havia quinze estações de coleta separadas uma da outra em 20 metros. As estações continham uma armadilha Sherman para captura de pequenos roedores e marsupiais e uma armadilha com isca suspensa para captura de animais maiores, totalizando trinta armadilhas em cada transecto. Cada transecto foi inspecionado uma vez por dia. A isca utilizada era uma mistura de sardinhas, amendoins, bananas e farelo de milho. As armadilhas foram iscadas no momento do

levantamento, pela manhã, entre 08:00 e 09:00, em cada dia de coleta. As coletas ocorreram durante cinco dias consecutivos, a cada dois meses, totalizando seis campanhas em cada parque, durante um período de um ano. Após a captura, os animais foram pesados. Foram, então, sedados com uma combinação de xilazina 2% (roedores, 10 mg/kg, IP; marsupiais, 5 mg/kg, IM) e cloridrato de cetamina (roedores, 100 mg/kg, IP; marsupiais, 25 mg/kg, IM). Após a sedação, foram coletadas amostras fecais diretamente da ampola retal dos marsupiais. Estes animais receberam marcações auriculares para evitar a coleta de múltiplas amostras do mesmo animal e liberados no mesmo local de captura. Os roedores foram eutanasiados com uma overdose de propofol (10 mg/kg) pela via intracardíaca, e o conteúdo intestinal foi coletado do reto (fezes) durante a necropsia. As amostras fecais foram inseridas em microtubos estéreis, armazenadas em uma caixa de transporte com gelo e transportadas para o Laboratório de Bacterioses e Pesquisa da Escola Veterinária da UFMG, onde foram armazenadas a -80 °C até o processamento. Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Uso Animal (CEUA) da UFMG sob o protocolo 306/2017 e pelo Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade (ICMBio) sob o protocolo 12989-2.

6.2.1.3 Amostras de quatis (*Nasua nasua*)

A captura dos quatis também foi realizada no Parque Municipal das Mangabeiras (19°56' S e 43°53' O), em Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil (Figura 14). Foram amostrados 55 quatis de vida livre, onze em março de 2019 e 44 entre janeiro e julho de 2021. A captura ocorreu através de armadilhas de ferro galvanizado do tipo Tomahawk® iscadas com bananas. Cinco armadilhas foram colocadas em cinco pontos estratégicos de passagem dos animais e foram referenciadas geograficamente por GPS (Figura 15). Após a captura, os animais receberam aplicação intramuscular do medicamento Zoletil® 100 (Virbac®, cloridrato de tiletamina e cloridrato de zolazepam - 7 a 10 mg/kg) (Teixeira e Ambrosio, 2014) e receberam um implante subcutâneo de microchip na região interescapular e um brinco de polipropileno numerado. Após identificação, foram coletadas amostras de suabes retais, que foram inseridas em microtubos estéreis, armazenadas em uma caixa de transporte com gelo e transportadas para o Laboratório de Bacterioses e Pesquisa da Escola de Veterinária da UFMG. Este estudo foi aprovado pela CEUA da UFMG sob o protocolo 100/21, pelo Sistema de Autorização e

Informação em Biodiversidade (SISBIO) sob o protocolo 75831 e pela Fundação de Parques Municipais de Belo Horizonte sob o protocolo FU 004-2020.

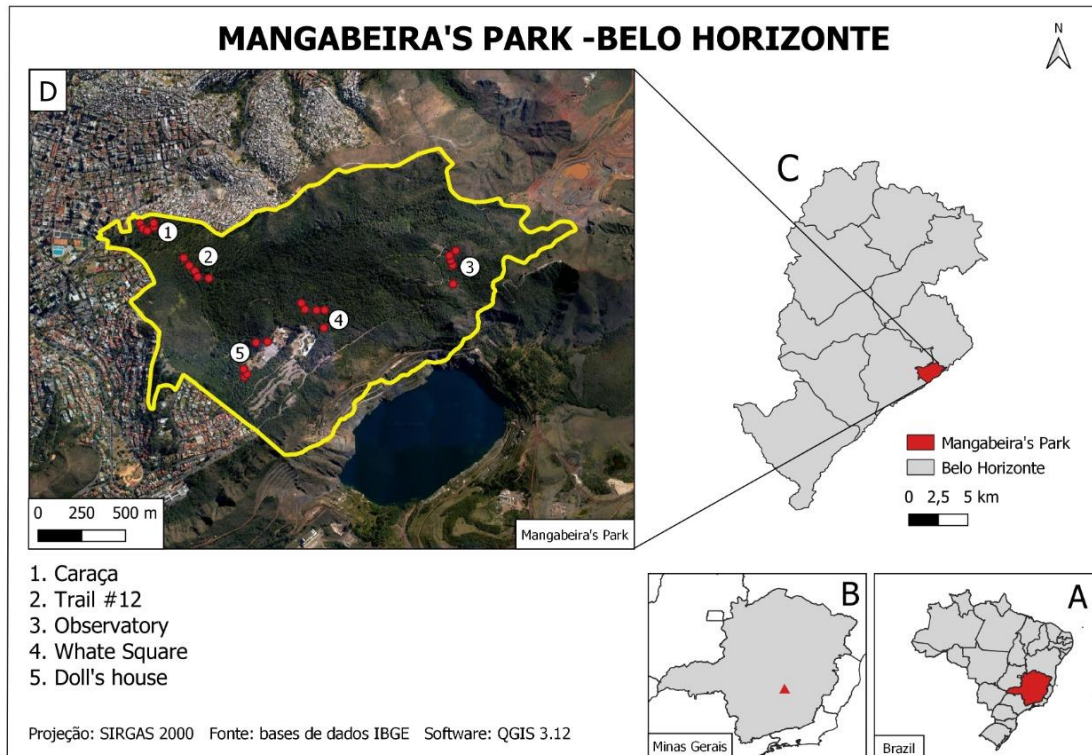


Figura 14 - Localização do Parque Municipal das Mangabeiras (Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil) e distribuição das armadilhas (pontos vermelhos) para capturar os quatis (*Nasua nasua*) no Parque Municipal das Mangabeiras, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil.

6.2.1.4 Amostras de canídeos e felídeos silvestres do Zoológico de Belo Horizonte

Os dez animais amostrados para este estudo foram provenientes do Zoológico de Belo Horizonte, Minas Gerais. Eles eram mantidos em recintos de acordo com a biologia e o manejo reprodutivo da espécie. Os lobos-guarás (*C. brachyurus*) (n=7) eram mantidos separados em seis recintos: um para cada adulto (n=5) e um para os jovens (n=2). Um dos adultos era uma fêmea recém-chegada ao recinto, que foi gravemente ferida devido a uma colisão de carro, e estava sob os cuidados clínicos e cirúrgicos do Zoológico de Belo Horizonte e da UFMG, quando as amostras foram coletadas. O leão (*P. leo*) (n=1) e as onças-pintadas (*P. onca*) (n=2), todos adultos, eram mantidos separados em dois recintos. Todos os indivíduos de *P. leo* e *P. onca* foram quimicamente contidos pelos veterinários do Zoológico de Belo Horizonte. Um macho adulto de *C. brachyurus* também foi quimicamente contido para exames de rotina e coleta de amostras. A fêmea adulta de *C. brachyurus* foi quimicamente contida para

procedimentos cirúrgicos e coleta de amostras. Todos os outros indivíduos de *C. brachyurus* foram fisicamente contidos de acordo com a rotina do Zoológico de Belo Horizonte, que tem condicionado a espécie a este tipo de manejo. Nenhum destes animais recebeu antimicrobianos até um ano antes da coleta de amostras. De cada indivíduo, foram coletados suabes de três sítios corporais pré-selecionados (oral, retal e nasal), totalizando 30 amostras. Todas as amostras foram inseridas em microtubos, armazenadas em uma caixa de transporte com gelo e transportadas para o Laboratório de Bacterioses e Pesquisa da Escola Veterinária da UFMG para processamento. O estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Uso Animal da UFMG (CEUA) sob o protocolo 213/2019 e pelo ICMBio sob o protocolo 69958-1.

6.2.1.5 Amostras de jabutis (*Chelonoidis carbonaria*)

Uma amostragem de conveniência de 66 jabutis aparentemente saudáveis (*Chelonoidis carbonaria*) foi realizada durante um período de 12 meses (fevereiro de 2019 a fevereiro de 2020). As amostras foram coletadas pela equipe veterinária do Centro de Triagem de Animais Silvestres (CETAS) na cidade de Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil. O CETAS é uma organização responsável por receber, reabilitar e reintroduzir os animais silvestres em seu ambiente natural. Os animais, incluindo os jabutis amostrados neste trabalho, chegam ao centro através de entrega voluntária, resgate ou apreensão por agências de vigilância. Para procedimentos de amostragem, um suabe estéril (Cral; Cotia, SP, Brasil) foi introduzido 5-6 cm na cloaca e rotacionado cinco vezes, como descrito por Ives et al. (2017). O suabe foi colocado em um microtubo estéril, armazenado em uma caixa de transporte com gelo e transportado para o Laboratório de Bacterioses e Pesquisa da Escola Veterinária da UFMG para processamento imediato. O estudo foi aprovado pela CEUA da UFMG sob o protocolo 238/2015 e pelo ICMBio sob o protocolo 49195-1.

6.2.2 Isolamento e identificação de *Staphylococcus* spp.

Para o isolamento de *Staphylococcus* spp., as amostras fecais foram suspensas em solução salina 0,85% e 100 µL foram estriados em ágar manitol salgado (Difco, EUA). Já os suabes foram plaqueados diretamente em ágar manitol salgado. As placas foram, então, incubadas a 37 °C durante 24 horas. Colônias sugestivas foram subcultivadas em ágar Müller

Hinton (Difco, EUA) e identificadas por MALDI-TOF MS (Bruker Daltonics, Alemanha). O escore de ponto de corte de 2 foi usado para validar a identificação a nível de espécie, como recomendado pelo fabricante (Matsuda et al., 2012). Os isolados identificados como pertencentes ao SIG pelo MALDI-TOF foram confirmados por PCR multiplex do gene *nuc* (Sasaki et al., 2010) e, quando necessário, submetidos ao sequenciamento do gene *16S rRNA* e/ou *rpoB* (Mellmann et al., 2006; Fox et al., 2011). Os isolados não-SIG com escore MALDI-TOF abaixo de 2,0 foram submetidos ao sequenciamento do gene *16S rRNA* (Fox et al., 2011).

6.2.3 Suscetibilidade a antimicrobianos e detecção do gene *mecA*

Os testes de suscetibilidade a antimicrobianos foram realizados utilizando o teste de disco-difusão em ágar, de acordo com os documentos M100-Ed31 (CLSI, 2021) e VET01S-Ed5 (CLSI, 2020) do CLSI. Foram testados os seguintes antimicrobianos: oxacilina (1 µg), cefoxitina (30 µg), penicilina G (10 unidades), tetraciclina (30 µg), trimetoprim/sulfametoxazol (25 µg), cloranfenicol (30 µg), eritromicina (15 µg), clindamicina (2 µg), gentamicina (10 µg) e ciprofloxacina (5 µg) (DME, BRA). *S. aureus* ATCC 25923 foi usado como controle e os isolados foram considerados MDR quando resistentes a três ou mais classes de agentes antimicrobianos (Sweeney et al., 2018). Para detecção do gene *mecA*, a extração de DNA foi realizada segundo Pitcher et al. (1989), e estafilococos resistentes à meticilina (MRS) foram investigados por PCR, como descrito anteriormente por Murakami et al. (1991).

6.2.4 MLST de *S. pseudintermedius* de canídeos silvestres

Estirpes de *S. pseudintermedius* que apresentaram diferentes perfis fenotípicos de suscetibilidade a antimicrobianos foram selecionadas e submetidas à técnica de MLST, como descrito anteriormente por Solyman et al. (2013) e Grönthal et al. (2017). Os STs foram determinados usando o banco de dados de MLST de *S. pseudintermedius* e novos STs foram designados. Phyloviz v2.0 usando o algoritmo goeBURST (Francisco et al., 2009; Nascimento et al., 2017) foi usado para inferir a estrutura da população, com complexos clonais sendo compostos por todas as linhagens compartilhando pelo menos cinco alelos idênticos (variação de duplo loci). A análise filogenética foi realizada com base nas sequências nucleotídicas do esquema MLST. Uma árvore filogenética usando o modelo ML e modelos Hasegawa-Kishino-

Yano de evolução de nucleotídeos foi construída usando o IQ-TREE (Mihn et al., 2020), sendo visualizada e anotada usando o iTol v.4 (Letunic et al., 2019).

6.2.5 Análise estatística

A associação entre a resistência fenotípica e as espécies estafilocócicas foi avaliada pelo teste exato de Fisher. O teste de aderência ao qui-quadrado foi usado para avaliar a distribuição das variáveis. Todas as análises estatísticas foram realizadas usando o GraphPad Prism v.8 (GraphPad Software, San Diego, CA, EUA). As diferenças foram consideradas significativas quando $p < 0,05$.

6.3 RESULTADOS

6.3.1 Pombos (*Columbia livia*)

Entre os 47 pombos capturados, 20 (42,5%) isolados estafilocócicos foram recuperados de 18 (38,3%) animais. Oito espécies diferentes foram detectadas, sendo *S. xylosus* (30%) a espécie mais frequente (Tabela 15).

Tabela 14 - Frequência, distribuição e fenótipos de resistência a antimicrobianos de espécies estafilocócicas recuperadas de pombos (n = 47) no HV-UFGM, Belo-Horizonte, Minas Gerais, Brasil.

Espécie	n (%)	Número de isolados resistentes a antimicrobianos								
		TET	PEN	ERI	CLI	CEF	SXT	GEN	CIP	CLO
<i>S. xylosus</i>	6 (30)	2	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>S. sciuri</i> *	5 (25)	1	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>S. lentus</i> *	3 (15)	1	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>S. haemolyticus</i>	2 (10)	0	1	0	0	0	0	0	0	0
<i>S. aureus</i>	1 (5)	0	1	1	1	0	0	0	0	0
<i>S. intermedius</i>	1 (5)	0	1	0	0	0	0	0	0	0
<i>S. succinus</i>	1 (5)	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>S. schleiferi</i> *	1 (5)	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Total	20 (100%)	4 (20%)	3 (15%)	1 (5%)	1 (5%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)

*Este trabalho não levou em consideração a recente reclassificação de *S. sciuri* e *S. lentus* como *Mammaliicoccus sciuri* e *Mammaliicoccus lentus*, e também a diferenciação de *S. schleiferi* em duas espécies, *S. coagulans* e *S. schleiferi* (Madhaiyan et al., 2020).

Sete (35%) isolados foram resistentes a pelo menos um agente antimicrobiano, enquanto treze (65%) foram susceptíveis a todos os compostos testados. Houve resistência à tetraciclina (35,5%), seguido por penicilina G (15%), eritromicina (5%), e clindamicina (5%). Não foram encontradas diferenças significativas na resistência entre estes antimicrobianos. Um isolado de *S. aureus* apresentou resistência à penicilina G, eritromicina e clindamicina, sendo então classificado como MDR. Todos os isolados foram suscetíveis à cefoxitina, cloranfenicol, gentamicina, ciprofloxacina, e trimetoprim-sulfametoxazol, e negativos para o gene *mecA*.

6.3.2 Roedores e marsupiais de vida livre

Um total de 159 animais de vida livre, incluindo 136 roedores e 23 marsupiais, foram amostrados durante um período de um ano (Tabela 16). O número de animais amostrados no Parque 1 (76,1%) foi aproximadamente três vezes maior que o do Parque 2 (23,9%) ($p < 0,001$). No Parque 1, os roedores foram capturados com maior frequência (97,5%) do que os marsupiais (2,5%), sendo os ratos pretos (*Rattus rattus*) os mais encontrados (31,4%) (Tabela 16). Entre os marsupiais, somente o gambá de orelhas brancas (*Didelphis albiventris*) foi capturado. No Parque 2, a frequência de captura foi de 52,6% para marsupiais e 47,4% para roedores. Os principais representantes de marsupiais e roedores neste parque eram gambás de orelhas brancas (*Didelphis albiventris*) (45%) e o gênero *Cerradomys* (55,5%), respectivamente (Tabela 16). Para os marsupiais, a frequência de captura foi maior (52,6%) e mais diversidade de espécies foi observada no Parque 2 do que no Parque 1 (2,5%) ($p < 0,001$).

Tabela 15 - Frequência e distribuição de roedores e marsupiais capturados no Parque Municipal Jacques Cousteau (parque 1) e no Parque Municipal Mangabeiras (parque 2) em Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil.

Animais	Nome comum (espécie)	Total			
		Parque 1	Parque 2	Soma	Grupo
Roedores	Gênero <i>Cerradomys</i>	29	10	39	
	Ratinho do cerrado (<i>Necromys lasiurus</i>)	34	4	38	136
	Rato preto (<i>Rattus rattus</i>)	37	0	37	(85,5%)
	*Ordem Rodentia	18	4	22	
Marsupiais	Gambá de orelha branca (<i>Didelphis albiventris</i>)	3	9	12	23
	Gambá de orelha preta (<i>Didelphis aurita</i>)	0	6	6	(14,5%)
	Cuíca cinza (<i>Marmosops incanus</i>)	0	5	5	
Total		121 (76,1%)	38 (23,9%)	159 (100%)	159 (100%)

*Alguns roedores não foram classificados por gênero e espécie e foram categorizados como membros da ordem Rodentia.

No total, estafilococos foram isolados de 36 dos 136 (26,5%) roedores testados, com um animal apresentando dois isolados com espécies diferentes. Dentre os 37 estafilococos isolados, 35 (94,5%) eram do Parque 1, e apenas dois eram do Parque 2. Não houve diferença estatisticamente significativa no carregamento estafilocócico por espécies de roedores (Tabela 17). Também não houve diferença na frequência de isolamento em diferentes períodos sazonais (chuva e seca). Apenas um isolado (4,3%) foi recuperado dos marsupiais, especificamente de um gambá de orelha preta (*Didelphis aurita*) capturado no Parque 2. Estafilococos foram mais frequentemente isolados de roedores do que de marsupiais ($p = 0,0164$).

Oito espécies diferentes de estafilococos foram detectadas em roedores, com *S. saprophyticus* (48,6%) sendo isolado significativamente com maior frequência do que as outras espécies ($p < 0,001$) (Tabela 17). *S. aureus* foi isolado de três animais (8,1%). Para marsupiais, a única estirpe isolada foi identificada como *S. saprophyticus*, que foi suscetível a todos os antimicrobianos testados.

Tabela 16 - Frequência e distribuição de espécies estafilocócicas isoladas de roedores (n=136) de dois parques urbanos em Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil.

Isolado	<i>Cerradomys</i> sp. (n=39)	<i>Necromys</i> <i>lasiurus</i> (n=38)	<i>Rattus</i> <i>rattus</i> (n=37)	Rodentia*** (n=22)	Total de isolados
<i>S. saprophyticus</i>	6	4	6	2	18 (48.6%) ^a
<i>S. xylosus</i>	0	6	0	0	6 (16.2%) ^b
<i>S. aureus</i>	2	0	1	0	3 (8.1%) ^b
<i>S. sciuri</i> **	1	1	1	0	3 (8.1%) ^b
<i>S. succinus</i>	0	1	2	0	3 (8.1%) ^b
<i>S. epidermidis</i>	0	1	1	0	2 (5.4%) ^b
<i>S. cohnii</i>	0	0	1	0	1 (2.7%) ^b
<i>S. warneri</i>	0	1	0	0	1 (2.7%) ^b
Total de isolados/roedor	9 (23,8%) ^a	14 (36,8%) ^{ab}	12 (32,4%) ^{ab}	2 (9,1%) ^b	37 (100%)

* Comparação múltipla: letras diferentes indicam diferenças significativas.

** Este trabalho não levou em consideração a recente reclassificação de *S. sciuri* como *Mammaliicoccus sciuri* (Madhaiyan et al., 2020).

***Alguns roedores não foram classificados por gênero e espécie e foram categorizados como membros da ordem *Rodentia*.

Nove (6,6%) roedores abrigavam estafilococos resistentes a antimicrobianos, todos do Parque 1 e, dos 37 isolados, nove (24,3%) foram resistentes a pelo menos um agente antimicrobiano. Quatro (10,8%) foram classificados como MDR, dois (5,4%) foram resistentes à cefoxitina, e foram classificados como MRS. Um destes isolados foi positivo para o gene *mecA* (Tabela 18). Penicilina G teve a maior frequência de resistência (24,3%), seguida por eritromicina (8,1%), cefoxitina (5,4%) e clindamicina (5,4%). A resistência à penicilina G (cefoxitina/clindamicina: $p = 0,04$; outros: $p = 0,002$) foi significativamente maior do que a dos outros agentes antimicrobianos testados, exceto a eritromicina ($p = 0,11$). Entretanto, não foram encontradas diferenças significativas na resistência à eritromicina e a outros antimicrobianos. Todos os isolados foram suscetíveis ao cloranfenicol, ciprofloxacina, gentamicina, tetraciclina e trimetoprim/sulfametoxazol. Todas as espécies de roedores no presente estudo mostraram pelo menos um isolado resistente a antimicrobianos e não foi encontrada diferença estatística entre estas espécies ($p = 0,15$). Além disso, não houve diferença na frequência de isolados resistentes entre os transectos em cada parque ($p = 0,24$) ou entre os parques ($p = 0,6$).

Tabela 17 - Caracterização dos isolados estafilocócicos obtidos de animais capturados no Parque 1 (transectos 1 e 2) que apresentaram resistência a antimicrobianos.

Isolado	Parque	Transecto	Animal	<i>Staphylococcus</i> spp.	Gen <i>emecA</i>	Fenótipo de resistência*
JC07	1	1	Rato preto (<i>R. rattus</i>)	<i>S. epidermidis</i>	Não	PEN
JC11	1	1	Rato preto (<i>R. rattus</i>)	<i>S. saprophyticus</i>	Não	PEN
JC49	1	1	Rato preto (<i>R. rattus</i>)	<i>S. aureus</i>	Não	PEN; ERI; CLI
JC26	1	2	Gênero <i>Cerradomys</i>	<i>S. saprophyticus</i>	Não	PEN; ERI; CLI
JC50.2	1	2	Ratinho do cerrado (<i>N. lasiurus</i>)	<i>S. warneri</i>	Não	PEN
JC54	1	2	Ratinho do cerrado (<i>N. lasiurus</i>)	<i>S. xylosus</i>	Não	PEN
JC81	1	2	Ratinho do cerrado (<i>N. lasiurus</i>)	<i>S. epidermidis</i>	Sim	PEN; ERI; CEF
JC98	1	2	Ratinho do cerrado (<i>N. lasiurus</i>)	<i>S. sciuri</i> *	Não	PEN
JC121	1	2	Ordem <i>Rodentia</i>	<i>S. saprophyticus</i>	Não	PEN; CEF

* Este trabalho não levou em consideração a recente reclassificação de *S. sciuri* como *Mammaliicoccus sciuri* (Madhaiyan et al., 2020).

6.3.3 Quatis (*Nasua nasua*)

Entre os 55 quatis capturados, 43 (78,1%) isolados estafilocócicos foram recuperados de 40 (72,7%) animais. Nove espécies diferentes de estafilococos foram detectadas, com *S. intermedius* (60,4%) e *S. delphini* (20,9%) isolados mais frequentemente do que as outras espécies ($p < 0,001$) (Tabela 19).

Seis quatis (10,9%) apresentaram estafilococos resistentes a antimicrobianos. Penicilina G teve a maior frequência de resistência (13,9%), seguida por tetraciclina (2,3%) e cloranfenicol (2,3%). A resistência à penicilina G foi significativamente maior do que a resistência aos outros agentes antimicrobianos testados ($p = 0,0259$), exceto à tetraciclina e ao cloranfenicol ($p = 0,1096$). Entretanto, não foram encontradas diferenças significativas entre a resistência à tetraciclina e ao cloranfenicol e a resistência a outros agentes antimicrobianos. Um isolado de *S. saprophyticus* apresentou resistência à penicilina G, tetraciclina e cloranfenicol, sendo classificado como MDR. Todos os isolados foram suscetíveis à ciprofloxacina, gentamicina, trimetoprim/sulfametoxazol, eritromicina, clindamicina, rifampicina e ceftioxime, e negativos para o gene *mecA*.

Tabela 18 - Frequência, distribuição e fenótipos de resistência antimicrobiana de espécies estafilocócicas recuperadas de quatis (n = 55) no estado de Minas Gerais, Brasil.

Espécie	n (%)	Número de isolados resistentes a antimicrobianos									
		PEN	TET	CLO	ERI	CLI	CEF	SXT	GEN	CIP	RIF
<i>S. intermedius</i>	26 (60.4%)	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>S. delphini</i>	9 (20.9%)	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>S. epidermidis</i>	2 (4.6%)	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>S. capitis</i>	1 (2.3%)	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>S. kloosii</i>	1 (2.3%)	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>S. saprophyticus</i>	1 (2.3%)	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0
<i>S. coagulans</i>	1 (2.3%)	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>S. sciuri*</i>	1 (2.3%)	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>S. warneri</i>	1 (2.3%)	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Total	43 (100%)	6 (13.9%)	1 (2.3%)	1 (2.3%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)

*A recente reclassificação de *S. sciuri* como *Mammaliococcus sciuri* não foi considerada neste trabalho (Madhaiyan et al. 2020).

6.3.4 Canídeos e felídeos silvestres

Staphylococcus spp. foram isolados de 21 das 30 (70%) amostras coletadas. *S. pseudintermedius* foi a espécie mais frequente (47,6%), tendo sido isolada apenas de lobos-guarás (Tabela 20). *S. felis* foi a segunda espécie mais comum, sendo detectada em cinco amostras (23,8%) de três animais, duas onças-pintadas e um lobo-guará (suabe oral). *S. nepalensis* e *S. xylosus* foram encontrados em duas amostras (9,5%), cada uma, enquanto *S. saprophyticus* e *S. intermedius* foram isolados de uma amostra (4,7%) cada. Todos os isolados do SIG (*S. pseudintermedius* e *S. intermedius*) foram recuperados de lobos-guarás (*C. brachyurus*).

Tabela 19 - Frequência e distribuição de espécies estafilocócicas isoladas de lobo-guará (*Chrysocyon brachyurus*), onça-pintada (*Panthera onca*) e leão (*Panthera leo*) mantidos em cativeiro no Zoológico de Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil.

Espécie	Lobo-guará (<i>Chrysocyon brachyurus</i>) (n=7)			Onça-pintada (<i>Panthera onca</i>) (n=2)			Leão (<i>Panthera leo</i>) (n=1)			Total de isolados
	Oral	Nasal	Retal	Oral	Nasal	Retal	Oral	Nasal	Retal	
<i>S. pseudintermedius</i>	1 (4,7%)	4 (19%)	5 (23,8%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	10 (47,6%)
<i>S. felis</i>	1 (4,7%)	0 (0%)	0 (0%)	1 (4,7%)	1 (4,7%)	2 (9,5%)	0 (%)	0 (%)	0 (%)	5 (23,8%)
<i>S. nepalensis</i>	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	1 (4,7%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	1 (4,7%)	2 (9,5%)
<i>S. xylosus</i>	1 (4,7%)	1 (4,7%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	2 (9,5%)
<i>S. intermedius</i>	0 (0%)	1 (4,7%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	1 (4,7%)
<i>S. saprophyticus</i>	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	1 (4,7%)	0 (0%)	1 (4,7%)
Total de isolados/espécie	3 (14,3%)	6 (28,6%)	5 (23,8%)	2 (9,5%)	1 (4,7%)	2 (9,5%)	0 (0%)	1 (4,7%)	1 (4,7%)	21 (100%)

Seis isolados de *S. pseudintermedius* (um por animal e um extra) foram selecionados e submetidos ao MLST. Cinco novos STs foram identificados: ST2559, 2560, 2563, 2564 e 2566 (Figura 16). A análise do eBURST revelou que estas estirpes compartilharam entre um a quatro alelos com isolados descritos anteriormente, enquanto uma árvore filogenética baseada no alinhamento de todos os genes MLST mostrou que estes isolados tinham semelhanças, principalmente, com estirpes de MSSP de cães isolados de estudos anteriores realizados no Brasil.

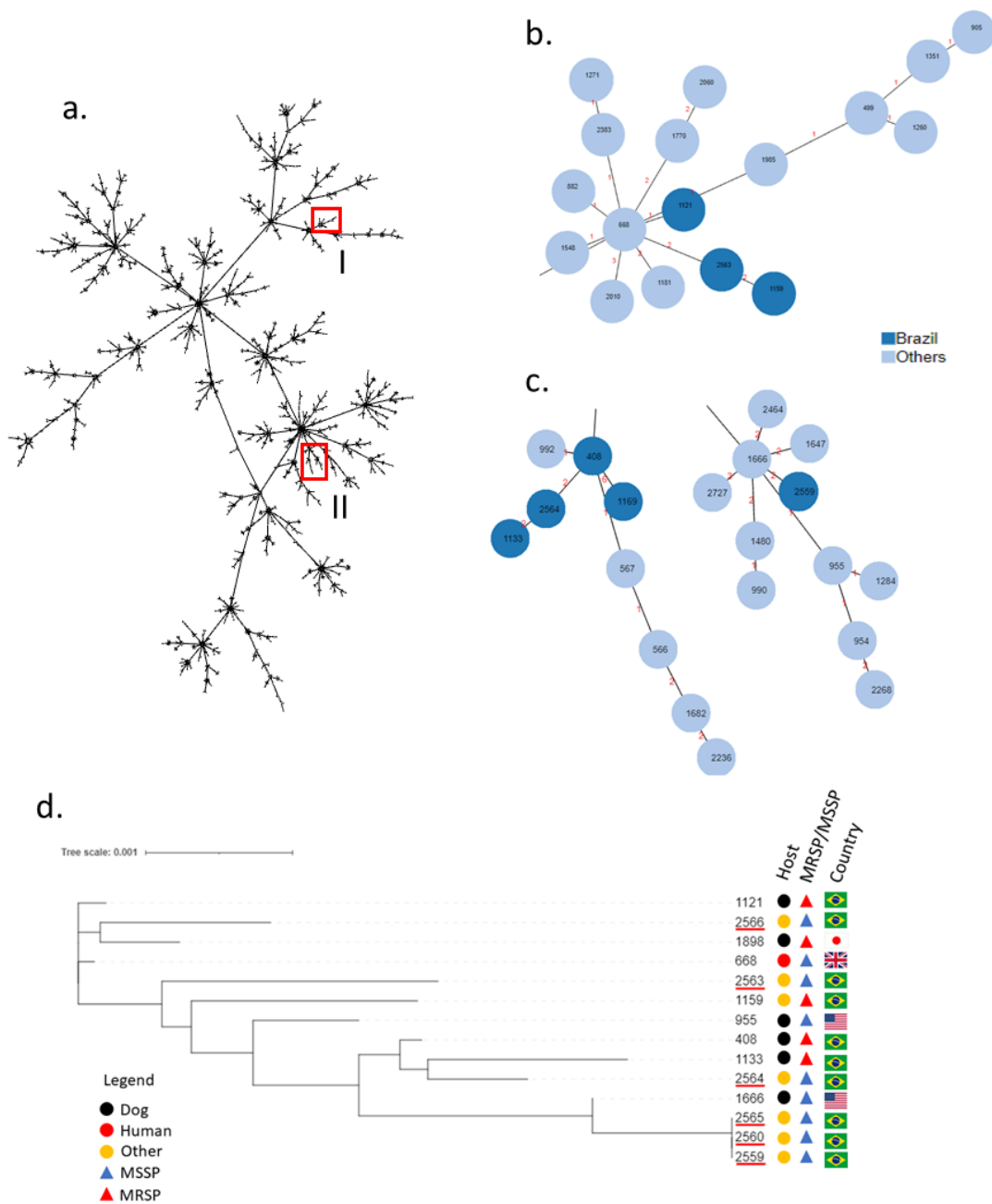


Figura 15 - Relação genética de isolados de *S. pseudintermedius* de lobos-guarás (*Chrysocyon brachyurus*) em Belo Horizonte (2020). a) Snapshot da população de MRSP (goeBURST). b) Localização do ST2563. c) Localização dos ST2559 e ST2564. ST2560 e ST2565 são singletons (não incluídos). d) Uma árvore filogenética baseada no alinhamento de todos os genes MLST de cada tipo de sequência foi inferida usando iqTree. *S. pseudintermedius* do banco de dados PubMLST (<https://pubmlst.org/>) compartilhando quatro ou mais alelos com os isolados dos estudos foram adicionados para fins de comparação. As colunas com triângulos em vermelho indicam estirpes de MRSP enquanto os triângulos em azul indicam isolados de MSSP. Os círculos em preto, vermelho e amarelo indicam cães, humanos ou outros hospedeiros, respectivamente.

Um total de oito (8/21=38,1%) estafilococos isolados de sete animais (7/10=70%) foram resistentes a pelo menos um antimicrobiano. A resistência à tetraciclina (6/21=28,6%) ou à penicilina (5/21=23,8%) foi significativamente maior do que a resistência aos outros agentes antimicrobianos testados ($p = 0,0207$). Um isolado de *S. nepalensis*, recuperado do suabe oral de uma onça-pintada, foi positivo para o gene *mecA* e resistente a cinco agentes antimicrobianos (cefoxitina, clindamicina, penicilina, tetraciclina e ciprofloxacina), sendo assim classificado como MRS e MDR (Sweeney et al., 2018). Todos os isolados foram suscetíveis à eritromicina, cloranfenicol, trimetoprim/sulfametoxazol e gentamicina.

6.3.5 Jabutis (*Chelonoidis carbonaria*)

Neste estudo, 48 dos 66 (72,7%) jabutis testados foram positivos para espécies estafilocócicas (Tabela 21). Todos os isolados foram CoNS e quatro espécies diferentes foram detectadas, com *S. sciuri* (81,3%) isolado com frequência significativamente maior que as outras espécies (Tabela 21) ($p < 0,001$). A frequência de *S. xylosus* também foi significativamente diferente da de *S. kloosii* e *S. saprophyticus* ($p = 0,048$).

Vinte e sete (56,2%) isolados foram resistentes a pelo menos um agente antimicrobiano, enquanto vinte e um (43,8%) foram suscetíveis a todos os antimicrobianos testados. Houve alta frequência de resistência à penicilina G (35,5%), seguida por tetraciclina (29,1%), clindamicina (2%) e trimetoprim/sulfametoxazol (2%) ($p < 0,05$). A resistência à penicilina G (CLI/SUT: $p < 0,001$; outros: $p < 0,001$) e à tetraciclina (CLI/SUT: $p = 0,0004$; outros: $p < 0,001$) foi significativamente maior do que a dos outros agentes antimicrobianos testados. Entretanto, não foram encontradas diferenças significativas na resistência entre a penicilina G e a tetraciclina. Todos os isolados foram suscetíveis à cefoxitina, cloranfenicol, eritromicina, gentamicina e ciprofloxacina.

A Tabela 21 apresenta os fenótipos de resistência antimicrobiana das espécies estafilocócicas recuperadas de jabutis saudáveis no Brasil. *Staphylococcus sciuri* apresentou resistência à penicilina G, tetraciclina e clindamicina. *S. xylosus* e *S. kloosii* apresentaram resistência à penicilina G e à tetraciclina e *S. saprophyticus* apresentou resistência à tetraciclina e ao trimetoprim-sulfametoxazol. Todas as quatro espécies estafilocócicas recuperadas apresentaram isolados resistentes à tetraciclina, e todas apresentaram isolados com resistência

a mais de um agente antimicrobiano (co-resistência). Todos os isolados foram negativos para o gene *mecA*.

Tabela 20 - Frequência, distribuição e fenótipos de resistência antimicrobiana de espécies estafilocócicas recuperadas de jabutis saudáveis (n = 66) em Minas Gerais, Brasil.

Espécies	n (%) *	Números de isolados resistentes a antimicrobianos								
		PEN	TET	CLI	SXT	CEF	ERI	GEN	CIP	CLO
<i>S. sciuri</i> **	39 (81.3) ^a	13	10	1	0	0	0	0	0	0
<i>S. xylosus</i>	6 (12.5) ^b	2	2	0	0	0	0	0	0	0
<i>S. kloosii</i>	2 (4.2) ^c	2	1	0	0	0	0	0	0	0
<i>S. saprophyticus</i>	1 (2) ^c	0	1	0	1	0	0	0	0	0
Total	48 (100%)	17 (35.5%)	14 (29.1%)	1 (2%)	1 (2%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)

* Comparação múltipla: letras diferentes indicam diferenças significativas.

**A recente reclassificação de *S. sciuri* como *Mammaliicoccus sciuri* não foi considerada neste trabalho (Madhaiyan et al. 2020).

A tabela 22 resume os principais achados encontrados nos animais silvestres avaliados no presente estudo. Em suma, cada grupo avaliado foi colonizado por espécies diferentes de estafilococos. Quatis e lobos-guarás foram predominantemente colonizados por espécies do SIG, enquanto jabutis por *S. sciuri*. *S. felis* foi isolado de felídeos e, também, do suabe oral de um lobo-guará. Adicionalmente, com exceção dos jabutis, todas as espécies avaliadas apresentaram isolados MDR, sendo os roedores e pombos, aqueles que obtiveram maior frequência destas estirpes (10,8% e 5%, respectivamente).

Tabela 21 – Principais achados sobre estafilococos e susceptibilidade a antimicrobianos em diferentes espécies de animais silvestres.

	Espécie				
	Pombos	Roedores	Quatis	Canídeos e felídeos	Jabutis
Principais estafilococos	<i>S. xylosus</i> (30%)	<i>S. saprophyticus</i> (48,6%)	<i>S. intermedius</i> (60,4%)	<i>S. pseudintermedius</i> (47,6%)	<i>S. sciuri</i> (81,3%)
	<i>S. sciuri</i> (25%)	<i>S. xylosus</i> (16,2%)	<i>S. delphini</i> (20,9%)	<i>S. felis</i> (23,8%)	<i>S. xylosus</i> (12,5%)
MDR	5%	10,8%	2,3%	4,7%	0%
MRS	0%	5,4%	0%	4,7%	0%
Observações	<i>S. aureus</i> MDR	Hospedeiro <i>S. saprophyticus</i>	Hospedeiro SIG	Hospedeiro SIG e <i>S. felis</i>	Hospedeiro <i>S. sciuri</i>

6.4 DISCUSSÃO

Staphylococcus spp. são importantes bactérias comensais de grande parte dos seres vivos, conhecidas como excelentes portadoras e transmissoras de genes de resistência (Otto, 2013; Becker et al., 2014), que podem, também, causar uma grande variedade de infecções oportunistas em seres humanos e animais (Chu et al., 2008; Dimitriou et al., 2011; Wieler et al., 2011; Walther et al., 2017; Heilmann et al., 2019). Estudos têm sugerido que animais silvestres, principalmente os sinantrópicos, geram um alto risco de transmissão de patógenos zoonóticos e multirresistentes, seja pela contaminação do meio ambiente com seus excrementos, ou pela interação casual não intencional com seres humanos e animais domésticos (Himsworth et al., 2013; Jahan et al., 2020; Lillehaug et al., 2005; Graczyk et al., 2007; Torres-Mejía et al., 2018). Apesar da alta relevância epidemiológica, este é o primeiro estudo a avaliar a distribuição e o perfil de resistência a antimicrobianos de estafilococos em pombos, roedores, quatis, marsupiais, carnívoros silvestres e jabutis no Brasil.

Mais de um terço dos pombos capturados foram positivos para estafilococos e oito espécies diferentes foram recuperadas. De forma similar, uma grande diversidade também foi encontrada nos roedores amostrados no presente estudo. Este resultado contrasta com a diversidade vista em jabutis, em que apenas quatro espécies de *Staphylococcus* foram encontradas, sendo que duas delas correspondiam a mais de 90% dos isolados. Segundo estudos anteriores, animais sinantrópicos parecem abrigar uma grande diversidade de espécies de estafilococos, enquanto répteis parecem mostrar um padrão de colonização mais homogêneo (Schwarz e Werckenthin, 1994; Zigo, 2017; Santana et al., 2021; Santana et al., 2022). No caso específico dos pombos, pode-se hipotetizar que o contato próximo e diário desses com seres humanos e animais, combinado com o ambiente hospitalar potencialmente contaminado, pode ter influenciado este grande número de espécies recuperadas (Schwarz e Werckenthin, 1994; Zigo, 2017; Kamathewatta et al., 2019).

S. xylosus, a espécie mais freqüente nos pombos e a segunda mais frequente em roedores e jabutis, já foi relatada em seres humanos e em diferentes animais, sendo considerada um comensal comum em aves (Schwarz e Werckenthin, 1994; Vela et al., 2012; N. Mahmoud, 2013; Becker et al., 2014; Rissi et al., 2015; Zigo, 2017; Matias et al., 2018; Santana et al., 2021; Santana et al., 2022). No presente estudo, *S. xylosus* foi encontrada, ainda, em dois lobos-guarás. Apesar de ser considerada de baixa patogenicidade, várias infecções oportunistas foram

descritas em diferentes espécies na literatura veterinária, incluindo mastite, dermatite, cistite, peritonite e lesões pulmonares (Miedzobrodzki et al., 1989; Solomon et al., 1990; Bradfield et al., 1993; Fthenakis et al., 1994; Won et al., 2002; Rissi et al., 2015). Não obstante, vários relatos de infecções em seres humanos também são apresentados, como septicemia, endocardite, pielonefrite, abscessos cerebrais, entre outros (Bernat García et al., 1992; Hricak et al., 1999; Pinna et al., 1999; Koksall et al., 2009; Akhaddar et al., 2010).

No estudo com roedores, várias diferenças foram observadas nos animais amostrados de cada um dos dois parques incluídos no presente trabalho. Primeiro, o número de animais amostrados no Parque 1 foi quase três vezes maior do que o do Parque 2. Além disso, também foram observadas diferenças nas espécies capturadas; ratos pretos foram os roedores mais comuns capturados no Parque 1, mas este animal não foi capturado no Parque 2. Em contraste, a frequência e a diversidade dos marsupiais foram mais altas no Parque 2 do que no Parque 1. Os aspectos ecológicos são as principais hipóteses para estas diferenças, já que o Parque 1 é substancialmente menor (335 mil metros quadrados contra 2,4 milhões de metros quadrados), está completamente cercado de ambiente urbano (Figura 14), tem experimentado um rápido crescimento de urbanização vertical e tem efluentes de esgoto presentes em seus cursos d'água (Parque Municipal Jacques Cousteau, 2019). Este ambiente parece mais atraente para roedores sinantrópicos, incluindo ratos pretos, enquanto a área mais conservada observada no Parque 2 pode favorecer a captura de marsupiais (Feng e Himsforth, 2014; Cáceres et al., 2016; Byers et al., 2019). Essas diferenças podem ter influenciado na diversidade de colonização por *Staphylococcus* spp. observadas nos roedores amostrados nos dois parques.

Deve-se destacar a frequência de estafilococos em roedores neste estudo (27,2%), muito menor do que a relatada por outros autores, que geralmente é superior a 75% (Nagase et al., 2002; Kmet' et al., 2018). Diferenças nas espécies de roedores amostradas (comumente apenas roedores sinantrópicos), e diferenças na ecologia do hospedeiro, como alimentação, localização geográfica e contato com diferentes fontes antrópicas podem ter contribuído para esta grande variação na taxa de carreamento (Yalden e Harris, 2008; Furness et al., 2017).

Apenas um isolado de *S. saprophyticus* (4,3%) foi recuperado dos marsupiais, e os roedores foram mais propensos à colonização estafilocócica do que estes animais ($p = 0,01$). O único estudo publicado até hoje que avaliou a distribuição de estafilococos em marsupiais, especificamente nas amostras nasais de “wallabies” australianos (*Petrogale xanthopus*, *Petrogale lateralis*, e *Macropus eugenii*), relatou uma taxa de isolamento muito maior do que

este estudo, atingindo 90,8%. Além disso, catorze espécies de estafilococos foram recuperadas, sendo *S. delphini* e *S. succinus* as espécies predominantes. *S. saprophyticus*, também isolado no presente estudo, foi recuperado de 4,5% dos animais avaliados (Chen et al., 2014). Nesse estudo, 70% dos wallabies viviam em cativeiro, e os autores atribuíram a alta frequência de isolamento e diversidade das espécies estafilocócicas à pressão de seleção ambiental e à atividade antrópica.

S. saprophyticus foi a espécie mais frequentemente recuperada de roedores no presente estudo. As espécies estafilocócicas em roedores variam consideravelmente entre trabalhos publicados anteriormente, sendo *S. xylosus*, *S. succinus* e *S. sciuri* as mais frequentemente observadas (Nagase et al., 2002; Hauschild et al., 2003; Kmet' et al., 2018). Curiosamente, *S. saprophyticus* só foi relatado em alguns animais em um estudo sobre ratazanas de banco (*Myodes glareolus*) realizado na Polônia (Hauschild et al., 2003). *S. saprophyticus* foi também isolado, porém em baixa frequência, em quatro outras espécies animais no presente estudo (um marsupial, um quati, um leão e um jabuti). Em um contexto de saúde pública, é importante lembrar que *S. saprophyticus* é a segunda maior causa de infecções do trato urinário em mulheres, inclusive no Brasil, e é tipicamente classificado como um colonizador humano (Latham et al., 1983; Eiff et al., 2002; Raz et al., 2005; Fariña et al., 2013).

O presente estudo revelou dois novos hospedeiros de bactérias do grupo *Staphylococcus intermedius* (SIG): quatis e lobos-guarás. Em quatis, a colonização por *S. intermedius* e *S. delphini* apresentou frequência superior às demais espécies. *S. intermedius* é descrito na literatura como uma bactéria comensal de pombos selvagens, enquanto *S. delphini* parece colonizar membros da família Mustelidae, assim como golfinhos, pombos domésticos e, menos frequentemente, cavalos e camelos (Sasaki et al. 2007; Guardabassi et al. 2012; Chrobak-Chmiel et al. 2021). Curiosamente, *S. intermedius* e *S. delphini* já foram isolados de guaxinins (*Procyon lotor*), outro membro da família Procyonidae, mas com uma frequência muito menor (Pinard et al. 2002; Nowakiewicz et al. 2016). *S. intermedius* também foi encontrado em um pombo no presente estudo. Vale ressaltar que esse agente é mais comumente relatado em pombos selvagens e o isolamento em pombos domésticos parece raro (Kizerwetter-Świda et al., 2015).

S. pseudintermedius, também representante do grupo SIG, foi isolada de dez (47,6%) amostras, todas de lobos-guarás (Tabela 20). *S. intermedius* também foi isolado de lobo-guará, o que pode sugerir que estes animais são hospedeiros naturais de representantes do SIG. Vale

lembrar que *S. pseudintermedius* é uma bactéria comensal de cães, mas pode ser responsável por várias infecções clínicas, incluindo piodermite, otite, infecções de feridas e infecções do trato urinário (Viegas et al., 2022). Casos de *S. pseudintermedius* causando infecções em seres humanos também são eventualmente relatados (Somayaji et al., 2016). Por outro lado, *S. pseudintermedius* em espécies selvagens é, em grande parte, desconhecido. Um estudo sugeriu que raposas vermelhas (*Vulpes vulpes*) e martas de faia (*Martes foina*) são naturalmente colonizadas por essa espécie, e relatos de casos de infecção também foram descritos em uma raposa ártica (*Vulpes lagopus*) e em cães guaxinins (*Nyctereutes procyonoides*) (Tanner et al., 2000; Guardabassi et al., 2004; Nowakiewicz et al., 2016; Iwata et al., 2018). O isolamento deste agente em canídeos selvagens sugere uma possível adaptação deste patógeno a novos hospedeiros e levanta hipóteses sobre o papel deste animal em sua epidemiologia (Solyman et al., 2012; Godoy et al., 2016; Kmiecik et al., 2018). De fato, a análise do MLST revelou que *S. pseudintermedius* isolados dos lobos-guarás no presente trabalho têm algumas semelhanças com as linhagens anteriormente isoladas de cães no Brasil. Também é importante notar que, durante a última década, o surgimento do *S. pseudintermedius* MDR em cães tornou-se um problema de grande preocupação na medicina veterinária (Lynch e Helbig, 2021). Por outro lado, os isolados recuperados no presente estudo foram susceptíveis a quase todos os antimicrobianos testados, contrastando com relatos em cães (Nisa et al., 2019; Viegas et al., 2022).

O presente estudo também descreve, pela primeira vez, *S. felis* em animais selvagens: duas onças-pintadas e um lobo-guará. Até o momento, esta espécie foi isolada apenas de gatos domésticos (Igimi et al., 1989; Worthing et al., 2018), o que levanta o questionamento se as estirpes encontradas nas onças pintadas e no lobo-guará seriam comensais ou teriam sido transmitidas por gatos que também habitam o recinto. É sabido que muitos gatos são frequentemente abandonados no Zoológico de Belo Horizonte e podem ser vistos nos espaços habitados por estes animais.

S. felis é considerado uma bactéria comensal de gatos (Lilenbaum et al., 1998; Igimi et al., 1994; Patel et al., 2000), embora possa causar quadros diversos como otite externa, feridas, abscessos, infecções de pele, infecções do trato urinário e doenças respiratórias (Igimi et al., 1989; Higgins e Gottschalk, 1991; Litster et al., 2007; Bierowiec et al., 2019; Abdel-Moein et al., 2020).

Algumas espécies isoladas, apesar de encontradas em baixa frequência, chamam atenção pela relevância como patógenos em seres humanos. Tanto *S. aureus* quanto *S. epidermidis* foram detectados em diferentes animais no presente estudo e, curiosamente, as duas espécies foram isoladas de animais sinantrópicos (pombos e roedores) ou de hábitos generalistas (quatis), o que pode ter sido influência da antropização, pois mantêm maior contato com ambientes urbanos, seres humanos e animais domésticos. *S. aureus* e *S. epidermidis* são comumente encontradas na microbiota humana e são patógenos oportunistas conhecidos que podem causar infecções graves em seres humanos e animais (Weese e Duijkeren, 2010; Edmiston et al., 2016; Chalmers e Wylam, 2020). Vale ressaltar ainda a detecção de *S. haemolyticus* em pombos, outro estafilococco de grande relevância na saúde humana, sendo frequentemente isolado de infecções nosocomiais graves, incluindo quadros de sepse (Sidhu et al., 2007; Czekaj et al., 2015).

S. sciuri foi a espécie predominantemente recuperada dos jabutis amostrados, representando mais de 80% dos isolados. Esse agente também foi encontrado em um quarto dos pombos avaliados, sendo isolado também em roedores e quatis. Este resultado não foi surpreendente, pois *S. sciuri* é o isolado mais comum de CoNS em animais silvestres saudáveis, incluindo aves, javalis, ouriços, raposas vermelhas, coelhos, texugos e outros mamíferos (Sousa et al., 2016; Mama et al., 2019; García et al., 2020; Ruiz-Ripa et al., 2020). Além disso, esta bactéria é conhecida por ter uma ampla gama de hospedeiros, é adaptada a diferentes habitats (Nemeghaire et al., 2014; Gómez et al., 2017; Schoenfelder et al., 2017; Ruiz-Ripa et al., 2020), além de estar presente em relatos de infecção em seres humanos e animais, incluindo endocardite, peritonite, infecções do trato urinário e septicemia (Stepanović et al., 2002; Stepanović et al., 2005; Severin et al., 2010).

Embora a RAM seja considerada um dos maiores desafios para a segurança da saúde global (WHO, 2014), até o momento, a maioria das pesquisas sobre o tema tem sido baseada em seres humanos e animais de produção (Davies e Davies, 2010). Os relatos na vida selvagem apenas especulam sobre possíveis fontes, mas pouco se sabe sobre o fluxo e destino de RAM no ambiente natural e sobre as diferentes espécies de animais silvestres que podem atuar eficientemente como dispersores (Greig et al., 2015; Huijbers et al., 2015).

Todas as espécies de animais silvestres avaliadas neste estudo apresentaram isolados resistentes a antimicrobianos, principalmente à penicilina G e à tetraciclina, que são medicamentos amplamente utilizados na medicina humana e veterinária (Argudín et al., 2017;

Cerbo, Di et al., 2019). É importante ressaltar que nenhuma delas foi exposta diretamente ao uso destes agentes, inclusive os carnívoros do zoológico, cujo histórico sanitário confirmou esta informação. Desta forma, os dados apontam que a resistência observada não é provinda da pressão seletiva de tratamentos com antimicrobianos, e sim, de outras fontes possíveis, como a transmissão de estafilococos resistentes entre diferentes hospedeiros e o meio, e a transmissão horizontal de genes. De fato, evidências atuais têm sustentado que a presença de genes de resistência e/ou bactérias resistentes a antibióticos em animais selvagens é mais um sinal de poluição antrópica do que de seleção, porém, independente disso, afirmam que estes animais contribuem para sua dispersão em diferentes ecossistemas (Martínez, 2012; Di Lallo et al., 2021; Laborda et al., 2022).

A taxa de resistência a antimicrobianos nas diferentes espécies variou entre 13,9% nos quatis e 56,2% nos jabutis. A alta frequência de resistência encontrada em jabutis pode estar relacionada ao isolamento exclusivo de estirpes CoNS, pois estas bactérias são designadas como reservatórios de genes transferíveis associados à resistência a diversas classes de antimicrobianos (Smith e Andam, 2021). Essa informação é extremamente alarmante no atual cenário em que o número de adoção de jabutis e outros répteis têm crescido exponencialmente (IBGE, 2013). Em contrapartida, a baixa frequência de resistência em quatis não era esperada, pois é visível a influência do ambiente urbano no cotidiano destes animais. Atualmente, não há estudos com os quais comparar estes achados, porém, do mesmo ponto de vista em que foram avaliados os jabutis, apenas 18,6% dos isolados eram CoNS, o que pode ter influenciado no menor carregamento de genes de resistência (Smith e Andam, 2021), quando comparado às demais espécies. Ainda, assim, estes animais carregaram uma estirpe multirresistente, o que afirma seu potencial como carreador e disseminador de estafilococos resistentes.

Com exceção de jabutis e marsupiais, estafilococos MDR foram isolados de todos os grupos avaliados, com destaque para roedores (10,8%) e pombos (5%), fato já esperado por serem animais sinantrópicos com extenso contato com seres humanos, animais domésticos e ambientes contaminados (Himsworth et al., 2014; Ge et al., 2019). Para os roedores, vale ressaltar que apenas os animais do Parque 1, que é mais antropizado e contém efluentes de esgoto, mostraram resistência a antimicrobianos. É possível que esta resistência tenha sido adquirida pelo contato dos animais com cursos d'água contaminados com resíduos de efluentes de esgoto. O efluente de esgoto é conhecido por abrigar vários microrganismos multirresistentes e, conseqüentemente, fornecer uma rota para a transferência horizontal de genes de resistência,

que é a principal hipótese para a maior taxa de RAM em roedores no Parque 1 do que no Parque 2 (Baquero et al., 2008; Gaze et al., 2008; Jobbins e Alexander, 2015; Furness et al., 2017). No caso dos pombos, alguns estudos já relataram o isolamento de estafilococos MDR destes animais (Kutkowska et al., 2019; Chrobak-Chmiel et al., 2021). Neste estudo, um *S. aureus* multirresistente foi isolado, uma das causas mais frequentes de infecção com difícil tratamento em seres humanos no mundo (Ippolito et al., 2010; Turner et al., 2019; Cheung et al., 2021). Pode ser que a combinação do ambiente do hospital veterinário, normalmente contemplado com alta taxa de resistência (Palma et al., 2020), com o extenso contato com seres humanos e animais doentes e saudáveis, possa ter favorecido este cenário. De fato, Futagawa-Saito et al. (2007) compararam o perfil de resistência de estafilococos isolados de pombos com alto e raro contato direto com seres humanos e animais, observando que apenas os isolados de pombos com alto contato direto mostraram resistência a vários antimicrobianos, o que suporta a ideia de que a resistência pode estar sendo adquirida, também, devido à coexistência mútua de diferentes espécies.

O presente estudo também apresentou isolamento de estafilococos resistentes à meticilina, o que é extremamente alarmante, uma vez que conferem resistência a pelo menos todos os antimicrobianos beta-lactâmicos, excluindo a maioria das opções de tratamento de primeira escolha para seres humanos e animais, e reduzindo substancialmente as alternativas terapêuticas (Marin, 2002; Krapf et al., 2019). Estirpes de *S. nepalensis* (onça-pintada), *S. epidermidis* e *S. saprophyticus* (roedores) foram identificadas como MRS. *S. nepalensis* já foi relatada em estudos anteriores como reservatório relevante de resistência a antimicrobianos transferível (Vandzurova et al. 2013; Andrade-Oliveira et al. 2020), e em alguns relatos foi causa de infecção em seres humanos (Novakova, 2006; Hosoya et al., 2020). Já *S. epidermidis* e *S. saprophyticus* são duas bactérias frequentemente envolvidas na saúde humana, sendo a primeira, umas das principais causas de infecções nosocomiais (Both et al., 2021), e a segunda, a principal causa de infecções do trato geniturinário em mulheres (Widerström et al., 2007; Lawal et al., 2021). Há vários relatos sobre a colonização e infecção de animais de companhia que transmitem MRS e MDR (Duijkeren et al., 2011; Paul et al., 2011; Pomba et al., 2017), mostrando a relevância de estudos que monitoram a ocorrência dessas bactérias resistentes em animais.

O presente trabalho concluiu que as espécies de animais silvestres avaliadas neste estudo são colonizadas por diferentes espécies de estafilococos, todas elas já relatadas anteriormente

em infecções de seres humanos e animais. Quatis de vida livre e lobos-guarás de cativeiro foram sugeridos como hospedeiros naturais do SIG e *S. felis*, antes observado apenas em felinos domésticos, foi isolado pela primeira vez em onças-pintadas e lobo-guará. Todas as espécies avaliadas apresentaram estirpes resistentes a antimicrobianos, o que pode ser um sinal de transmissão de estafilococos ou genes de resistência relacionada à atividade antrópica, já que nenhum dos grupos foi exposto diretamente ao uso de antimicrobianos no período de até um ano anteriormente ao estudo. Com exceção de jabutis e marsupiais, estirpes MDR e MRS foram observadas nas demais espécies, principalmente em roedores e pombos, animais sinantrópicos com extenso contato com seres humanos e animais domésticos. Os resultados aqui encontrados apontam que os animais silvestres podem atuar como potenciais reservatórios e disseminadores de estafilococos resistentes a antimicrobianos, e reforçam a necessidade de estudos epidemiológicos que monitorem a vida selvagem quanto à dispersão de agentes patogênicos e determinantes de resistência a antimicrobianos.

6.5 REFERÊNCIAS

- ALMEIDA, L.R. DE; SOUZA, J.G.R. DE; SANTOS, H.A.; TORRES, E.J.L.; VILELA, R. DO V.; CRUZ, O.M.S.; RODRIGUES, L.; PEREIRA, C.A. DE J.; MALDONADO JUNIOR, A.; LIMA, W. DOS S.; ALMEIDA, L.R. DE; SOUZA, J.G.R. DE; SANTOS, H.A.; TORRES, E.J.L.; VILELA, R. DO V.; CRUZ, O.M.S.; RODRIGUES, L.; PEREIRA, C.A. DE J.; MALDONADO JUNIOR, A.; LIMA, W. DOS S. *Angiostrongylus minasensis* n. sp.: new species found parasitizing coatis (*Nasua nasua*) in an urban protected area in Brazil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v.29, 2020. DOI: 10.1590/s1984-29612019103.
- ANDRADE-OLIVEIRA, A.L.; ROSSI, C.C.; SOUZA-SILVA, T.; DEMARVAL, M.G. *Staphylococcus nepalensis*, a commensal of the oral microbiota of domestic cats, is a reservoir of transferrable antimicrobial resistance. **Microbiology**, v. 166, n. 8, p. 727–734. 2020. DOI: 10.1099/mic.0.000940.
- ARGUDÍN, M.; DEPLANO, A.; MEGHRAOUI, A.; DODÉMONT, M.; HEINRICHS, A.; DENIS, O.; NONHOFF, C.; ROISIN, S. Bacteria from Animals as a Pool of Antimicrobial Resistance Genes. **Antibiotics**, v.6, p.12, 2017. DOI: 10.3390/antibiotics6020012.
- BAQUERO, F.; MARTÍNEZ, J.-L.; CANTÓN, R. Antibiotics and antibiotic resistance in water environments. **Current Opinion in Biotechnology, Energy biotechnology / Environmental biotechnology**. v.19, p.260–265, 2008. DOI: 10.1016/j.copbio.2008.05.006.
- BAUER, H.; PACKER, C.; FUNSTON, P.F.; HENSCHER, P.; NOWELL, K. *Panthera leo* (errata version published in 2017). **The IUCN Red List of Threatened Species** 2016. DOI:10.2305/IUCN.UK.2016.
- BECKER, K.; HEILMANN, C.; PETERS, G. Coagulase-negative staphylococci. **Clinical Microbiology Reviews**, v.27, p.870–926, 2014. DOI: 10.1128/CMR.00109-13.
- BEISIEGEL, B.M. Notes on the coati, *Nasua nasua* (Carnivora: Procyonidae) in an Atlantic Forest area. **Brazilian Journal of Biology**, v.61, p.689–692, 2001. DOI: 10.1590/S1519-69842001000400020.
- BOTH, A.; HUANG, J.; QI, M.; LAUSMANN, C.; WEISSELBERG, S.; BÜTTNER, H.; LEZIUS, S.; FAILLA, A.V.; CHRISTNER, M.; STEGGER, M.; GEHRKE, T.; BAIG, S.; CITAK, M.; ALAWI, M.; AEPFELBACHER, M.; ROHDE, H. Distinct clonal lineages and within-host diversification shape invasive *Staphylococcus epidermidis* populations. **PLoS pathogens**, v.17, p.e1009304, 2021. DOI: 10.1371/journal.ppat.1009304.
- CARDOSO-BRITO, V.; RAPOSO, A.C.S.; PIRES, T.T.; PINNA, M.H.; ORIÁ, A.P. Conjunctival bacterial flora and antimicrobial susceptibility of captive and free-living sea turtles in Brazil. **Veterinary Ophthalmology**, v.22, p.246–255, 2019. DOI: <https://doi.org/10.1111/vop.12584>.

CENTER FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION (CDC). Reptiles and amphibians/Healthy pets, healthy people, 2019. Available from: <https://www.cdc.gov/healthypets/pets/reptiles.html>. Accessed: Nov. 26, 2020.

CERBO, A. DI; PEZZUTO, F.; GUIDETTI, G.; CANELLO, S.; CORSI, L. Tetracyclines: Insights and Updates of their Use in Human and Animal Pathology and their Potential Toxicity. **The Open Biochemistry Journal**, v.13, 2019. DOI: 10.2174/1874091X01913010001.

CHEUNG, G.Y.C.; BAE, J.S.; OTTO, M. Pathogenicity and virulence of *Staphylococcus aureus*. **Virulence**, v.12, p.547–569, 2021. DOI: 10.1080/21505594.2021.1878688.

CHIARELLO, A.G.; AGUIAR, L.M.S.; CERQUEIRA, R.; MELO, F.R.; RODRIGUES, F.H.G.; SILVA, V.M.F. **Mamíferos ameaçados de extinção no Brasil**. p. 681-885. In: Machado, A.B.M.; Drummond, G.M.; Paglia, A.P. (Orgs.). Livro vermelho da fauna brasileira ameaçada de extinção. MMA, Fundação Biodiversitas. 2008. 1420 p.

CHROBAK-CHMIEL, D.; KWIECIEŃ, E.; GOLKE, A.; DOLKA, B.; ADAMCZYK, K.; BIEGAŃSKA, M.J.; SPINU, M.; BINEK, M.; RZEWUSKA, M. Pigeons as Carriers of Clinically Relevant Multidrug-Resistant Pathogens—A Clinical Case Report and Literature Review. **Frontiers in Veterinary Science**, v.8, 2021.

CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE (CLSI). Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing. 31st ed. CLSI supplement M100; ISBN 978-1-68440-105-5. **Clinical and Laboratory Standards Institute**, USA, 2021.

CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE (CLSI). Performance Standards for Antimicrobial Disk and Dilution Susceptibility Tests for Bacteria Isolated From Animals. 5th ed. CLSI supplement VET01S; ISBN 978-1-68440-093-5. **Clinical and Laboratory Standards Institute**, USA, 2020.

COSTA, G.B.; RIBEIRO DE ALMEIDA, L.; CERQUEIRA, A.G.R.; MESQUITA, W.U.; SILVA DE OLIVEIRA, J.; MIRANDA, J.B.; SARAIVA-SILVA, A.T.; ABRAHÃO, J.S.; DRUMOND, B.P.; KROON, E.G.; PEREIRA, P.L.L.; SOARES, D.F. DE M.; TRINDADE, G. DE S. Vaccinia Virus among Domestic Dogs and Wild Coatis, Brazil, 2013-2015. **Emerging Infectious Diseases**, v.24, p.2338–2342, 2018. DOI: 10.3201/eid2412.171584.

DAVIES, J.; DAVIES, D. Origins and Evolution of Antibiotic Resistance. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v.74, p.417–433, 2010. DOI: 10.1128/MMBR.00016-10.

DI IANNI, F.; DODI, P.L.; CABASSI, C.S.; PELIZZONE, I.; SALA, A.; CAVIRANI, S.; PARMIGIANI, E.; QUINTAVALLA, F.; TADDEI, S. Conjunctival flora of clinically normal and diseased turtles and tortoises. **BMC veterinary research**, v.11, p.91, 2015. DOI: 10.1186/s12917-015-0405-x.

DI LALLO, G.; D'ANDREA, M.M.; SENNATI, S.; THALLER, M.C.; MIGLIORE, L.; GENTILE, G. Evidence of Another Anthropic Impact on *Iguana delicatissima* from the Lesser Antilles: The Presence of Antibiotic Resistant Enterobacteria. **Antibiotics (Basel, Switzerland)**, v.10, p.885, 2021. DOI: 10.3390/antibiotics10080885.

DUIJKEREN, E. VAN; IKAWATY, R.; BROEKHUIZEN-STINS, M.J.; JANSEN, M.D.; SPALBURG, E.C.; NEELING, A.J. DE; ALLAART, J.G.; NES, A. VAN; WAGENAAR, J.A.; FLUIT, A.C. Transmission of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains between different kinds of pig farms. **Veterinary Microbiology**, v.126, p.383–389, 2008. DOI: 10.1016/j.vetmic.2007.07.021.

EBANI, V.V. Domestic reptiles as source of zoonotic bacteria: A mini review. **Asian Pacific Journal of Tropical Medicine**, v.10, p.723–728, 2017. DOI: 10.1016/j.apjtm.2017.07.020.

ESSON, C.; SKERRATT, L.F.; BERGER, L.; MALMSTEN, J.; STRAND, T.; LUNDKVIST, Å.; JÄRHULT, J.D.; MICHAUX, J.; MIJDDORJ, T.N.; BAYRAKÇISMITH, R.; MISHRA, C.; JOHANSSON, Ö. Health and zoonotic Infections of snow leopards *Panthera unica* in the South Gobi desert of Mongolia. **Infection Ecology & Epidemiology**, v.9, p.1604063, 2019. DOI: 10.1080/20008686.2019.1604063.

ESTEVAM, L.G.T.M.; FONSECA JUNIOR, A.A.; SILVESTRE, B.T.; HEMETRIO, N.S.; ALMEIDA, L.R.; OLIVEIRA, M.M.; SILVA, S.M.; RIBEIRO, M.F.B.; SILVEIRA, J. A. G. Seven years of evaluation of ectoparasites and vector-borne pathogens among ring-tailed coatis in an urban park in southeastern Brazil. **Veterinary Parasitology, Regional Studies and Reports**, v.21, p.100442, 2020. DOI: 10.1016/j.vprsr.2020.100442.

FESSLER, A.T.; THOMAS, P.; MÜHLDORFER, K.; GROBBEL, M.; BROMBACH, J.; EICHHORN, I.; MONECKE, S.; EHRLICH, R.; SCHWARZ, S. Phenotypic and genotypic characteristics of *Staphylococcus aureus* isolates from zoo and wild animals. **Veterinary Microbiology**, v.218, p.98–103, 2018. DOI: 10.1016/j.vetmic.2018.03.020.

FOX, J.G.; GE, Z.; WHARY, M.T.; ERDMAN, S.E.; HORWITZ, B.H. *Helicobacter hepaticus* infection in mice: models for understanding lower bowel inflammation and cancer. **Mucosal Immunology**, v.4, p.22–30, 2011. DOI: 10.1038/mi.2010.61.

FRANCISCO, A.P.; VAZ, C.; MONTEIRO, P.T.; MELO-CRISTINO, J.; RAMIREZ, M.; CARRIÇO, J.A. PHYLOViZ: phylogenetic inference and data visualization for sequence based typing methods. **BMC bioinformatics**, v.13, p.87, 2012. DOI: 10.1186/1471-2105-13-87.

FURNESS, L.E.; CAMPBELL, A.; ZHANG, L.; GAZE, W.H.; MCDONALD, R.A. Wild small mammals as sentinels for the environmental transmission of antimicrobial resistance. **Environmental Research**, v.154, p.28–34, 2017. DOI: 10.1016/j.envres.2016.12.014.

FUTAGAWA-SAITO, K.; BA-THEIN, W.; FUKUYASU, T. High occurrence of multi-antimicrobial resistance in *Staphylococcus intermedius* isolates from healthy and diseased dogs and domesticated pigeons. **Research in Veterinary Science**, v.83, p.336–339, 2007. DOI: 10.1016/j.rvsc.2007.01.013.

GAZE, W.; O'NEILL, C.; WELLINGTON, E.; HAWKEY, P. Antibiotic resistance in the environment, with particular reference to MRSA. **Advances in Applied Microbiology**, v.63, p.249–280, 2008. DOI: 10.1016/S0065-2164(07)00007-X.

- GE, J.; ZHONG, X.; XIONG, Y.; QIU, M.; HUO, S.; CHEN, X.; MO, Y.; CHENG, M.; CHEN, Q. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* among urban rodents, house shrews, and patients in Guangzhou, Southern China. **BMC Veterinary Research**, v.15, p.260, 2019. DOI: 10.1186/s12917-019-2012-8.
- GREIG, J.; RAJIĆ, A.; YOUNG, I.; MASCARENHAS, M.; WADDELL, L.; LEJEUNE, J. A Scoping Review of the Role of Wildlife in the Transmission of Bacterial Pathogens and Antimicrobial Resistance to the Food Chain. **Zoonoses and Public Health**, v.62, p.269–284, 2015. DOI: 10.1111/zph.12147.
- GRÖNTHAL, T.; EKLUND, M.; THOMSON, K.; PIIPARINEN, H.; SIRONEN, T.; RANTALA, M. 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, p.1021–1030, 2017. DOI: 10.1093/jac/dkw559.
- HEILMANN, C.; ZIEBUHR, W.; BECKER, K. Are coagulase-negative staphylococci virulent? **Clinical Microbiology and Infection**, v.25, p.1071–1080, 2019. DOI: 10.1016/j.cmi.2018.11.012.
- HEMETRIO, N.S. Levantamento Populacional e Manejo de Quatis (PROCYONIDAE: Nasua nasua) no Parque das Mangabeiras, Belo Horizonte, MG. p.120, [s.d.].
- HIMSWORTH, C.G.; MILLER, R.R.; MONTOYA, V.; HOANG, L.; ROMNEY, M.G.; AL-RAWAHI, G.N.; KERR, T.; JARDINE, C.M.; PATRICK, D.M.; TANG, P.; WEESE, J.S. Carriage of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* by Wild Urban Norway Rats (*Rattus norvegicus*). **PLoS ONE**, v.9, 2014. DOI: 10.1371/journal.pone.0087983.
- HOSOYA, S.; KUTSUNA, S.; SHIOJIRI, D.; TAMURA, S.; ISAKA, E.; WAKIMOTO, Y.; NOMOTO, H.; OHMAGARI, N. Leuconostoc lactis and *Staphylococcus nepalensis* Bacteremia, Japan. **Emerging Infectious Diseases**, v.26, p.2283–2285, 2020. DOI: 10.3201/eid2609.191123.
- HOSSAIN, S.; DE SILVA, B.C.J.; DAHANAYAKE, P.S.; HEO, G.-J. Phylogenetic relationships, virulence and antimicrobial resistance properties of *Klebsiella* sp. isolated from pet turtles in Korea. **Letters in Applied Microbiology**, v.70, p.71–78, 2020. DOI: 10.1111/lam.13245.
- HUIJBERS, P.M.C.; BLAAK, H.; JONG, M.C.M. DE; GRAAT, E.A.M.; VANDENBROUCKE-GRAULS, C.M.J.E.; RODA HUSMAN, A.M. DE. Role of the Environment in the Transmission of Antimicrobial Resistance to Humans: A Review. **Environmental Science & Technology**, v.49, p.11993–12004, 2015. DOI: 10.1021/acs.est.5b02566.
- INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA (IBGE). População de animais de estimação no Brasil (ABINPET), 2013. Available from: <https://www.gov.br/agricultura/pt-br/assuntos/camaras-setoriais-tematicas/documentos/camaras-tematicas/insumos-agropecuarios/anos-anteriores/ibge->

populacao-de-animais-de-estimacao-no-brasil-2013-abinpet-79.pdf/view. Accessed: Nov. 26, 2020.

IPPOLITO, G.; LEONE, S.; LAURIA, F.N.; NICASTRI, E.; WENZEL, R.P. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: the superbug. **International journal of infectious diseases: IJID: official publication of the International Society for Infectious Diseases**, v.14 Suppl 4, p.S7-11, 2010. DOI: 10.1016/j.ijid.2010.05.003.

IVES, A.-K.; ANTAKI, E.; STEWART, K.; FRANCIS, S.; JAY-RUSSELL, M.T.; SITHOLE, F.; KEARNEY, M.T.; GRIFFIN, M.J.; SOTO, E. Detection of *Salmonella enterica* Serovar Montevideo and Newport in Free-ranging Sea Turtles and Beach Sand in the Caribbean and Persistence in Sand and Seawater Microcosms. **Zoonoses and Public Health**, v.64, p.450–459, 2017. DOI: 10.1111/zph.12324.

JAHAN, N.A.; LINDSEY, L.L.; LARSEN, P.A. The Role of Peridomestic Rodents as Reservoirs for Zoonotic Foodborne Pathogens. **Vector-Borne and Zoonotic Diseases**, 2020. DOI: 10.1089/vbz.2020.2640.

JEE, H.; PAKHRIN, B.; BAE, I.-H.; SHIN, N.-S.; LEE, S.-I.; YOO, H.-S.; KIM, D.-Y. Pyelonephritis associated with *Staphylococcus intermedius* in a Siberian tiger (*Panthera tigris altaica*). **The Journal of Veterinary Medical Science**, v.69, p.851–852, 2007. DOI: 10.1292/jvms.69.851.

JOBINS, S.E.; ALEXANDER, K.A. From whence they came—antibiotic-resistant *Escherichia coli* in african wildlife. **Journal of Wildlife Diseases**, v.51, p.811–820, 2015. DOI: 10.7589/2014-11-257.

KRAPF, M.; MÜLLER, E.; REISSIG, A.; SLICKERS, P.; BRAUN, S.D.; MÜLLER, E.; EHRLICH, R.; MONECKE, S. Molecular characterisation of methicillin-resistant *Staphylococcus pseudintermedius* from dogs and the description of their SCCmec elements. **Veterinary Microbiology**, v.233, p.196–203, 2019. DOI: 10.1016/j.vetmic.2019.04.002.

KUTKOWSKA, J.; TURSKA-SZEWCZUK, A.; KUCHARCZYK, M.; KUCHARCZYK, H.; ZALEWSKA, J.; URBANIK-SYPNIEWSKA, T. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and glycopeptide-resistant enterococci in fecal samples of birds from South-Eastern Poland. **BMC Veterinary Research**, v.15, p.472, 2019. DOI: 10.1186/s12917-019-2221-1.

LABORDA, P.; SANZ-GARCÍA, F.; OCHOA-SÁNCHEZ, L.E.; GIL-GIL, T.; HERNANDO-AMADO, S.; MARTÍNEZ, J.L. Wildlife and Antibiotic Resistance. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v.12, p.873989, 2022. DOI: 10.3389/fcimb.2022.873989.

LAWAL, O.U.; FRAQUEZA, M.J.; BOUCHAMI, O.; WORNING, P.; BARTELS, M.D.; GONÇALVES, M.L.; PAIXÃO, P.; GONÇALVES, E.; TOSCANO, C.; EMPER, J.; URBAŚ, M.; DOMÍNGUEZ, M.A.; WESTH, H.; LENCASTRE, H. DE; MIRAGAIA, M. Foodborne Origin and Local and Global Spread of *Staphylococcus saprophyticus* Causing Human Urinary Tract Infections. **Emerging Infectious Diseases**, v.27, p.880–893, 2021. DOI: 10.3201/eid2703.200852.

LETUNIC, I.; KHEDKAR, S.; BORK, P. SMART: recent updates, new developments and status in 2020. **Nucleic Acids Research**, v.49, p.D458–D460, 2021. DOI: 10.1093/nar/gkaa937.

MARIN, M. Methicillin resistant *Staphylococcus*. **Medicina**, v.62 Suppl 2, p.30–35, 2002.

MARTÍNEZ, J.L. Natural antibiotic resistance and contamination by antibiotic resistance determinants: the two ages in the evolution of resistance to antimicrobials. **Frontiers in Microbiology**, v.3, p.1, 2012. DOI: 10.3389/fmicb.2012.00001.

MATIAS, C. A. R.; PEREIRA, I.A.; RODRIGUES, D.P.; SICILIANO, S. *Staphylococcus* spp. isolated from wild birds apprehended in the local illegal trade in Rio de Janeiro, Brazil, and relevance in public health. **Letters in Applied Microbiology**, v.67, p.292–298, 2018. DOI: 10.1111/lam.13035.

MATSUDA, N.; MATSUDA, M.; NOTAKE, S.; YOKOKAWA, H.; KAWAMURA, Y.; HIRAMATSU, K.; KIKUCHI, K. Evaluation of a Simple Protein Extraction Method for Species Identification of Clinically Relevant Staphylococci by Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization–Time of Flight Mass Spectrometry. **Journal of Clinical Microbiology**, v.50, p.3862–3866, 2012. DOI: 10.1128/JCM.01512-12.

MELLMANN, A.; BECKER, K.; EIFF, C. VON; KECKEVOET, U.; SCHUMANN, P.; HARMSSEN, D. Sequencing and Staphylococci Identification. **Emerging Infectious Diseases**, v.12, p.333–336, 2006. DOI: 10.3201/eid1202.050962.

MINH, B.Q.; SCHMIDT, H.A.; CHERNOMOR, O.; SCHREMPF, D.; WOODHAMS, M.D.; HAESELER, A. VON; LANFEAR, R. IQ-TREE 2: New Models and Efficient Methods for Phylogenetic Inference in the Genomic Era. **Molecular Biology and Evolution**, v.37, p.1530–1534, 2020. DOI: 10.1093/molbev/msaa015.

MURAKAMI, K.; MINAMIDE, W.; WADA, K.; NAKAMURA, E.; TERAOKA, H.; WATANABE, S. Identification of methicillin-resistant strains of staphylococci by polymerase chain reaction. **Journal of Clinical Microbiology**, v.29, p.2240–2244, 1991. DOI: 10.1128/JCM.29.10.2240-2244.1991.

NASCIMENTO, M.; SOUSA, A.; RAMIREZ, M.; FRANCISCO, A.P.; CARRIÇO, J.A.; VAZ, C. PHYLOViZ 2.0: providing scalable data integration and visualization for multiple phylogenetic inference methods. **Bioinformatics (Oxford, England)**, v.33, p.128–129, 2017. DOI: 10.1093/bioinformatics/btw582.

NOVÁKOVÁ, D.; PANTŮČEK, R.; PETRÁS, P.; KOUKALOVÁ, D.; SEDLÁČEK, I. Occurrence of *Staphylococcus nepalensis* strains in different sources including human clinical material. **FEMS microbiology letters**, v.263, p.163–168, 2006. DOI: 10.1111/j.1574-6968.2006.00408.x.

ORIÁ, A.P.; SILVA, R.M.M.; PINNA, M.H.; OLIVEIRA, A.V.D.; FERREIRA, P.R.B.; MARTINS FILHO, E.F.; MENESES, I.D.S.; REQUIÃO, K.G.; OFRI, R. Ophthalmic diagnostic tests in captive red-footed tortoises (*Chelonoidis carbonaria*) in Salvador,

northeast Brazil. **Veterinary Ophthalmology**, v.18 Suppl 1, p.46–52, 2015. DOI: 10.1111/vop.12175.

OTTO, M. Coagulase-negative staphylococci as reservoirs of genes facilitating MRSA infection: Staphylococcal commensal species such as *Staphylococcus epidermidis* are being recognized as important sources of genes promoting MRSA colonization and virulence. **BioEssays: News and Reviews in Molecular, Cellular and Developmental Biology**, v.35, p.4–11, 2013. DOI: 10.1002/bies.201200112.

PALMA, E.; TILOCCA, B.; RONCADA, P. Antimicrobial Resistance in Veterinary Medicine: An Overview. **International Journal of Molecular Sciences**, v.21, p.1914, 2020. DOI: 10.3390/ijms21061914.

PARQUE MUNICIPAL DAS MANGABEIRAS. Disponível em: <<https://prefeitura.pbh.gov.br/fundacao-de-parques-e-zoobotanica/informacoes/parques/parque-das-mangabeiras>>. Acesso em: 2 abr. 2021.

PARQUE MUNICIPAL JACQUES COUSTEAU. Disponível em: <<https://prefeitura.pbh.gov.br/fundacao-de-parques-e-zoobotanica/informacoes/parques/parque-jacques-cousteau>>. Acesso em: 2 abr. 2021.

PAUL, N.C.; MOODLEY, A.; GHIBAUDO, G.; GUARDABASSI, L. Carriage of Methicillin-Resistant *Staphylococcus pseudintermedius* in Small Animal Veterinarians: Indirect Evidence of Zoonotic Transmission. **Zoonoses and Public Health**, v.58, p.533–539, 2011. DOI: 10.1111/j.1863-2378.2011.01398.x.

PEREZ-SANCHO, M.; GARCÍA-SECO, T.; PORRERO, C.; GARCÍA, N.; GOMEZ-BARRERO, S.; CÁMARA, J.M.; DOMÍNGUEZ, L.; ÁLVAREZ, J. A ten-year-surveillance program of zoonotic pathogens in feral pigeons in the City of Madrid (2005-2014): The importance of a systematic pest control. **Research in Veterinary Science**, v.128, p.293–298, 2020. DOI: 10.1016/j.rvsc.2019.12.006.

PITCHER, D.G.; SAUNDERS, N.A.; OWEN, R.J. Rapid extraction of bacterial genomic DNA with guanidium thiocyanate. **Letters in Applied Microbiology**, v.8, p.151–156, 1989. DOI: 10.1111/j.1472-765X.1989.tb00262.x.

POMBA, C.; RANTALA, M.; GREKO, C.; BAPTISTE, K.E.; CATRY, B.; DUIJKEREN, E. VAN; MATEUS, A.; MORENO, M.A.; PYÖRÄLÄ, S.; RUŽAUSKAS, M.; SANDERS, P.; TEALE, C.; THRELFALL, E.J.; KUNSAGI, Z.; TORREN-EDO, J.; JUKES, H.; TÖRNEKE, K. Public health risk of antimicrobial resistance transfer from companion animals. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v.72, p.957–968, 2017. DOI: 10.1093/jac/dkw481.

QUIGLEY, H.; FOSTER, R.; PETRACCA, L.; PAYAN, E.; SALOM, R.; HARMSSEN, B. *Panthera onca* (errata version published in 2018). **The IUCN Red List of Threatened Species**. 2017. DOI:10.2305/IUCN.UK.2017-3.RLTS.T15953A50658693.en.

RAMOS, C.P.; SANTANA, J.A.; MORCATTI COURA, F.; XAVIER, R.G.C.; LEAL, C.A.G.; OLIVEIRA JUNIOR, C.A.; HEINEMANN, M.B.; LAGE, A.P.; LOBATO, F.C.F.; SILVA, R.O.S. Identification and Characterization of *Escherichia coli*, *Salmonella* Spp.,

Clostridium perfringens, and *C. difficile* Isolates from Reptiles in Brazil. **BioMed Research International**, v.2019, 2019. DOI: 10.1155/2019/9530732.

ROCHA-E-SILVA, R.C. DA; MACIEL, W.C.; TEIXEIRA, R.S. DE C.; SALLES, R.P.R. O pombo (*Columba livia*) como agente carreador de *Salmonella* spp. e as implicações em saúde pública. **Arquivos do Instituto Biológico**, v.81, p.189–194, 2014. DOI: 10.1590/1808-1657000702012.

SASAKI, T.; TSUBAKISHITA, S.; TANAKA, Y.; SAKUSABE, A.; OHTSUKA, M.; HIROTAKI, S.; KAWAKAMI, T.; FUKATA, T.; HIRAMATSU, K. Multiplex-PCR method for species identification of coagulase-positive staphylococci. **Journal of Clinical Microbiology**, v.48, p.765–769, 2010. DOI: 10.1128/JCM.01232-09.

SILVA, R.O.S.; ALMEIDA, L.R.; OLIVEIRA JUNIOR, C.A.; LIMA, P.C.S.; SOARES, D.F.M.; PEREIRA, P.L.L.; SILVA, I.J.; LOBATO, F.C.F. Isolation and genotyping of *Clostridium perfringens* from free-living south american coati (*Nasua nasua*). **Journal of Zoo and Wildlife Medicine: Official Publication of the American Association of Zoo Veterinarians**, v.47, p.333–336, 2016. DOI: 10.1638/2014-0189.1.

SILVA, R.O.S.; RIBEIRO DE ALMEIDA, L.; OLIVEIRA JUNIOR, C.A.; MAGALHÃES SOARES, D.F. DE; PEREIRA, P.L.L.; RUPNIK, M.; LOBATO, F.C.F. Carriage of *Clostridium difficile* in free-living South American coati (*Nasua nasua*) in Brazil. **Anaerobe**, v.30, p.99–101, 2014. DOI: 10.1016/j.anaerobe.2014.09.012.

SMITH, J.T.; ANDAM, C.P. Extensive Horizontal Gene Transfer within and between Species of Coagulase-Negative *Staphylococcus*. **Genome Biology and Evolution**, v.13, p.evab206, 2021. DOI: 10.1093/gbe/evab206.

SOLYMAN, S.M.; BLACK, C.C.; DUIM, B.; PERRETEN, V.; DUIJKEREN, E. VAN; WAGENAAR, J.A.; EBERLEIN, L.C.; SADEGHI, L.N.; VIDELA, R.; BEMIS, D.A.; KANIA, S.A. Multilocus sequence typing for characterization of *Staphylococcus pseudintermedius*. **Journal of Clinical Microbiology**, v.51, p.306–310, 2013. DOI: 10.1128/JCM.02421-12.

SPINELLI, T.P.; OLIVEIRA-FILHO, E.F.; SILVA, D.; MOTA, R.; SÁ, F.B. SHORT COMMUNICATION: Normal aerobic bacterial conjunctival flora in the Crab-eating raccoon (*Procyon cancrivorus*) and Coati (*Nasua nasua*) housed in captivity in pernambuco and paraiba (Northeast, Brazil): Normal aerobic bacterial conjunctival flora in the Crab-eating raccoon and Coati. **Veterinary Ophthalmology**, v.13, p.134–136, 2010. DOI: 10.1111/j.1463-5224.2009.00728.x.

SWEENEY, M.T.; LUBBERS, B.V.; SCHWARZ, S.; WATTS, J.L. Applying definitions for multidrug resistance, extensive drug resistance and pandrug resistance to clinically significant livestock and companion animal bacterial pathogens. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v.73, p.1460–1463, 2018. DOI: 10.1093/jac/dky043.

TADDEI, S.; DODI, P.L.; IANNI, F.D.; CABASSI, C.S.; CAVIRANI, S. Conjunctival flora of clinically normal captive green iguanas (*Iguana iguana*). **Veterinary Record**, v.167, p.29–30, 2010. DOI: 10.1136/vr.b4868.

TARSITANO, E.; GRECO, G.; DECARO, N.; NICASSIO, F.; LUCENTE, M.S.; BUONAVOGLIA, C.; TEMPESTA, M. Environmental monitoring and analysis of faecal contamination in an urban setting in the city of Bari (Apulia region, Italy): health and hygiene implications. **International Journal of Environmental Research and Public Health**, v.7, p.3972–3986, 2010. DOI: 10.3390/ijerph7113972.

TEIXEIRA, R. H. F.; AMBROSIO, S. R. Carnivora – Procyonidae (Quati, Mão-pelada e Jupará). In: CUBAS, Z. S.; SILVA, J. C. R.; CATÃO-DIAS, J. L. Tratado de Animais Selvagens: Medicina Veterinária. 2. ed. São Paulo: Roca, 2014. 2470 p.

TORRES-MEJÍA, A.M.; BLANCO-PEÑA, K.; RODRÍGUEZ, C.; DUARTE, F.; JIMÉNEZ-SOTO, M.; ESPERÓN, F. Zoonotic Agents in Feral Pigeons (*Columba livia*) from Costa Rica: Possible Improvements to Diminish Contagion Risks. **Vector-Borne and Zoonotic Diseases**, v.18, p.49–54, 2018. DOI: 10.1089/vbz.2017.2131.

TURNER, N.A.; SHARMA-KUINKEL, B.K.; MASKARINEC, S.A.; EICHENBERGER, E.M.; SHAH, P.P.; CARUGATI, M.; HOLLAND, T.L.; FOWLER, V.G. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: an overview of basic and clinical research. **Nature Reviews. Microbiology**, v.17, p.203–218, 2019. DOI: 10.1038/s41579-018-0147-4.

WALTHER, B.; TEDIN, K.; LÜBKE-BECKER, A. Multidrug-resistant opportunistic pathogens challenging veterinary infection control. **Veterinary Microbiology**, v.200, p.71–78, 2017. DOI: 10.1016/j.vetmic.2016.05.017.

WIDERSTRÖM, M.; WISTRÖM, J.; FERRY, S.; KARLSSON, C.; MONSEN, T. Molecular epidemiology of *Staphylococcus saprophyticus* isolated from women with uncomplicated community-acquired urinary tract infection. **Journal of Clinical Microbiology**, v.45, p.1561–1564, 2007. DOI: 10.1128/JCM.02071-06.

WIELER, L.H.; WALTHER, B.; VINCZE, S.; GUENTHER, S.; LÜBKE-BECKER, A. Infections With Multidrug-Resistant Bacteria—Has the Post-Antibiotic Era Arrived in Companion Animals? Em: SING, A. (Ed.). **Zoonoses - Infections Affecting Humans and Animals**. Dordrecht: Springer Netherlands, 2015. p.433–452. DOI: 10.1007/978-94-017-9457-2_17.

YANG, D.; WANG, S.; SUN, E.; CHEN, Y.; HUA, L.; WANG, X.; ZHOU, R.; CHEN, H.; PENG, Z.; WU, B. A temperate Siphoviridae bacteriophage isolate from Siberian tiger enhances the virulence of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* through distinct mechanisms. **Virulence**, v.13, p.137–148, 2022. DOI: 10.1080/21505594.2021.2022276.

VANDZUROVA, A.; BACKOR, P.; JAVORSKY, P.; PRISTAŠ, P. *Staphylococcus nepalensis* in the guano of bats (*mammalia*). **Veterinary Microbiology** v.164, p.116-121, 2013. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2013.01.043>

WORLD HEALTH ORGANISATION (WHO). Antimicrobial resistance: global report on surveillance 2014. Geneva, Switzerland: World Health Organisation, 2014.

6.6 AGRADECIMENTOS

Agradecemos às agências de fomento CNPq, Fapemig, CAPES, PRPq-UFMG e INCT. Agradecemos a todos os colaboradores da Escola de Veterinária pela captura e coleta de amostras dos pombos. Nossos agradecimentos à Fundação de Parques Municipais da Prefeitura de Belo Horizonte, ao Centro de Triagem de Animais Silvestres do IBAMA e à equipe do Projeto Quatis. Os mais valiosos agradecimentos a todos os professores, estudantes e profissionais que contribuíram para a captura e amostragem dos pombos, roedores, marsupiais, quatis, canídeos, felídeos e jabutis que foram incluídos neste estudo. Agradecemos ao Gustavo Canesso Bicalho por sua valiosa contribuição na elaboração dos diversos mapas.

7. CONSIDERAÇÕES FINAIS

O presente estudo confirmou que *S. pseudintermedius* é a principal espécie de estafilococos colonizando e infectando cães em Belo Horizonte, Minas Gerais. A alta taxa de MDR observada, especialmente cepas MRSP-MDR, tanto em animais doentes quanto naqueles internados na UTI, é de grande preocupação. O estudo com animais infectados revelou a circulação de isolados CC71 e de novos STs em clínicas veterinárias. Os novos STs encontrados nos cães infectados 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 ST71 em cães doentes, além de revelar novos STs em circulação no país. Além disso, este também é o primeiro estudo brasileiro a avaliar o perfil de colonização e resistência a antimicrobianos em cães internados em uma UTI, cujos achados hipotetizam que clones de MRSP e MRSA podem estar circulando e sendo transmitidos no ambiente da UTI do HV-UFMG. A caracterização molecular das estirpes encontradas é necessária para confirmação das hipóteses levantadas. Por fim, os dois estudos realizados com cães apontam para a importância de se implementar programas de vigilância, protocolos de controle e prevenção de infecções e monitoramento rigoroso do uso de antimicrobianos para combater a disseminação de estirpes MDR, incluindo MRSP e MRSA, em hospitais e clínicas veterinárias.

Este trabalho traz informações inéditas sobre o perfil de colonização e resistência a antimicrobianos de estafilococos isolados de pombos, roedores, marsupiais, quatis, canídeos e felídeos silvestres em cativeiro, e jabutis no Brasil. Os resultados permitiram concluir que as

espécies de animais silvestres avaliadas aqui são colonizadas por diferentes espécies de estafilococos, todas elas já relatadas anteriormente em infecções de seres humanos e animais. Quatis e lobos-guarás foram sugeridos como hospedeiros naturais do SIG. *S. felis*, antes observado apenas em felinos domésticos, foi isolado pela primeira vez em onças-pintadas e lobo-guará. Todas as espécies avaliadas apresentaram estirpes resistentes a antimicrobianos, o que pode ser um sinal de transmissão de estafilococos ou genes de resistência relacionada à atividade antrópica, já que nenhum dos grupos foi exposto diretamente ao uso de antimicrobianos. Com exceção de jabutis e marsupiais, estirpes MDR e MRS foram observadas nas demais espécies, principalmente em roedores e pombos, animais sinantrópicos com extenso contato com seres humanos e animais domésticos. Os resultados aqui encontrados apontam que os animais silvestres podem atuar como potenciais reservatórios e disseminadores de estafilococos resistentes a antimicrobianos, e reforçam a necessidade de estudos epidemiológicos que monitorem a vida selvagem quanto à dispersão de agentes patogênicos e determinantes de resistência a antimicrobianos.

8. ANEXOS – ARTIGOS PUBLICADOS E PRODUTOS DA TESE

8.1 Artigo: SANTANA, J.A.; COLOMBO, S.A.; SILVA, B.A.; DINIZ, A.N.; ALMEIDA, L.R. DE; OLIVEIRA JUNIOR, C.A.; LOBATO, F.C.F.; SOUZA TRINDADE, G. DE; PAGLIA, A.P.; SILVA, R.O.S. *Clostridioides difficile* and multi-drug-resistant staphylococci in free-living rodents and marsupials in parks of Belo Horizonte, Brazil. Brazilian Journal of Microbiology, 2021. DOI: 10.1007/s42770-021-00640-x.

8.2 Artigo: SANTANA, J.A.; SILVA, B.A.; TREVIZANI, N.A.B.; SOUZA, A.M.A. E; LIMA, G.M.N. DE; FURTADO, N.R.M.; LOBATO, F.C.F.; SILVA, R.O.S. Isolation and antimicrobial resistance of coagulase-negative staphylococci recovered from healthy tortoises in Minas Gerais, Brazil. Ciência Rural, v.52, p.e20210354, 2022. DOI: 10.1590/0103-8478cr20210354.

8.3 Artigo: VIEGAS, F.M.; SANTANA, J.A.; SILVA, B.A.; XAVIER, R.G.C.; BONISSON, C.T.; CÂMARA, J.L.S.; RENNÓ, M.C.; CUNHA, J.L.R.; FIGUEIREDO, H.C.P.; LOBATO, F.C.F.; SILVA, R.O.S. Occurrence and characterization of methicillin-resistant *Staphylococcus* spp. in diseased dogs in Brazil. PLOS ONE, v.17, p.e0269422, 2022. DOI: 10.1371/journal.pone.0269422.

8.4 Artigo: SANTANA, J.A.; RAMOS, C.P.; SILVA, B.A.; LIMA, G.K.; COMERLATO, A.T.; ARAÚJO, A.C.; COLOMBO, S.A.; BICALHO, G.C.; SILVA, R.O.S. Identification and characterization of pathogenic and multidrug-resistant bacteria in feral pigeons surrounding a veterinary hospital in Minas Gerais, Brazil. Ciência Rural, v.53, 2022. DOI: 10.1590/0103-8478cr20220244.

8.5 Artigo de divulgação científica: SANTANA, J.A.; ZANON, I.P.; SOUZA, T.G.V.; SILVA, R.O.S. Bactérias resistentes a antimicrobianos em hospitais veterinários: um desafio crescente. Cadernos Técnicos de Veterinária e Zootecnia, v.104, p.55-85, 2022.

8.6 Premiação CISPVET: CÂMARA, J.L.S.; SANTANA, J.A.; BONISSON, C.T.; VIEGAS, F.M.; SILVA, R.O.S. Distribution and prevalence of multi-drug-resistant *Staphylococcus* in infected dogs at ufmg veterinary hospital. Anais do II Congresso Ibero Americano de Saúde Pública Veterinária – II CISPVET, 2020.

8.7 Relevância acadêmica: CÂMARA, J.L.S.; SANTANA, J.A.; VIEGAS, F.M.; SILVA, B.A.; LOBATO, F.C.F.; SILVA, R.O.S. Perfil de resistência aos antimicrobianos de estirpes de *Staphylococcus pseudintermedius* isoladas de quadros infecciosos de cães. XXIX Semana de Iniciação Científica da UFMG, 2020

8.8 Relevância acadêmica: ZANON, I.P.; MESQUITA, C.A.L.; OLIVEIRA, G.S.O.; MELO, I.M.S.M.; SANTANA, J.A.; XAVIER, R.G.C.; SILVA, R.O.S. Distribuição e resistência antimicrobiana de estafilococos isolados de quatis de vida livre em minas gerais, Brasil. IX Colóquio Técnico Científico de Saúde Única, Ciências Agrárias e Meio Ambiente, 2022.

8.9 Menção honrosa: ZANON, I.P.; MESQUITA, C.A.L.; OLIVEIRA, G.S.O.; MELO, I.M.S.M.; SANTANA, J.A.; XAVIER, R.G.C.; SILVA, R.O.S. Distribuição e resistência antimicrobiana de estafilococos isolados de quatis de vida livre em minas gerais, Brasil. IX Colóquio Técnico Científico de Saúde Única, Ciências Agrárias e Meio Ambiente, 2022.



Clostridioides difficile and multi-drug-resistant staphylococci in free-living rodents and marsupials in parks of Belo Horizonte, Brazil

Jordana Almeida Santana¹ · Salene Angelini Colombo¹ · Brendhal Almeida Silva¹ · Amanda Nádia Diniz¹ · Lara Ribeiro de Almeida² · Carlos Augusto Oliveira Junior¹ · Francisco Carlos Faria Lobato¹ · Giliane de Souza Trindade² · Adriano Pereira Paglia² · Rodrigo Otávio Silveira Silva¹

Received: 2 June 2021 / Accepted: 21 October 2021
© Sociedade Brasileira de Microbiologia 2021

Abstract

The global emergence of antimicrobial resistance (AMR) has become a serious threat to human and animal health. Recent studies have shown that synanthropic animals can act as reservoirs and disseminators of pathogens and resistant bacteria. The aim of this study was to evaluate the frequency, distribution, and antimicrobial susceptibility of staphylococcal species and *Clostridioides difficile* isolated from the feces of free-living rodents and marsupials from two urban parks in Belo Horizonte, Brazil. During a 12-month period, fecal samples from 159 free-living animals, including 136 rodents and 23 marsupials, were collected from two urban parks in Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil. *Staphylococcus* spp. were more likely to be isolated from rodents than marsupials ($p=0.0164$). Eight different staphylococcal species were isolated from 36 (26.5%) rodents and one marsupial (4.3%). *S. saprophyticus* (48.6%) was the most frequently isolated species, and almost a quarter of the isolates (24.3%) were resistant to at least one antimicrobial agent, four (10.8%) of which were multi-drug resistant (MDR). Two (5.4%) strains were resistant to cefoxitin and were then classified as methicillin-resistant staphylococci, and one also tested positive for the *mecA* gene. *C. difficile* was isolated from two rodents (1.5%), and one strain was toxigenic and classified as ribotype 064. One isolate was resistant to rifampicin, but both strains were susceptible to all other antimicrobials tested, including metronidazole and vancomycin. All *C. difficile* isolates and all staphylococcal strains resistant to antimicrobials were recovered from the same park. The present study suggests that free-living rodents in Belo Horizonte (Brazil) are mainly colonized by *S. saprophyticus* and may act as reservoirs of antimicrobial-resistant *Staphylococcus* spp. and *C. difficile* strains. This is the first study to evaluate the presence of staphylococci and *C. difficile* from free-living opossums and suggest a low fecal shedding of these organisms by these mammals.

Keywords Urban parks · Wild small mammals · Methicillin resistance · Antimicrobial resistance · *S. saprophyticus*

Introduction

The global emergence of antimicrobial resistance (AMR) has become a serious threat to human and animal health due to the widespread use of antimicrobials. However, there has been a significant increase in reports of AMR in bacteria

isolated from environments and animals that have not been exposed to direct selective pressure from these agents [1]. Horizontal gene transfer between bacteria has been identified as an explanation for this phenomenon [2] and, in this context, staphylococci are highlighted as excellent carriers and transferors of resistance genes [3, 4] causing a wide variety of diseases in humans and animals [5–7].

Over the years, staphylococci and AMR have been extensively investigated in humans and domestic animals, but there are limited studies on wild and pest species, particularly in developing countries [8, 9]. It is known that some pest species can act as reservoirs for antimicrobial-resistant bacteria, transmitting and disseminating these microorganisms by different routes, including feces and urine [10].

✉ Rodrigo Otávio Silveira Silva
rodrigo.otaviosilva@gmail.com

¹ Veterinary School, Federal University of Minas Gerais, Antônio Carlos Avenue, 6627, Belo Horizonte, MG 31270-901, Brazil

² Institute of Biological Sciences, Federal University of Minas Gerais, Antônio Carlos Avenue, Belo Horizonte, MG 662731270-901, Brazil

Clostridioides (prev. *Clostridium*) *difficile* is an emergent pathogen responsible for antimicrobial-associated diarrhea in humans. In the last decade, animals and the environment have been suggested as possible reservoirs of *C. difficile* strains [11]. Recent studies in Canada and European countries have shown that rats and mice are sources of *C. difficile* in both urban and farm environments [12–15]. The role of other peridomestic rodents, including *Cerradomys* and *Necromys* spp., as reservoirs of *C. difficile* strains, has not been addressed.

Given the notable lack of data on the carriage and antimicrobial resistance profile of potentially pathogenic staphylococci and *C. difficile* in wild animals living in urban areas in Brazil, this study evaluated the frequency, distribution, and antimicrobial susceptibility patterns of staphylococcal species and *C. difficile* isolated from the feces of free-living rodents and marsupials from two urban parks in Belo Horizonte, Brazil.

Material and methods

Capture sites

The capture was conducted in two urban parks in Belo Horizonte (Minas Gerais, Brazil). Park 1 was “Jacques Cousteau Municipal Park” (19°58' S and 43°59' W), with a total area of 335 thousand square meters. Park 2, “Mangabeiras Municipal Park” (19°56' S and 43°54' W), has a total area of 2.4 million square meters (Fig. 1). Previous studies on *C. difficile*, *Vaccinia virus*, and different ectoparasites and endoparasites in free-living South American coatis (*Nasua nasua*) have been performed in park 2 [16–19]. In park 1, currently only one study on the abundance and diversity of amphibians has been conducted [20].

These parks serve as recreation centers and leisure areas for the population and usually receive a large number of visitors every day throughout the year. Park 1 is located completely inside the city. The space functioned as a landfill for Belo Horizonte for 20 years (1951–1971), and then transformed into a park and horticultural garden for the production of tree and plant seedlings used for city landscaping. The site has springs and perennial watercourses that are impacted by sewage effluent from the city [21]. Park 2 is considered one of the largest urban parks in Brazil with approximately fifteen thousand visitors per month. It is located in an urban area in contact with some of the city's neighborhoods, but it is surrounded by native vegetation and other environmental preservation areas. It has water springs around and throughout, but the courses are not impacted by wastewater [22].

Animals sampled

A total of 159 free-living animals, including 136 rodents and 23 marsupials, were sampled between April 2018 and March 2019 (Table 1). For the capture, two transects were established for park 1 and three transects for park 2. Each transect had fifteen collection stations 20 m apart from each other. The stations contained a Sherman trap for capturing small rodents and marsupials, and a cage trap with suspended bait for capturing larger animals, totaling thirty traps on each transect. Each transect was surveyed once per day. The bait used was a mixture of sardines, peanuts, bananas, and corn bran. The traps were baited at the time of the survey, in the morning, between 08:00 and 09:00, on each collection day. The collections occurred for 5 consecutive days, every 2 months, totaling six campaigns in each park over a period of 1 year.

After capture, the animals were weighed. They were then anesthetized with a combination of 2% xylazine (rodents, 10 mg/kg, IP; marsupials, 5 mg/kg, IM) and ketamine hydrochloride (rodents, 100 mg/kg, IP; marsupials, 25 mg/kg, IM). After sedation, fecal samples were collected directly from the rectal ampoule of the marsupials. These animals were marked with ear tags to prevent multiple samples from the same animal, and released at the same capture site. The rodents were euthanized with an overdose of propofol (10 mg/kg) via the intracardiac route, and intestinal contents were collected from the rectum (feces) during necropsy.

The fecal samples were placed in a sterile microtube, stored in a transport box with ice packs, and transported to the Bacteriosis and Research Laboratory of the Veterinary School of the Federal University of Minas Gerais (UFMG), where they were stored at –80 °C until laboratory processing. This study was approved by the Ethical Committee on Animal Use (CEUA) of UFMG under protocol 306/2017 and by Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade (ICMBio) under protocol 12,989–2.

Staphylococci isolation and antimicrobial susceptibility

For *Staphylococcus* spp. isolation, fecal samples were suspended in 0.85% saline solution and 100 µL was streaked onto mannitol salt agar (MSA; Difco Laboratories Inc., USA) that was then incubated at 37 °C for 24 h [23]. Colonies were subcultured on brain heart infusion agar (BHI, Difco Laboratories Inc., USA) and identified by matrix-assisted laser desorption/ionization-time of flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS; Bruker Daltonics, Germany). The cutoff log score of 2 was used to validate

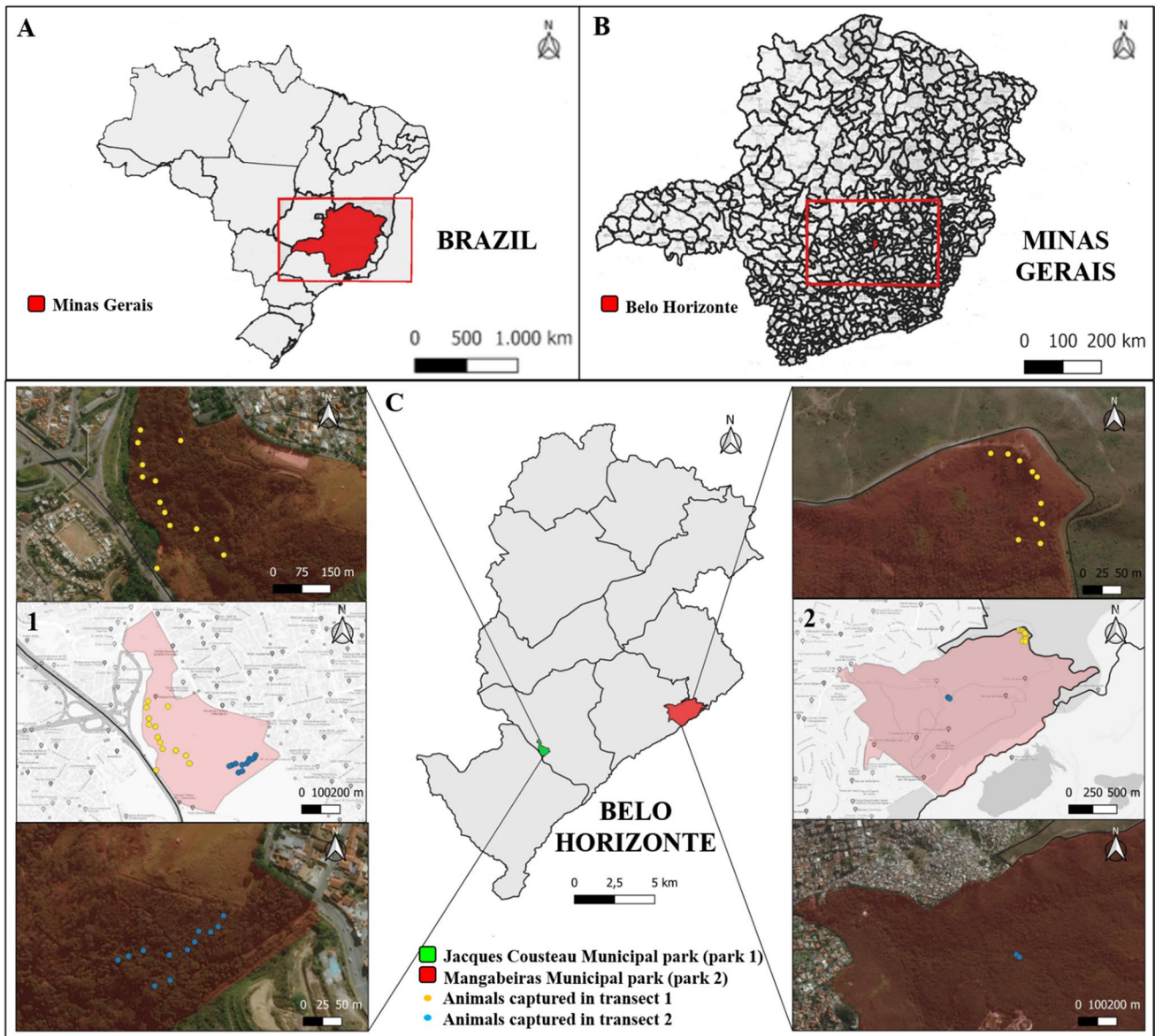


Fig. 1 Mapping of parks 1 and 2 located in the city of Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil. (A) Map of Brazil with the location of the Minas Gerais state. (B) Map of Minas Gerais state with the location of Belo Horizonte. (C1) Jacques Cousteau Municipal Park (park

1). (C2) Mangabeiras Municipal Park (park 2). Yellow and blue dots represent the locations where animals were captured in transects 1 and 2, respectively.

Source: <http://bhmap.pbh.gov.br/v2/home.html>

identification at the species level, as recommended by the manufacturer. The strains were then subjected to DNA extraction [24] and methicillin-resistant staphylococci were investigated by detection of the *mecA* gene [25]. Antimicrobial susceptibility tests were performed using disk diffusion in agar, according to the Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) documents M100-S30 [26] and VET08 [27]. The following antimicrobials were tested: cefoxitin (30 μ g), penicillin (10 units), tetracycline (30 μ g), trimethoprim/sulfamethoxazole (25 μ g), chloramphenicol (30 μ g), erythromycin (15 μ g), clindamycin

(2 μ g), gentamicin (10 μ g), and ciprofloxacin (5 μ g) (DME, BRA). *Staphylococcus aureus* ATCC 25,923 was used as a control. Isolates were considered multidrug-resistant (MDR) when resistant to three or more classes of antimicrobial agents [28].

Clostridioides difficile isolation and antimicrobial susceptibility

For *C. difficile* isolation, fecal samples were incubated in 96% ethanol for 30 min (1:1) and aliquots of 10 μ L were plated on

Table 1 Frequency and distribution of rodents and marsupials captured in the Jacques Cousteau Municipal Park (park 1) and Mangabeiras Municipal Park (park 2) in Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil

Animals	Common name (Specie)			Total	
		² Park 1	³ Park 2	Sum	Group
Rodents	Genus <i>Cerradomys</i>	29	10	39	136 (85.5%)
	New world mice (<i>Necromys lasiurus</i>)	34	4	38	
	Black rat (<i>Rattus rattus</i>)	37	0	37	
	¹ Order Rodentia	18	4	22	
Marsupials	White-eared opossum (<i>Didelphis albiventris</i>)	3	9	12	23 (14.5%)
	Black-eared opossum (<i>Didelphis aurita</i>)	0	6	6	
	Gray-slender opossum (<i>Marmosops incanus</i>)	0	5	5	
Total		121 (76.1%)	38 (23.9%)	159 (100%)	159 (100%)

¹Some rodents were not classified by genus and species and were categorized as members of the order Rodentia

²Park 1 (19°58'S and 43°59'W)

³Park 2 (19°56'S and 43°54'W)

cycloserine-cefoxitin fructose agar (CCFA) supplemented with 7% horse blood and 0.1% sodium taurocholate (Sigma, USA) [29]. After incubation in an anaerobic atmosphere at 37 °C for 96 h, *C. difficile* colonies (flat, irregular, and with ground-glass appearance) were subjected to a multiplex PCR to identify the housekeeping gene (*tpi*) and the virulence genes of toxin A (*tdcA*), toxin B (*tdcB*), and binary toxin (*cdtB*) [30]. Toxigenic *C. difficile* isolates were also subjected to PCR ribotyping, as previously described [31]. The minimal inhibitory concentrations (MIC) of metronidazole, vancomycin, clindamycin, moxifloxacin, ciprofloxacin, erythromycin, rifampicin, and tetracycline were determined using Etest strips (bioMerieux, Marcy l'Etoile, France) in *Brucella* agar (Oxoid, USA) with 5% lysed blood, supplemented with hemin (Difco Laboratories, USA) and vitamin K (Sigma-Aldrich Co., USA). The MIC values were interpreted according to the clinical breakpoints of the CLSI and EUCAST guidelines [32–34].

Statistical analysis

The association between phenotypic resistance and *Staphylococcus* species was evaluated using the chi-square or Fisher's exact tests. The chi-square test for adherence was used to evaluate the distribution of variables. All statistical analyses were performed using GraphPad Prism v.8 (GraphPad Software, San Diego, CA, USA). Differences were considered significant at $p < 0.05$.

Results

Marsupial and rodent species captured

A total of 159 free-living animals, including 136 rodents and 23 marsupials, were sampled over a 1-year period (Table 1).

The number of animals sampled in park 1 (76.1%) was approximately three times higher than that in park 2 (23.9%) ($p < 0.001$). In park 1, rodents were captured more frequently (97.5%) than marsupials (2.5%), with black rats (*Rattus rattus*) the most commonly collected (31.4%) (Table 1). Among marsupials, only the white-eared opossum (*Didelphis albiventris*) was trapped. In park 2, the capture frequency was 52.6% for marsupials and 47.4% for rodents. The main representatives of marsupials and rodents in this park were white-eared opossum (*Didelphis albiventris*) (45%) and the genus *Cerradomys* (55.5%), respectively (Table 1). For marsupials (Table 1), the frequency of capture of these animals was higher (52.6%) and more species diversity was observed in park 2 than in park 1 (2.5%) ($p < 0.001$).

Staphylococcal isolation and identification

Overall, staphylococci were isolated from 36 out of 136 (26.5%) tested rodents, with one animal presenting two isolates with different *Staphylococcus* species (Table 1S). Among the 37 staphylococci isolates, 35 (94.5%) were from park 1, and only two were from park 2. There was no statistically significant difference in staphylococcal carriage by rodent species (Table 2). There was also no difference in the frequency of isolation in different seasonal periods (rain and drought) (Table 1S). Only one isolate (4.3%) was recovered from marsupials, specifically from a black-eared opossum (*Didelphis aurita*) captured in park 2. Staphylococci were more frequently isolated from rodents than from marsupials ($p = 0.0164$).

Eight different staphylococcal species were detected in rodents, with *S. saprophyticus* (48.6%) being isolated significantly more frequently than the other species ($p < 0.001$) (Table 2). *S. aureus* was isolated from three animals (8.1%). For marsupials, the only strain isolated was identified

Table 2 Frequency and distribution of staphylococcal species isolated from free-living rodents ($n=136$) from two urban parks in Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil

Isolate	<i>Cerradomys</i> sp. ($n=39$)	<i>Necromys lasiurus</i> ($n=38$)	<i>Rattus rattus</i> ($n=37$)	Rodentia ¹ ($n=22$)	Total of isolates
<i>S. saprophyticus</i>	6	4	6	2	18 (48.6%) ^a
<i>S. xylosus</i>	0	6	0	0	6 (16.2%) ^b
<i>S. aureus</i>	2	0	1	0	3 (8.1%) ^b
<i>S. sciuri</i>	1	1	1	0	3 (8.1%) ^b
<i>S. epidermidis</i>	0	1	1	0	2 (5.4%) ^b
<i>S. succinus</i>	0	0	1	0	1 (2.7%) ^b
<i>S. warneri</i>	0	1	0	0	1 (2.7%) ^b
<i>Staphylococcus</i> sp. ²	0	1	2	0	3 (8.1%) ^b
Total of isolates/rodent	9 (23.8%) ^a	14 (36.8%) ^{ab}	12 (32.4%) ^{ab}	2 (9.1%) ^b	37 (100%)

*Multiple comparison: different letters indicate significant differences

¹Some rodents were not classified by genus and species and were categorized as members of the order Rodentia

² Only genus classification was considered for strains with scores ≤ 2 in MALDI-TOF, as recommended by the manufacturer

as *S. saprophyticus*, which was susceptible to all tested antimicrobials.

Staphylococcus spp. antimicrobial susceptibility

Nine (6.6%) rodents harbored antimicrobial-resistant staphylococci, all from park 1, and of the 37 isolates, nine (24.3%) were resistant to at least one antimicrobial agent. Four (10.8%) were classified as MDR, two (5.4%) of which were resistant to cefoxitin, and were classified as methicillin-resistant staphylococci. One of these isolates was positive for *mecA* (Table 3). Penicillin G had the highest frequency of resistance (24.3%), followed by erythromycin (8.1%), cefoxitin (5.4%), and clindamycin (5.4%). Resistance to penicillin G (cefloxitin/clindamycin: $p=0.04$; others: $p=0.002$) was significantly higher than that of the other tested antimicrobial agents, except for erythromycin ($p=0.11$). However, no significant differences were found in resistance to erythromycin and other antimicrobials. All isolates were susceptible

to chloramphenicol, ciprofloxacin, gentamicin, tetracycline, and trimethoprim/sulfamethoxazole. All rodent species in the present study showed at least one antimicrobial resistant isolate, and no statistical difference was found between these species ($p=0.15$). In addition, there was no difference in the frequency of resistant isolates among transects in each park ($p=0.24$) or between the parks ($p=0.6$).

Clostridioides difficile isolation and antimicrobial susceptibility

C. difficile was isolated from two (1.7%) animals, both rodents from park 1. No association was observed between rodent species and the isolation of *C. difficile*. One strain was toxigenic (A + B + CDT-) and was classified as ribotype 064, while the other isolate was non-toxigenic (A-B-CDT-). The non-toxigenic *C. difficile* isolated in the present study was resistant to rifampicin (MIC 3.0 mg/mL). The two isolates were susceptible to all other seven antimicrobials tested.

Table 3 Characterization of staphylococcal isolates that showed antimicrobial resistance

Animal	Park	Transect	Animal	<i>Staphylococcus</i> sp.	<i>mecA</i> gene	Resistance phenotype*
JC07	1	1	Black rat (<i>Rattus rattus</i>)	<i>S. epidermidis</i>	No	PEN
JC11	1	1	Black rat (<i>Rattus rattus</i>)	<i>S. saprophyticus</i>	No	PEN
JC49	1	1	Black rat (<i>Rattus rattus</i>)	<i>S. aureus</i>	No	PEN; ERY; CLI
JC26	1	2	Genus <i>Cerradomys</i>	<i>S. saprophyticus</i>	No	PEN; ERY; CLI
JC50.2	1	2	New world mice (<i>Necromys lasiurus</i>)	<i>S. warneri</i>	No	PEN
JC54	1	2	New world mice (<i>Necromys lasiurus</i>)	<i>S. xylosus</i>	No	PEN
JC81	1	2	New world mice (<i>Necromys lasiurus</i>)	<i>S. epidermidis</i>	Yes	PEN; ERY; CEF
JC98	1	2	New world mice (<i>Necromys lasiurus</i>)	<i>S. sciuri</i>	No	PEN
JC121	1	2	Order <i>Rodentia</i>	<i>S. saprophyticus</i>	No	PEN; CEF

*PEN penicillin, ERY erythromycin, CLI clindamycin, CEF cefoxitin

Discussion

Studies have suggested that wild animals living closer to humans and domestic animals may become a threat to public health because they harbor and disseminate pathogens and MDR microorganisms, including *Staphylococcus* spp. and *C. difficile* [10, 35]. However, there are few investigations on the role of rodents and marsupials in urban areas, especially in Brazil. Thus, the present study evaluated the presence of *C. difficile* and MDR staphylococci among rodents and marsupials from two urban parks in Belo Horizonte, Brazil.

Two parks were used to trap and sample rodents and marsupials. Several differences were observed in the animals sampled from each park. First, the number of animals sampled in park 1 was almost three times higher than that in park 2. In addition, differences in the species captured were also observed; black rats were the most common rodent trapped in park 1, but this animal was not captured in park 2. In contrast, the frequency and diversity of marsupials were higher in park 2 than in park 1. Ecological aspects are the main hypotheses for these differences, since park 1 is substantially smaller (335 thousand square meters versus 2.4 million square meters), is completely surrounded by urban environment (Fig. 1), has experiencing a rapidly growing of vertical urbanization, and has sewage effluent present in its waterways [21]. This environment seems more attractive to synanthropic rodents, including black rats, while the more conserved area observed in park 2 might favor the trapping of marsupials [36–38].

S. saprophyticus was the most frequently recovered species from rodents in the present study (Table 2). Staphylococcal species in rodents vary considerably between studies, with *S. xylosus*, *S. succinus*, and *S. sciuri* being the most frequently noted [39–41]. Interestingly, *S. saprophyticus* was only reported in a few animals in one study on bank voles (*Myodes glareolus*) conducted in Poland [39]. In a public health context, it is also important to remember that *S. saprophyticus* is the second highest cause of urinary tract infections in women, including in Brazil, and is typically classified as a human colonizer [42–47]. Although less frequently, *S. aureus* (8.1%) and *S. epidermidis* (5.4%) were also detected in the present study. These two species are commonly found in human microbiota and are well-known opportunistic pathogens that can cause serious infections in humans and animals [48–50].

Overall, the incidence of staphylococci in rodents in this study (27.2%) was much lower than that reported by other authors, which is generally more than 75% [39, 41]. Differences in rodent species were observed in these studies, and differences in host ecology, such as food, geographical location, and contact with different anthropogenic sources

may have contributed to this large variation in carriage rate [51, 52].

Only one isolate of *S. saprophyticus* (4.3%) was recovered from marsupials, and rodents appeared to be more prone to staphylococcal colonization than marsupials ($p = 0.01$). The only study published to date that evaluated the distribution of staphylococci in marsupials, specifically in the nasal swabs of Australian wallabies (*Petrogale xanthopus*, *Petrogale lateralis*, and *Macropus eugenii*), reported a much higher isolation rate than this study, reaching 90.8%. In addition, fourteen species of staphylococci were recovered, with *S. delphini* and *S. succinus* being the predominant species. *S. saprophyticus*, also isolated in the present study, was recovered from 4.5% of the animals evaluated [53]. In that study, 70% of the wallabies lived in captivity, and the authors attributed the high frequency of isolation and diversity of staphylococcal species to environmental selection pressure and anthropogenic activity.

Staphylococci are known for their capacity to carry and disseminate antimicrobial resistance determinants, which contribute to their pathogenic potential [4, 54, 55]. In the present study, 24.3% of the rodent isolates, all from park 1, were resistant to at least one tested antimicrobial agent, including three isolates classified as MDR, one of which was also classified as methicillin-resistant *Staphylococcus*. Penicillin G and erythromycin, two drugs widely used in human and veterinary medicine, had the highest resistance rate. These results demonstrate that these rodents, although not directly exposed to antimicrobial agents, can harbor and disseminate resistant bacteria. Only animals from park 1, which is more anthropized and contains sewage effluent, showed antimicrobial resistance. It is possible that this resistance is acquired by the contact of the animals with waterways contaminated with waste from sewage effluent. Sewage effluent is known to harbor several resistant microorganisms and consequently provides a route for horizontal transfer of resistance genes, which is the main hypothesis for the higher rate of AMR in rodents in park 1 than in park 2 [52, 56–58].

The high incidence of potentially pathogenic staphylococci to humans, as well as the high rate of AMR, including methicillin-resistant and other MDR staphylococci, is of concern mainly for park 1. Methicillin-resistant staphylococci confer resistance to at least all beta-lactam antimicrobials, which excludes most of the first-choice treatment options for both animals and humans, substantially reducing therapeutic alternatives [57]. There are several reports on the colonization and infection of companion animals that transmit methicillin-resistant staphylococci and MDR [59–61], showing the relevance of studies monitoring the occurrence of these resistant bacteria in animals.

The isolation rate of *C. difficile* in the present study (1.5%) was lower than that reported previously with urban rodents,

which varied between 4.3 and 35% [13, 62, 63] and with rodents trapped in or around farms, which returned between 24 and 39.2% [63, 64]. A previous study from 2014 with South American coati (*Nasua nasua*) in park 2 also reported a low isolation rate (6.5%) of *C. difficile* [16], whereas all animals sampled in park 2 were negative for *C. difficile* in the present study. It is believed that pests reflect environmental contamination with *C. difficile* spores [65], and therefore this difference among findings is expected, suggesting that both parks have low *C. difficile* contamination.

One of the *C. difficile* strains was toxigenic and classified as ribotype 064. *C. difficile* ribotypes associated with CDI in Brazil are still largely unknown because of the lack of large-scale studies [66]. RT064 currently has not been reported in either humans or animals in Brazil, including studies specifically in Belo Horizonte, the same city where the two parks are located [66–68]. RT064 has previously been reported in animals elsewhere [69] and has also been shown to infect humans [70, 71].

Resistance to rifampicin was detected in a non-toxigenic *C. difficile* strain, but both isolates were susceptible to all other antimicrobials tested. This result contrasts with other studies with rodents, which showed high rates of MDR *C. difficile* strains isolated from rodents [65]. At the same time, the detection of non-toxigenic strains resistant to rifampicin contributes to the growing concern regarding the role of non-toxigenic strains, including isolates from rodents, in the spread of resistance patterns of *C. difficile*, which was previously only focused on toxigenic isolates [65, 72].

Conclusion

In conclusion, the present work suggests that free-living rodents in Belo Horizonte (Brazil) are commonly colonized by *S. saprophyticus* and can harbor MDR and methicillin-resistant *Staphylococcus* strains. *C. difficile* strains with antimicrobial resistance and those from a ribotype previously reported in humans were also recovered from these animals. With regard to marsupials, this is the first study to evaluate the colonization and antimicrobial resistance profile of staphylococci isolated from the feces of free-living opossums, and despite the small sample size, the results suggest low fecal elimination of staphylococci by these animals.

Supplementary Information The online version contains supplementary material available at <https://doi.org/10.1007/s42770-021-00640-x>.

Acknowledgements We thank Fundação de Parques Municipais da prefeitura de Belo Horizonte, including Jacques Cousteau Municipal Park and Mangabeiras Municipal Park, for the support and animal samples. We thank Gustavo Canesso Bicalho for his valuable contribution in the making of the map of the evaluated parks. We also thank CAPES, CNPq, FAPEMIG, and PRPq/UFGM for all the financial support.

Author contribution All authors contributed to the study conception and design. Material preparation and samples collection were performed by Salene Angelini Colombo, Lara Ribeiro de Almeida, and Brendhal Almeida Silva. Laboratory analysis were performed by Jordana Almeida Santana, Salene Angelini Colombo, Brendhal Almeida Silva, Amanda Nádia Diniz, and Carlos Augusto Oliveira Junior. The first draft of the manuscript was written by Jordana Almeida Santana, Rodrigo Otávio Silveira Silva, Giliane de Souza Trindade, Adriano Pereira Paglia, and Francisco Carlos Faria Lobato. All authors read and approved the final manuscript.

Funding This work was supported by funds from the Coordination for the Improvement of Higher Education Personnel (CAPES–Prêmio CAPES 2015–0774/2017), the National Council for Scientific and Technological Development (CNPq-406402/2018–3), Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG-PQ-00524–17), and Pró-Reitoria de Pesquisa da Universidade Federal de Minas Gerais (PRPq/UFGM) and the MCTIC/FNDCT-CNPq/MEC-CAPES/Grant 440593/2016–6.

Data availability The datasets generated during the current study are available from the corresponding author on reasonable request.

Code availability Not applicable.

Declarations

Ethics approval This study was approved by the Ethical Committee on Animal Use (CEUA) of the Federal University of Minas Gerais under protocol 306/2017 and by the Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade (ICMBio) under protocol 12989–2.

Consent to participate Not applicable.

Consent for publication Not applicable.

Conflict of interest The authors declare no competing interests.

References

- Allen HK, Donato J, Wang HH, Cloud-Hansen KA, Davies J, Handelsman J (2010) Call of the wild: antibiotic resistance genes in natural environments. *Nat Rev Microbiol* 8:251–259. <https://doi.org/10.1038/nrmicro2312>
- Thomas CM, Nielsen KM (2005) Mechanisms of, and barriers to, horizontal gene transfer between bacteria. *Nat Rev Microbiol* 3:711–721. <https://doi.org/10.1038/nrmicro1234>
- Otto M (2013) Coagulase-negative staphylococci as reservoirs of genes facilitating MRSA infection: Staphylococcal commensal species such as *Staphylococcus epidermidis* are being recognized as important sources of genes promoting MRSA colonization and virulence. *BioEssays: News and Reviews in Molecular, Cellular and Developmental Biology*, 35, 4–11. <https://doi.org/10.1002/bies.201200112>.
- Becker K, Heilmann C, Peters G (2014) Coagulase-negative staphylococci. *Clin Microbiol Rev* 27:870–926. <https://doi.org/10.1128/CMR.00109-13>
- Wieler LH, Ewers C, Guenther S, Walther B, Lübke-Becker A (2011) Methicillin-resistant staphylococci (MRS) and extended-spectrum beta-lactamases (ESBL)-producing Enterobacteriaceae in companion animals: nosocomial infections as one reason for the rising prevalence of these potential zoonotic pathogens in clinical

- samples. International Journal of Medical Microbiology: IJMM 301:635–641. <https://doi.org/10.1016/j.ijmm.2011.09.009>
6. Walther B, Tedin K, Lübke-Becker A (2017) Multidrug-resistant opportunistic pathogens challenging veterinary infection control. *Vet Microbiol* 200:71–78. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2016.05.017>
 7. Heilmann C, Ziebuhr W, Becker K (2019) Are coagulase-negative staphylococci virulent? *Clinical Microbiology and Infection: The Official Publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*, 25, 1071–1080, <https://doi.org/10.1016/j.cmi.2018.11.012>.
 8. Himsworth CG, Miller RR, Montoya V, Hoang L, Romney MG, Al-Rawahi GN, Kerr T, Jardine CM, Patrick DM, Tang P, Weese JS (2014) Carriage of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* by wild urban Norway rats (*Rattus norvegicus*). *PLoS ONE* 9:e87983. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0087983>
 9. Ge J, Zhong XS, Xiong YQ, Qiu M, Huo ST, Chen XJ, Mo Y, Cheng MJ, Chen Q (2019) Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* among urban rodents, house shrews, and patients in Guangzhou. *Southern China BMC Veterinary Research* 15:260. <https://doi.org/10.1186/s12917-019-2012-8>
 10. Jahan NA, Lindsey LL, Larsen PA (2021) The role of peridomestic rodents as reservoirs for zoonotic foodborne pathogens. *Vector Borne Zoonotic Dis* 21:133–148. <https://doi.org/10.1089/vbz.2020.2640>
 11. Smits WK, Lyras D, Lacy DB, Wilcox MH, Kuijper EJ (2016) *Clostridium difficile* infection. *Nat Rev Dis Primers* 2:16020. <https://doi.org/10.1038/nrdp.2016.20>
 12. Burt SA, Siemeling L, Kuijper EJ, Lipman LJ (2012) Vermin on pig farms are vectors for *Clostridium difficile* PCR ribotypes 078 and 045. *Vet Microbiol* 160:256–258. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2012.05.014>
 13. Himsworth CG, Patrick DM, Mak S, Jardine CM, Tang P, Weese JS (2014) Carriage of *Clostridium difficile* by wild urban Norway rats (*Rattus norvegicus*) and black rats (*Rattus rattus*). *Appl Environ Microbiol* 80:1299–1305. <https://doi.org/10.1128/AEM.03609-13>
 14. Jardine CM, Reid-Smith RJ, Rousseau J, Weese JS (2013) Detection of *Clostridium difficile* in small and medium-sized wild Mammals in Southern Ontario Canada. *Journal of Wildlife Diseases* 49:418–421. <https://doi.org/10.7589/2012-04-120>
 15. Krijger IM, Meerburg BG, Harmanus C, Burt SA (2019) *Clostridium difficile* in wild rodents and insectivores in the Netherlands. *Lett Appl Microbiol* 69:35–40. <https://doi.org/10.1111/lam.13159>
 16. Silva ROS, Almeida LR, Oliveira CA Jr, Soares DFM, Pereira PLL, Rupnik M, Lobato FCF (2014) Carriage of *Clostridium difficile* in free-living South American coati (*Nasua nasua*) in Brazil. *Anaerobe* 30:99–101. <https://doi.org/10.1016/j.anaerobe.2014.09.012>
 17. Costa GB, Ribeiro de Almeida L, Cerqueira AGR, Mesquita WU, Silva de Oliveira J, Miranda JB, Saraiva-Silva AT, Abrahão JS, Drumond BP, Kroon EG, Pereira PLL, Soares DFM, Trindade GS (2018) Vaccinia virus among domestic dogs and wild coatis, Brazil, 2013–2015. *Emerging Infectious Diseases*, 24, 2338–2342, <https://doi.org/10.3201/eid2412.171584>.
 18. Almeida LR, Souza JGR, Santos HA, Torres EJJ, Vilela RV, Cruz OMS, Rodrigues L, Pereira CAJ, Maldonado A Jr, Lima WS (2020) *Angiostrongylus minasensis* n. sp.: new species found parasitizing coatis (*Nasua nasua*) in an urban protected area in Brazil. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária* 29:e018119. <https://doi.org/10.1590/S1984-29612019103>
 19. Estevam LGTM, Fonseca Junior AA, Silvestre BT, Hemetrio NS, Almeida LR, Oliveira MM, Silva SM, Ribeiro MFB, Silveira JAG (2020) Seven years of evaluation of ectoparasites and vector-borne pathogens among ring-tailed coatis in an urban park in southeastern Brazil. *Veterinary Parasitology, Regional Studies and Reports*, 21, 100442, <https://doi.org/10.1016/j.vprsr.2020.100442>.
 20. Torres PF (2012) Uso de ambientes por anfíbios anuros em seis parques urbanos de Belo Horizonte, Minas Gerais. *Dissertação (Dissertação em Ciências Biológicas) – UFMG. Minas Gerais*, p. 113
 21. Parque Municipal Jacques Cousteau (2019) Disponível em: <https://prefeitura.pbh.gov.br/fundacao-de-parques-e-zoobotanica/informacoes/parques/parque-jacques-cousteau>. Acesso em: 2 abr 2021.
 22. Parque Municipal das Mangabeiras (2020) Disponível em: <https://prefeitura.pbh.gov.br/fundacao-de-parques-e-zoobotanica/informacoes/parques/parque-das-mangabeiras>. Acesso em: 2 abr 2021.
 23. Gómez P, González-Barrio D, Benito D, García JT, Viñuela J, Zarazaga M, Ruiz-Fons F, Torres C (2014) Detection of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) carrying the *mecC* gene in wild small mammals in Spain. *J Antimicrob Chemother* 69:2061–2064. <https://doi.org/10.1093/jac/dku100>
 24. Pitcher DG, Saunders NA, Owen RJ (1989) Rapid extraction of bacterial genomic DNA with guanidium thiocyanate. *Lett Appl Microbiol* 8:151–156. <https://doi.org/10.1111/j.1472-765X.1989.tb00262.x>
 25. Murakami K, Minamide W, Wada K, Nakamura E, Teraoka H, Watanabe S (1991) Identification of methicillin-resistant strains of staphylococci by polymerase chain reaction. *J Clin Microbiol* 29:2240–2244. <https://doi.org/10.1128/JCM.29.10.2240-2244.1991>
 26. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) (2020) Wayne, PA, USA. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing. 30th ed. CLSI supplement M100, 19087
 27. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) (2018) Wayne, PA, USA. Performance standards for antimicrobial disk and dilution susceptibility tests for bacteria isolated from animals. 5th ed. CLSI standard VET01
 28. Sweeney MT, Lubbers BV, Schwarz S, Watts JL (2018) Applying definitions for multidrug resistance, extensive drug resistance and pandrug resistance to clinically significant livestock and companion animal bacterial pathogens. *J Antimicrob Chemother* 73:1460–1463. <https://doi.org/10.1093/jac/dky043>
 29. Silva ROS, Ribeiro MG, Palhares MS, Borges AS, Maranhão RPA, Silva MX, Lucas TM, Olivo G, Lobato FCF (2013) Detection of A/B toxin and isolation of *Clostridium difficile* and *Clostridium perfringens* from foals. *Equine Vet J* 45:671–676. <https://doi.org/10.1111/evj.12046>
 30. Silva ROS, Salvarani FM, Cruz Jr, ECC, Pires PS, Santos RL, Assis RA, Guedes RMC, Lobato FCF (2011) Detection of enterotoxin A and cytotoxin B, and isolation of *Clostridium difficile* in piglets in Minas Gerais, Brazil. *Ciência Rural*, 41, 1430–1435. <https://doi.org/10.1590/S0103-84782011005000100>.
 31. Janezic S, Rupnik M (2010) Molecular typing methods for *Clostridium difficile*: pulsed-field gel electrophoresis and PCR ribotyping. *Methods Mol Biol* 646:55–65. https://doi.org/10.1007/978-1-60327-365-7_4
 32. Pirš T, Avbersek J, Zdovc I, Krt B, Andlovic A, Lejko-Zupanc T, Rupnik M, Ocepek M (2013) Antimicrobial susceptibility of animal and human isolates of *Clostridium difficile* by broth microdilution. *J Med Microbiol* 62:1478–1485. <https://doi.org/10.1099/jmm.0.058875-0>
 33. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) (2015) Wayne, PA, USA. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; Twenty-Fifth Informational Supplement
 34. The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST) (2019) Breakpoint tables for interpretation of MICs and zone diameters. In: *European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases Basel*









35. Himsforth CG, Parsons KL, Jardine C, Patrick DM, Rats C (2013) Rats, cities, People, and pathogens: a systematic review and narrative synthesis of literature regarding the ecology of rat-associated zoonoses in urban centers. *Vector Borne Zoonotic Dis* 13:349–359. <https://doi.org/10.1089/vbz.2012.1195>
36. Feng AYT, Himsforth CG (2014) The secret life of the city rat: a review of the ecology of urban Norway and black rats (*Rattus norvegicus* and *Rattus rattus*). *Urban Ecosystems* 17:149–162. <https://doi.org/10.1007/s11252-013-0305-4>
37. Cáceres NC, Moraes MM, Melo GL, Meloro C, Sponchiado J, Carvalho RS, Bubadué JM (2016) Which factors determine spatial segregation in the South American Opossums (*Didelphis aurita* and *D. albiventris*)? An ecological niche modelling and geometric morphometrics approach. *PLoS ONE*, 11, <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0157723>.
38. Byers KA, Lee MJ, Patrick DM, Himsforth CG (2019) Rats about town: a systematic review of rat movement in urban ecosystems. *Frontiers in Ecology and Evolution*, 7, <https://doi.org/10.3389/fevo.2019.00013>
39. Nagase N, Sasaki A, Yamashita K, Shimizu A, Wakita Y, Kitai S, Kawano J (2002) Isolation and species distribution of staphylococci from animal and human skin. *J Vet Med Sci* 64:245–250. <https://doi.org/10.1292/jvms.64.245>
40. Hauschild T, Kehrenberg C, Schwarz S (2003) Tetracycline resistance in staphylococci from free-living rodents and insectivores. *Journal of Veterinary Medicine B, Infectious Diseases and Veterinary Public Health* 50:443–446. <https://doi.org/10.1046/j.0931-1793.2003.00706.x>
41. Kmeť V, Čuvalová A, Stanko M (2018) Small mammals as sentinels of antimicrobial-resistant staphylococci. *Folia Microbiol* 63:665–668. <https://doi.org/10.1007/s12223-018-0594-3>
42. Latham RH, Running K, Stamm WE (1983) Urinary tract infections in young adult women caused by *Staphylococcus saprophyticus*. *JAMA* 250:3063–3066
43. Von Eiff C, Peters G, Heilmann C (2002) Pathogenesis of infections due to coagulase negative staphylococci. *Lancet Infect Dis* 2:677–685. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(02\)00438-3](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(02)00438-3)
44. Raz R, Colodner R, Kunin CM (2005) Who are you – *Staphylococcus saprophyticus*? Clinical Infectious Diseases: An Official Publication of the Infectious Diseases Society of America 40:896–898. <https://doi.org/10.1086/428353>
45. Fariña N, Carpinelli L, Samudio M, Guillén R, Laspina F, Sanabria R, Abente S, Rodas L, González P, de Kaspar HM (2013) Clinically significant coagulase-negative staphylococci: most frequent species and virulence factors. *Rev Chilena Infectol* 30:480–488. <https://doi.org/10.4067/S0716-10182013000500003>
46. Sousa VS, Rabello RF, Dias RCS, Martins IS, Santos LBG, Alves EM, Riley LW, Moreira BM (2013) Time-based distribution of *Staphylococcus saprophyticus* pulsed field gel-electrophoresis clusters in community-acquired urinary tract infections. *Memorias Do Instituto Oswaldo Cruz* 108:73–76. <https://doi.org/10.1590/s0074-02762013000100012>
47. Lo DS, Shieh HH, Barreira ER, Ragazzi SLB, Gilio AE (2015) High frequency of *Staphylococcus saprophyticus* urinary tract infections among female adolescents. *Pediatr Infect Dis J* 34:1023–1025. <https://doi.org/10.1097/INF.0000000000000780>
48. Weese JS, Van Duijkeren E (2010) Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus pseudintermedius* in veterinary medicine. *Vet Microbiol* 140:418–429. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2009.01.039>
49. Edmiston CE, Mcbain AJ, Kiernan M, Leaper DJ (2016) A narrative review of microbial biofilm in postoperative surgical site infections: clinical presentation and treatment. *J Wound Care* 25:693–702. <https://doi.org/10.12968/jowc.2016.25.12.693>
50. Chalmers SJ, Wylam ME (2020) Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infection and treatment options. In: *Methods in Molecular Biology* Ji, Y. (Ed.). *Methicillin-Resistant Staphylococcus Aureus (MRSA) Protocols: Cutting-Edge Technologies and Advancements*. New York, NY: Springer, 2069, 229–251, https://doi.org/10.1007/978-1-4939-9849-4_16.
51. Yalden DW, Harris S (2008) *Mammals of the British Isles: Handbook*. 4th ed,
52. Furness LE, Campbell A, Zhang L, Gaze WH, McDonald RA (2017) Wild small mammals as sentinels for the environmental transmission of antimicrobial resistance. *Environ Res* 154:28–34. <https://doi.org/10.1016/j.envres.2016.12.014>
53. Chen MMS, Boardman WSJ, Smith I, Egoodman AE, Brown MH (2014) Nasal colonization of *Staphylococcus* spp. among captive and free-ranging wallabies in South Australia. *Journal of Veterinary Science and Medical Diagnosis*, 03. <https://doi.org/10.4172/2325-9590.1000136>.
54. Beims H, Overmann A, Fulde M, Steinert M, Bergmann S (2016) Isolation of *Staphylococcus sciuri* from horse skin infection. *Open Veterinary Journal* 6:242–246. <https://doi.org/10.4314/ovj.v6i3.14>
55. Schoenfelder SMK, Dong Y, Feßler AT, Schwarz S, Schoen C, Köck R, Ziebuhr W (2017) Antibiotic resistance profiles of coagulase-negative staphylococci in livestock environments. *Veterinary Microbiology Resistance* 200:79–87. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2016.04.019>
56. Baquero F, Martínez JL, Cantón R (2008) Antibiotics and antibiotic resistance in water environments. *Curr Opin Biotechnol* 19:260–265. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2008.05.006>
57. Gaze W, O'Neill C, Wellington E, Hawkey P (2008) Antibiotic resistance in the environment, with particular reference to MRSA. *Adv Appl Microbiol* 63:249–280. [https://doi.org/10.1016/S0065-2164\(07\)00007-X](https://doi.org/10.1016/S0065-2164(07)00007-X)
58. Jobbins SE, Alexander KA (2015) From whence they came – antibiotic-resistant *Escherichia coli* in African wildlife. *J Wildl Dis* 51:811–820. <https://doi.org/10.7589/2014-11-257>
59. Van Duijkeren E, Kamphuis M, Van der Mije IC, Laarhoven LM, Duim B, Wagenaar JA, Houwers DJ (2011) Transmission of methicillin-resistant *Staphylococcus pseudintermedius* between infected dogs and cats and contact pets, humans and the environment in households and veterinary clinics. *Vet Microbiol* 150:338–343. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2011.02.012>
60. Paul NC, Moodley A, Ghibaud G, Guardabassi L (2011) Carriage of methicillin-resistant *Staphylococcus pseudintermedius* in small animal veterinarians: indirect evidence of zoonotic transmission. *Zoonoses Public Health* 58:533–539. <https://doi.org/10.1111/j.1863-2378.2011.01398.x>
61. Pomba C, Rantala M, Greko C, Baptiste KE, Catry B, Van Duijkeren E, Mateus A, Moreno MA, Pyörälä S, Ružauskas M, Sanders P, Teale C, Threlfall EJ, Kunsagi Z, Torren-Edo J, Jukes H, Törneke K (2017) Public health risk of antimicrobial resistance transfer from companion animals. *J Antimicrob Chemother* 72:957–968. <https://doi.org/10.1093/jac/dkw481>
62. Williams SH, Che X, Paulick A, Guo C, Lee B, Muller D, Uhlemann AC, Lowy FD, Corrigan RM, Lipkin WI (2018) New York City house mice (*Mus musculus*) as potential reservoirs for pathogenic bacteria and antimicrobial resistance determinants. *mBio*, 9, e00624–18
63. Burt SA, Meijer K, Burggraaf P, Kamerich WS, Harmanus C (2018) Wild mice in and around the city of Utrecht, the Netherlands, are carriers of *Clostridium difficile* but not ESBL-producing Enterobacteriaceae, *Salmonella* spp. or MRSA. *Letters in Applied Microbiology* 67:513–519
64. Krijger IM, Meerburg BG, Harmanus CC, Burt SA (2019) *Clostridium difficile* in wild rodents and insectivores in the Netherlands. *Letters in Applied Microbiology* 69:35–40
65. Andres-Lasheras S, Bolea R, Mainar-Jaime RC, Kuijper E, Sevilla E, Martín-Burriel I, Chirio-Trejo M (2016) Presence of *Clostridium difficile* in pig faecal samples and wild animal species

- associated with pig farms. *J Appl Microbiol* 122:462–472. <https://doi.org/10.1111/jam.13343>
66. Trindade CNR, Domingues RMCP, Ferreira EO (2019) The epidemiology of *Clostridioides difficile* infection in Brazil: a systematic review covering thirty years. *Anaerobe* 58:13–21. <https://doi.org/10.1016/j.anaerobe.2019.03.002>
67. Silva ROS, Rupnik M, Diniz AN, Vilela EG, Lobato FCF (2015) *Clostridium difficile* ribotypes in humans and animals in Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 110:1062–1065. <https://doi.org/10.1590/0074-02760150294>
68. Diniz AN, Oliveira CA Jr, Vilela EG, Figueiredo HCP, Rupnik M, Wilcox MH, Fawley WN, Blanc D, Lobato FCF, Silva ROS (2019) Molecular epidemiology of *Clostridioides* (previously *Clostridium*) *difficile* isolates from a university hospital in Minas Gerais. *Brazil Anaerobe* 56:34–39. <https://doi.org/10.1016/j.anaerobe.2019.01.010>
69. Knight DR, Thean S, Putsathit P, Fenwick S, Riley TV (2013) Cross-sectional study reveals high prevalence of *Clostridium difficile* non PCR ribotype 078 strains in Australian veal calves at slaughter. *Appl Environ Microbiol* 79:2630–2635. <https://doi.org/10.1128/AEM.03951-12>
70. Knight DR, Thean S, Putsathit P, Fenwick S, Riley TV (2013) Cross-sectional study reveals high prevalence of *Clostridium difficile* non-PCR ribotype 078 strains in Australian veal calves at slaughter. *Appl Environ Microbiol* 79:2630–2635. <https://doi.org/10.1128/AEM.03951-12>
71. Alfayyadh M, Collins DA, Tempone S, McCann R, Armstrong PK, Riley TV, Cook A (2019) Recurrence of *Clostridium difficile* infection in the Western Australian population. *Epidemiol Infect* 147:e153. <https://doi.org/10.1017/S0950268819000499>
72. Álvarez-Pérez S, Blanco JL, Peláez T, Lanzarot MP, Harmanus C, Kuijper E, García ME (2015) Faecal shedding of antimicrobial-resistant *Clostridium difficile* strains by dogs. *J Small Anim Pract* 56:190–195. <https://doi.org/10.1111/jsap.12311>

Publisher's note Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Isolation and antimicrobial resistance of coagulase-negative staphylococci recovered from healthy tortoises in Minas Gerais, Brazil

Jordana Almeida Santana¹  Brendhal Almeida Silva¹  Nathalia Abreu Borges Trevizani² 
 Angélica Maria Araújo e Souza²  Grécia Mikhaela Nunes de Lima² 
 Nathalia Rodrigues Martins Furtado²  Francisco Carlos Faria Lobato¹ 
 Rodrigo Otávio Silveira Silva^{1*} 

¹Universidade Federal de Minas Gerais(UFMG), 31270-901, Belo Horizonte, MG, Brasil. E-mail: rodrigo.otaviosilva@gmail.com.*Corresponding author.

²Waita Instituto de Pesquisa e Conservação, Belo Horizonte, MG, Brasil.

ABSTRACT: In the last few decades, there has been a global increase in the adoption of reptiles as companion animals, mainly turtles and tortoises. Considering the popularity of reptiles as pets in Brazil, and a notable lack of data about potentially pathogenic staphylococci in these animals, this study isolated and evaluate the antimicrobial susceptibility of staphylococcal species from healthy tortoises (*Chelonoidis carbonaria*) in Brazil. During a 12-month period (February 2019 to February 2020), cloacal swabs from 66 healthy tortoises were collected at the Wild Animals Screening Center in Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil. The swabs were plated onto mannitol salt agar for staphylococci isolation, and species identification was performed using MALDI-TOF MS. Antimicrobial susceptibility was investigated using the disk diffusion method, and the presence of the *mecA* gene was investigated by PCR to detect methicillin resistance. Of the tested animals, 72.7% were positive for staphylococcal isolation. All isolates were coagulase-negative staphylococci (CoNS), and *Staphylococcus sciuri* (81.3%), and *S. xylosus* (12.5%) were the most frequently isolated species. The majority of the isolates (56%) were resistant to at least one antimicrobial agent. A high frequency of resistance was observed for penicillin (35.5%) and tetracycline (29.1%). All strains were susceptible to ceftiofur, chloramphenicol, ciprofloxacin, erythromycin, and gentamicin. All isolates were negative for the *mecA* gene. The present work suggests that healthy tortoises are mainly colonized by CoNS, especially *S. sciuri*. Half of the isolates were resistant to at least one antimicrobial, raising questions regarding the possible role of these animals as reservoirs of antimicrobial resistance genes.

Key words: reptiles, coagulase-negative staphylococci, *S. sciuri*, *S. xylosus*, *Chelonoidis carbonaria*.

Isolamento e resistência aos antimicrobianos de estafilococos coagulase negativos recuperados de jabutis saudáveis em Minas Gerais, Brasil

RESUMO: Nas últimas décadas, houve um aumento global na adoção de répteis como animais de companhia, principalmente tartarugas e jabutis. Considerando a popularidade dos répteis como animais de estimação no Brasil e a notável falta de dados sobre estafilococos potencialmente patogênicos nesses animais, o objetivo deste estudo foi isolar e avaliar a susceptibilidade antimicrobiana de espécies estafilocócicas de jabutis (*Chelonoidis carbonaria*) saudáveis no Brasil. Durante um período de 12 meses (fevereiro de 2019 a fevereiro de 2020), suabes cloacais de 66 jabutis saudáveis foram coletados no Centro de Triagem de Animais Silvestres em Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil. Os suabes foram plaqueados em ágar manitol salgado para isolamento de estafilococos e a identificação das espécies foi realizada usando MALDI-TOF MS. A susceptibilidade aos antimicrobianos foi investigada pelo método de difusão em disco, e a presença do gene *mecA* foi investigada por PCR para detectar resistência à metilina. Dos animais testados, 72,7% foram positivos para o isolamento estafilocócico. Todos os isolados eram estafilococos coagulase-negativos (CoNS), sendo *Staphylococcus sciuri* (81,3%) e *S. xylosus* (12,5%) as espécies mais frequentemente isoladas. A maioria dos isolados (56%) foi resistente a pelo menos um antimicrobiano. Alta frequência de resistência foi observada para penicilina (35,5%) e tetraciclina (29,1%). Todas as estirpes foram sensíveis à ceftiofur, cloranfenicol, ciprofloxacina, eritromicina e gentamicina. Todos os isolados foram negativos para o gene *mecA*. O presente trabalho sugere que jabutis saudáveis são colonizados principalmente por CoNS, especialmente *S. sciuri*. Metade dos isolados foram resistentes a pelo menos um antimicrobiano, levantando questões sobre o possível papel desses animais como reservatórios de genes de resistência aos antimicrobianos.

Palavras-chave: répteis, estafilococos coagulase-negativos, *S. sciuri*, *S. xylosus*, *Chelonoidis carbonaria*.



INTRODUCTION

In the last few decades, there has been a global increase in the adoption of reptiles as companion animals. According to data issued by the latest census

of companion animals, Brazil has the ninth largest population of reptiles in the world (IBGE, 2013). These exotic pets, especially turtles and tortoises, have gained popularity because of their appearance and complaisant nature (HOSSAIN et al., 2020).

Received 05.05.21 Approved 07.28.21 Returned by the author 10.14.21

CR-2021-0354.R1

Editors: Rudi Weiblen  Juliana Felipetto Cargnelutti 

Despite the increasing popularity of reptiles as pets, studies have demonstrated that these animals represent a potential threat to public health (CDC, 2019; RAMOS et al., 2019). These animals can act as reservoirs and potential disseminators of pathogenic microorganisms, including *Salmonella* spp., pathogenic *Escherichia coli*, and *Leptospira* spp., and can also contribute to the spread of antimicrobial resistance genes (EBANI, 2017; RAMOS et al., 2019).

Staphylococcus spp. are important commensal bacteria, which can cause a wide variety of diseases in both humans and animals, including nosocomial infections (WIELER et al., 2011; WALTHER et al., 2017). The genus is divided into two groups according to production of the coagulase enzyme: coagulase-positive staphylococci (CoPS) and coagulase-negative staphylococci (CoNS). CoPS are responsible for most infections, whereas CoNS represent most commensal staphylococci from different hosts and are involved in infections in a variety of species, including humans (DIMITRIOU et al., 2011; WALLER et al., 2011; BIEROWIEC et al., 2019). In addition to this pathogenic potential, CoNS have the ability to acquire, harbor, and transfer resistance genes to other staphylococci, and even to other bacterial species (OTTO, 2013; BECKER et al., 2014).

Over the years, CoPS and CoNS have been extensively investigated in humans and domestic animals but few studies have been performed in wildlife. There are reports of the colonization and antimicrobial resistance of staphylococci isolated from some wild mammals, birds, and even amphibians (SLAUGHTER et al., 2001; MAMA et al., 2019; RUIZ-RIPA et al., 2020). However, there are limited studies on staphylococci isolated from healthy reptiles, and most of these did not evaluate the antimicrobial resistance of the isolates (TADDEI et al., 2010; DI IANNI et al., 2015; ORÍA et al., 2015; CARDOSO-BRITO et al., 2019).

Given the notable lack of data on the carriage and antimicrobial resistance profile of potentially pathogenic staphylococci in pet reptiles, this research evaluated the frequency, distribution, and antimicrobial-susceptibility patterns of staphylococcal species isolated from healthy tortoises in Brazil.

MATERIALS AND METHODS

Samples

A convenience sampling of 66 apparently healthy tortoises (*Chelonoidis carbonaria*) was conducted over a 12-month period (February 2019

to February 2020). Samples were collected by the veterinary staff of the Wild Animals Screening Center (CETAS) in Belo Horizonte city (Minas Gerais, Brazil), an agency responsible for receiving, rehabilitating, and reintroducing wild animals into their natural environment. The tortoises sampled in this research arrived at the center through voluntary delivery, rescue, or apprehension by surveillance agencies. For sampling procedures, a sterile swab (Cral; Cotia, SP, Brazil) was introduced 5–6 cm into the cloaca and rotated five times, as described by IVES et al. (2017). The swab was placed in a sterile microtube, stored in a transport box with ice packs, and transported to the Bacteriosis and Research Laboratory of the Veterinary School of the Federal University of Minas Gerais (UFMG) for immediate processing. The study was approved by the Ethical Committee on Animal Use (CEUA) of UFMG under protocol 238/2015 and by Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade (ICMBio) under protocol 49195-1.

Staphylococcus sp. isolation and identification

For *Staphylococcus* sp. isolation, swabs were plated onto Mannitol salt agar (Difco, USA) and incubated at 37 °C for 24 h. Morphologically suggestive colonies were isolated on Brain Heart Infusion agar (BHI) (Difco, USA) and identified by matrix-assisted laser desorption/ionization – time of flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS; Bruker Daltonics, Bremen, Germany) using the standard extraction protocol recommended by Bruker (MATSUDA et al., 2012).

Antimicrobial susceptibility and *mecA* detection

Antimicrobial susceptibility tests were performed using disk diffusion in agar, according to the Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) documents M100-S30 (CLSI, 2020) and VET08 (CLSI, 2018). The following antimicrobials were tested: cefoxitin (30 µg), penicillin (10 units), tetracycline (30 µg), trimethoprim/sulfamethoxazole (25 µg), chloramphenicol (30 µg), erythromycin (15 µg), clindamycin (2 µg), gentamicin (10 µg), and ciprofloxacin (5 µg) (DME, BRA). *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 was used as a control strain. Additionally, DNA extraction was performed, according to PITCHER, et al. (1989), and methicillin-resistant staphylococci (MRS) were investigated by detection of the *mecA* gene, as previously described by MURAKAMI et al. (1991).

Statistical analysis

The association between phenotypic resistance and staphylococcal species was evaluated

by chi-square or Fisher's exact tests, using GraphPad Prism v.8 (GraphPad Software, San Diego, CA, USA). Differences were considered significant at $P < 0.05$.

RESULTS

In this study, 48 out of 66 (72.7%) tested tortoises were positive for staphylococcal species (Table 1). All isolates were CoNS and four different species were detected, with *S. sciuri* (81.3%) isolated significantly more frequently than the other species (Table 1) ($P < 0.001$). The frequency of *S. xylosus* was also significantly different from that of *S. kloosii* and *S. saprophyticus* ($P = 0.048$).

Twenty-seven (56.2%) isolates were resistant to at least one antimicrobial agent, while twenty-one (43.8%) were susceptible to all tested antimicrobials. There was a high frequency of resistance to penicillin G (35.5%), followed by tetracycline (29.1%), clindamycin (2%), and trimethoprim/sulfamethoxazole (2%) ($P < 0.05$). Resistance to penicillin G (CLI/SUT: $P < 0.001$; others: $P < 0.001$) and tetracycline (CLI/SUT: $P = 0.0004$; Others: $P < 0.001$) was significantly greater than that of the other tested antimicrobial agents. However, no significant differences were reported in resistance between penicillin G and tetracycline. All isolates were susceptible to cefoxitin, chloramphenicol, erythromycin, gentamicin, and ciprofloxacin.

Table 1 presents the antimicrobial resistance phenotypes of staphylococcal species recovered from healthy tortoises in Brazil. *Staphylococcus sciuri* presented resistance to penicillin G, tetracycline, and clindamycin. *S. xylosus* and *S. kloosii* presented resistance to penicillin G and tetracycline and *S. saprophyticus* presented resistance to tetracycline and

trimethoprim-sulfamethoxazole. All four recovered staphylococcal species had isolates resistant to tetracycline, and all presented isolates with resistance to more than one antimicrobial agent (co-resistance). All isolates were negative for the *mecA* gene.

DISCUSSION

Despite the clear increase in the adoption of reptiles as pets, including tortoises, few studies have focused on the role of these species as a reservoir of bacterial pathogens. To the best of our knowledge, this is the first study to isolate staphylococci from healthy reptiles and investigate their antimicrobial susceptibility. Notably, the incidence of staphylococci in tortoises (72.7%) was similar to that in wild birds (60–75%) and wild mammals (37.7–90.8%) (CHEN et al., 2016; SOUSA et al., 2016; MAMA et al., 2019; RUIZ-RIPA et al., 2020). These results suggested that staphylococci are commensals of the mucous membrane in tortoises, which is similar to previous observations in mammals and birds (NAGASE et al., 2002; SOUSA et al., 2016; RUIZ-RIPA et al., 2020).

All isolates in the present study were identified as CoNS (Table 1). There are limited data on the factors that influence colonization by CoNS. Recently, GARCÍA et al. (2020) suggested that CoPS colonization seems to be more frequent in carnivores, raising the hypothesis of an influence of diet on staphylococcal colonization in animals. Interestingly, tortoises are fed with non-meat-based diets, which could justify the presence of CoNS instead of CoPS isolates.

Staphylococcus sciuri was the predominant species recovered from the sample tortoises, accounting for more than 80% of the isolates (Table 1).

Table 1 - Frequency, distribution, and antimicrobial resistance phenotypes of staphylococcal species recovered from healthy tortoises (n = 66) in Minas Gerais, Brazil.

Species	n (%) [*]	-----Number of antimicrobial resistant isolates-----								
		PEN	TET	CLI	SXT	CEF	ERY	GEN	CIP	CLO
<i>S. sciuri</i>	39 (81.3) ^a	13	10	1	0	0	0	0	0	0
<i>S. xylosus</i>	6 (12.5) ^b	2	2	0	0	0	0	0	0	0
<i>S. kloosii</i>	2 (4.2) ^c	2	1	0	0	0	0	0	0	0
<i>S. saprophyticus</i>	1 (2) ^c	0	1	0	1	0	0	0	0	0
Total	48 (100%)	17 (35.5%)	14 (29.1%)	1 (2%)	1 (2%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)

^{*}Multiple comparison: different letters indicate significant differences.

PEN, penicillin G; TET, tetracycline; CLI, clindamycin; SXT, trimethoprim-sulfamethoxazole; CEF, cefoxitin; ERY, erythromycin; GEN, gentamicin; CIP, ciprofloxacin; CLO, chloramphenicol.

This result was not surprising, as *S. sciuri* is the most common CoNS isolate in other healthy wild animals, including birds, boars, hedgehogs, red foxes, rabbits, badgers, and other mammals (SOUSA et al., 2016; MAMA et al., 2019; GARCÍA et al., 2020; RUIZ-RIPA et al., 2020). Furthermore, this bacterium is known to have a wide range of hosts, is adapted to different habitats (NEMEGHAIRE et al., 2014; GÓMEZ et al., 2017; SCHOENFELDER et al., 2017; RUIZ-RIPA et al., 2020), and has also been reported as the causative agent of occasional, but serious, infections in humans, including endocarditis, peritonitis, urinary tract infections, and septicemia (STEPANOVIĆ et al., 2002; STEPANOVIĆ et al., 2005; SEVERIN et al., 2010). In this context, it is important to remember that bilateral transmission of commensal staphylococci between pets and their owners has been widely reported (BAPTISTE et al., 2005; WEESE et al., 2006; HANSELMAN et al., 2009).

Staphylococcus xylosum, *S. kloosii*, and *S. saprophyticus* were also isolated in the present study; although, at a much lower frequency than *S. sciuri* (Table 1). These species are less pathogenic but opportunistic microorganisms, as are most CoNS (BECKER et al., 2014), and have been reported to colonize and cause infection in humans and some wild and domestic animals (SLAUGHTER et al., 2001; PEER et al., 2011; GIORDANO et al., 2016; SREDNIK et al., 2017). Specifically, *S. saprophyticus* is the second highest cause of urinary tract infections in women and is typically classified as a human colonizer (LATHAM et al., 1983; VON EIFF et al., 2002; RAZ et al., 2005; FARIÑA et al., 2013). Unfortunately, it is unclear if an anthropogenic activity and/or human contact, including manipulation of these animals, have had influenced the isolation rate of *S. saprophyticus* in the present study.

It is important to highlight that CoNS, including *S. sciuri*, are known for their capacity to carry and disseminate antimicrobial resistance

determinants (SCHOENFELDER et al., 2017), which contribute to their pathogenic potential (STEPANOVIĆ et al., 2002; FREY et al., 2013; BEIMS et al., 2016). In the present study, more than half of the isolates were resistant to at least one tested antimicrobial agent, mostly penicillin G (35.5%) and tetracycline (29.1%) (Table 2), which are widely used in human and veterinary medicine. Unfortunately, the antimicrobial history of the sampled animals was unknown, but neither penicillin nor tetracycline are listed as common antimicrobials to treat bacterial infections in tortoises (MAUTINO & PAGE, 1993). In fact, the isolates were fully susceptible to most compounds recommended for these animals, including gentamicin, chloramphenicol, ciprofloxacin, and trimethoprim-sulfonamide.

Among the *S. sciuri* isolates, resistance to penicillin G and tetracycline (33.3% and 25.6%, respectively) was more common than resistance to the other antimicrobials tested. These rates were much lower than those reported by NEMEGHAIRE et al. (2014) (98.6% and 60%, respectively) and SCHOENFELDER et al. (2017) (74% and 87%, respectively) for *S. sciuri* isolates from farm animals. This result was expected since the selective pressure of antimicrobials is likely much lower in tortoises than that in livestock. The source of the resistance to penicillin and tetracycline in these animals is unknown, but both antimicrobials have moderate potential for bioaccumulation in plants (TASHO & CHO, 2016), which is the main food source for many animals, including captive and free-living tortoises.

Over the last decade, MRS have emerged, creating concern for human and veterinary health. Resistance to all beta-lactam antimicrobials as a consequence of the acquisition of the *mecA* gene excludes practically all of the first-choice treatment options for both animals and humans, drastically reducing therapeutic alternatives (MARIN, 2002). There are several reports on the colonization and infection of companion animals that transmit MRS

Table 2 - Antimicrobial resistance phenotypes of *Staphylococcus* species recovered from tortoises in Brazil.

Species	Total of isolates	Antimicrobial resistance phenotype ^{ab}	Co-resistance
<i>S. sciuri</i>	39	PEN ¹³ , TET ¹⁰ , CLI ¹	PEN-TET ² ; PEN-CLI ¹
<i>S. xylosum</i>	6	PEN ¹ ; TET ²	PEN-TET ¹
<i>S. kloosii</i>	2	PEN ² ; TET ¹	PEN-TET ¹
<i>S. saprophyticus</i>	1	TET ¹ ; SXT ¹	TET-SXT ¹

^aPEN, penicillin G; TET, tetracycline; CLI, clindamycin; SXT, trimethoprim-sulfamethoxazole.

^bSuperscript numbers indicate the number of isolates with the same characteristic.

strains (VANDUIJKEREN et al., 2011; POMBA et al., 2017), showing the relevance of studies monitoring the occurrence of MRS in animals. Fortunately, there were no MRS isolates in the tortoises evaluated in this study. Although, previous studies have suggested that biofilms also play a role in the treatment resistance of staphylococci infection, information on biofilm production in CoNS isolated from wild animals is lacking (Lee et al., 2019). Thus, future studies should also evaluate the capacity of biofilm formation in these CoNS isolates from tortoises.

This study has some limitations. Due to the small number of sampled animals, further studies are needed to determine the prevalence of staphylococci and the most common species in tortoises. Additionally, other reptile species should be studied to better understand the prevalence of staphylococci in these animals, as well as to clarify their role as reservoirs of drug-resistant staphylococci.

CONCLUSION

In conclusion, the present research suggested that healthy tortoises are mainly colonized by CoNS, especially *S. sciuri*. Staphylococci from tortoises seem to be susceptible to the majority of antimicrobial classes tested, but more than half of the isolates were resistant to at least one antimicrobial, penicillin or tetracycline, both of which are widely used in veterinary medicine. This is the first study to evaluate the colonization and antimicrobial resistance profile of staphylococci isolated from the cloacae of healthy tortoises, as well as from healthy reptiles.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank CETAS-BH for support and animal samples. This study was financed in part by the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Finance Code 0774/2017. We also thank, Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG), and PRPq/UFMG for all the financial support.

DECLARATION OF CONFLICT OF INTEREST

The authors declare that they have no conflicts of interest.

AUTHORS' CONTRIBUTIONS

All authors contributed to the study conception and design. Material preparation and samples collection were performed by Nathalia Abreu Borges Trevizani and Angélica Maria Araújo Souza. Laboratory analysis were performed by

Jordana Almeida Santana and Brendhal Almeida Silva. The first draft of the manuscript was written by Jordana Almeida Santana and Rodrigo Otávio Silveira Silva. All authors read and approved the final manuscript.

BIOETHICS AND BIOSSECURITY COMMITTEE APPROVAL

This study was approved by the Ethical Committee on Animal Use (CEUA) of the Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG) under protocol 238/2015 and by the Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade (ICMBio) under protocol 49195-1.

REFERENCES

- BAPTISTE, K. E. et al. Methicillin-resistant Staphylococci in Companion Animals. **Emerging Infectious Diseases**, v.11, p.1942–1944, 2005. Available from: <https://wwwnc.cdc.gov/eid/article/11/12/05-0241_article>. Accessed: May, 3, 2021. doi: 10.3201/eid1112.050241.
- BECKER, K. et al. G. Coagulase-negative staphylococci. **Clinical Microbiology Reviews**, v.27, p.870–926, 2014. Available from: <<https://cmr.asm.org/content/27/4/870>>. Accessed: May, 3, 2021. doi: 10.1128/CMR.00109-13.
- BEIMS, H. et al. Isolation of *Staphylococcus sciuri* from horse skin infection. **Open Veterinary Journal**, v.6, p.242–246, 2016. Available from: <<https://www.ajol.info/index.php/ovj/article/view/150066>>. Accessed: May, 3, 2021. doi: 10.4314/ovj.v6i3.14.
- BIEROWIEC, K. et al. Prevalence of *Staphylococcus* species colonization in healthy and sick cats. **BioMed Research International**, v.2019, p.4360525, 2019. Available from: <<https://www.hindawi.com/journals/bmri/2019/4360525/>>. Accessed: May, 3, 2021. doi: 10.1155/2019/4360525.
- CARDOSO-BRITO, V. et al. Conjunctival bacterial flora and antimicrobial susceptibility of captive and free-living sea turtles in Brazil. **Veterinary Ophthalmology**, v.22, p.246–255, 2019. Available from: <<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/vop.12584>>. Accessed: May, 3, 2021. doi: <https://doi.org/10.1111/vop.12584>.
- CENTER FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION (CDC). **Reptiles and amphibians/Healthy pets, healthy people**, 2019. Available from: <<https://www.cdc.gov/healthypets/pets/reptiles.html>>. Accessed: Nov. 26, 2020.
- CHEN, M. M. S. et al. Methicillin resistance gene diversity in staphylococci isolated from captive and free-ranging wallabies. **Infection Ecology & Epidemiology**, v.5, 2016. Available from: <<https://www.tandfonline.com/doi/full/10.3402/iee.v6.31507>>. Accessed: May, 3, 2021. doi: 10.3402/iee.v6.31507.
- DI IANNI, F. et al. Conjunctival flora of clinically normal and diseased turtles and tortoises. **BMC veterinary research**, v.11, p.91, 2015. Available from: <<https://bmcvetres.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12917-015-0405-x>>. Accessed: May, 3, 2021. doi: 10.1186/s12917-015-0405-x.
- DIMITRIOU, G. et al. Clinical and microbiological profile of persistent coagulase-negative staphylococcal bacteraemia in neonates. **Clinical Microbiology and Infection**, v.17, p.1684–

- 1690, 2011. Available from: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1198743X1461898X>>. Accessed: May, 3, 2021. doi: 10.1111/j.1469-0691.2011.03489.x.
- EBANI, V. V. Domestic reptiles as source of zoonotic bacteria: A mini review. **Asian Pacific Journal of Tropical Medicine**, v.10, p.723–728, 2017. Available from: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1995764517305035>>. Accessed: May, 3, 2021. doi: 10.1016/j.apjtm.2017.07.020.
- FARIÑA, N. et al. Clinically significant coagulase-negative staphylococci: Most frequent species and virulence factors. **Revista Chilena de Infectología**, v.30, p.480–488, 2013. Available from: <https://scielo.conicyt.cl/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0716-10182013000500003&lng=en&nrm=iso&tlng=en>. Accessed: May, 3, 2021. doi: 10.4067/S0716-10182013000500003.
- FREY, Y. et al. Genetic characterization of antimicrobial resistance in coagulase-negative staphylococci from bovine mastitis milk. **Journal of Dairy Science**, v.96, p.2247–2257, 2013. Available from: <[https://www.journalofdairyscience.org/article/S0022-0302\(13\)00122-7/fulltext](https://www.journalofdairyscience.org/article/S0022-0302(13)00122-7/fulltext)>. Accessed: May, 3, 2021. doi: 10.3168/jds.2012-6091.
- GARCÍA, L. A. et al. *Staphylococcus* Spp. from wild mammals in aragón (spain): antibiotic resistance status. **Journal of Veterinary Research**, v.64, p.373–379, 2020. Available from: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7497752/pdf/jvetres-64-373.pdf>>. Accessed: May, 3, 2021. doi: 10.2478/jvetres-2020-0057.
- GIORDANO, N. et al. Erythema nodosum associated with *Staphylococcus xylosum* septicemia. **Journal of Microbiology, Immunology and Infection**, v.49, p.134–137, 2016. Available from: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1684118212002150?via%3Dihub>>. Accessed: May, 3, 2021. doi: 10.1016/j.jmii.2012.10.003.
- GÓMEZ, P. et al. Diversity of species and antimicrobial resistance determinants of staphylococci in superficial waters in Spain. **FEMS microbiology ecology**, v.93, 2017. Available from: <<https://academic.oup.com/femsec/article/93/1/fiw208/2666408>>. Accessed: May, 3, 2021. doi: 10.1093/femsec/fiw208.
- HANSELMAN, B. A. et al. Coagulase positive staphylococcal colonization of humans and their household pets. **The Canadian Veterinary Journal**, v.50, p.954–958, 2009. Available from: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2726022/>>. Accessed: May, 3, 2021.
- HOSSAIN, S. et al. Phylogenetic relationships, virulence and antimicrobial resistance properties of *Klebsiella* sp. isolated from pet turtles in Korea. **Letters in Applied Microbiology**, v.70, p.71–78, 2020. Available from: <<https://sfamjournals.onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/lam.13245>>. Accessed: May, 3, 2021. doi: 10.1111/lam.13245.
- INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA (IBGE). **População de animais de estimação no Brasil (ABINPET)**, 2013. Available from: <<https://www.gov.br/agricultura/pt-br/assuntos/camaras-setoriais-tematicas/documentos/camaras-tematicas/insumos-agropecuarios/anos-antecedentes/ibge-populacao-de-animais-de-estimacao-no-brasil-2013-abinpet-79.pdf/view>>. Accessed: Nov. 26, 2020.
- IVES, A. K. et al. Detection of *Salmonella enterica* Serovar Montevideo and Newport in Free-ranging sea turtles and beach sand in the Caribbean and persistence in sand and seawater microcosms. **Zoonoses and Public Health**, v.64, p.450–459, 2017. Available from: <<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/zph.12324>>. Accessed: May, 3, 2021. doi: 10.1111/zph.12324.
- LATHAM, R. H. et al. Urinary tract infections in young adult women caused by *Staphylococcus saprophyticus*. **JAMA**, v.250, p.3063–3066, 1983. Available from: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/6644988/>>. Accessed: May, 3, 2021.
- LEE, S. et al. Biofilm production of coagulase-negative staphylococci isolated from rescued wild animals in the Republic of Korea. **Acta Veterinaria Scandinavica**, v.61, p.50, 2019. Available from: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6814046/>>. Accessed: Jun. 6, 2021. doi: 10.1186/s13028-019-0485-x.
- MAMA, O. M. et al. High diversity of coagulase negative staphylococci species in wild boars, with low antimicrobial resistance rates but detection of relevant resistance genes. **Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases**, v.64, p.125–129, 2019. Available from: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0147957119300517?via%3Dihub>>. Accessed: May, 3, 2021. doi: 10.1016/j.cimid.2019.03.006.
- MARIN, M. Methicillin resistant *Staphylococcus*. **Medicina**, v.62 Suppl 2, p.30–35, 2002. Available from: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12481486/>>. Accessed: May, 3, 2021.
- MATSUDA, N.; et al., Evaluation of a simple protein extraction method for species identification of clinically relevant staphylococci by matrix-assisted laser desorption/ionization - Time of flight mass spectrometry. **Journal of Clinical Microbiology**, v.50, p.3862–3866, 2012. Available from: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3502947/>>. Accessed: May, 3, 2021. doi: 10.1128/JCM.01512-12.
- MAUTINO, M.; PAGE, C. D. biology and medicine of turtles and tortoises. **Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice**, v.23, p.1251–1270, 1993. Available from: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0195561693501547?via%3Dihub>>. Accessed: May, 3, 2021. doi: 10.1016/S0195-5616(93)50154-7.
- MURAKAMI, K. et al. Identification of methicillin-resistant strains of staphylococci by polymerase chain reaction. **Journal of Clinical Microbiology**, v.29, p.2240–2244, 1991. Available from: <<https://jcm.asm.org/content/29/10/2240>>. Accessed: May, 3, 2021. doi: 10.1128/JCM.29.10.2240-2244.1991.
- NAGASE, N. et al. Isolation and species distribution of Staphylococci from animal and human skin. **Journal of Veterinary Medical Science**, v.64, p.245–250, 2002. Available from: <https://www.jstage.jst.go.jp/article/jvms/64/3/64_3_245/_article>. Accessed: May, 3, 2021. doi: 10.1292/jvms.64.245.
- NEMEGHAIRE, S. et al. Characterization of methicillin-resistant *Staphylococcus sciuri* isolates from industrially raised pigs, cattle and broiler chickens. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v.69, p.2928–2934, 2014. Available from: <<https://academic.oup.com/jac/article/69/11/2928/2911253>>. Accessed: May, 3, 2021. doi: 10.1093/jac/dku268.
- ORÍÁ, A. P. et al. Ophthalmic diagnostic tests in captive red-footed tortoises (*Chelonoidis carbonaria*) in Salvador, northeast Brazil. **Veterinary Ophthalmology**, v.18 Suppl 1, p.46–52, 2015.

Available from: <<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/vop.12175>>. Accessed: May, 3, 2021. doi: 10.1111/vop.12175.

OTTO, M. Coagulase-negative staphylococci as reservoirs of genes facilitating MRSA infection: Staphylococcal commensal species such as *Staphylococcus epidermidis* are being recognized as important sources of genes promoting MRSA colonization and virulence. **BioEssays: News and Reviews in Molecular, Cellular and Developmental Biology**, v.35, p.4–11, 2013. Available from: <<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1002/bies.201200112>>. Accessed: May, 3, 2021. doi: 10.1002/bies.201200112.

PEER, M. A. et al. Sepsis due to linezolid resistant *Staphylococcus cohnii* and *Staphylococcus kloosii*: first reports of linezolid resistance in coagulase negative staphylococci from India. **Indian Journal of Medical Microbiology**, v.29, p.60–62, 2011. Available from: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21304198/>>. Accessed: May, 3, 2021. doi: 10.4103/0255-0857.76527.

PITCHER, D. G. et al. Rapid extraction of bacterial genomic DNA with guanidium thiocyanate. **Letters in Applied Microbiology**, v.8, p.151–156, 1989. Available from: <<https://sfamjournals.onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/j.1472-765X.1989.tb00262.x>>. Accessed: May 3, 2021. doi: 10.1111/j.1472-765X.1989.tb00262.x.

POMBA, C. et al. Public health risk of antimicrobial resistance transfer from companion animals. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v.72, p.957–968, 2017. Available from: <<https://academic.oup.com/jac/article/72/4/957/2629141>>. Accessed: May, 3, 2021. doi: 10.1093/jac/dkw481.

RAMOS, C. P. et al. Identification and characterization of *Escherichia coli*, *Salmonella* Spp., *Clostridium perfringens*, and *C. difficile* isolates from reptiles in Brazil. **BioMed Research International**, v.2019, p.1–9, 2019. Available from: <<https://www.hindawi.com/journals/bmri/2019/9530732/>>. Accessed: May, 3, 2021. doi: 10.1155/2019/9530732.

RAZ, R. et al. Who are you—*Staphylococcus saprophyticus*? **Clinical Infectious Diseases**, v.40, p.896–898, 2005. Available from: <<https://academic.oup.com/cid/article/40/6/896/347623>>. Accessed: May, 3, 2021. doi: 10.1086/428353.

RUIZ-RIPA, L. et al. Frequency and characterization of antimicrobial resistance and virulence genes of Coagulase-Negative Staphylococci from Wild Birds in Spain. Detection of *tst*-Carrying *S. sciuri* Isolates. **Microorganisms**, v.8, p.1317, 2020. Available from: <<https://www.mdpi.com/2076-2607/8/9/1317>>. Accessed: May, 3, 2021. doi: 10.3390/microorganisms8091317.

SCHOENFELDER, S. M. K. et al. Antibiotic resistance profiles of coagulase-negative staphylococci in livestock environments. **Veterinary Microbiology**, SI: Antimicrobial Resistance. v.200, p.79–87, 2017. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S037811351630102X?via%3Dihub>. Accessed: May 3, 2021. doi: 10.1016/j.vetmic.2016.04.019.

SEVERIN, J. A. et al. Nasal carriage of Methicillin-Resistant and Methicillin-Sensitive Strains of *Staphylococcus sciuri* in the Indonesian Population. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v.54, p.5413–5417, 2010. Available from: <<https://aac.asm.org/content/54/12/5413>>. Accessed: May, 3, 2021. doi: 10.1128/AAC.00426-10.

SLAUGHTER, D. M. et al. Antibiotic resistance in coagulase-negative staphylococci isolated from Cope's gray treefrogs (*Hyla chrysoscelis*). **FEMS Microbiology Letters**, v.205, p.265–270, 2001. Available from: <<https://academic.oup.com/femsle/article/205/2/265/521016>>. Accessed: May, 3, 2021. doi: 10.1111/j.1574-6968.2001.tb10959.x.

SOUSA, M. et al. Genetic diversity and antibiotic resistance among coagulase-negative staphylococci recovered from birds of prey in Portugal. **Microbial Drug Resistance**, v.22, p.727–730, 2016. Available from: <<https://www.liebertpub.com/doi/10.1089/mdr.2015.0266>>. Accessed: May, 3, 2021. doi: 10.1089/mdr.2015.0266.

SREDNIK, M. E. et al. Detection of a *mecC*-positive *Staphylococcus saprophyticus* from bovine mastitis in Argentina. **Journal of Global Antimicrobial Resistance**, v.10, p.261–263, 2017. Available from: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S2213716517301030?via%3Dihub>>. Accessed: May, 3, 2021. doi: 10.1016/j.jgar.2017.05.016.

STEPANOVIĆ, S. et al. Surgical wound Infection associated with *Staphylococcus sciuri*. **Scandinavian Journal of Infectious Diseases**, v.34, p.685–686, 2002. Available from: <<https://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/00365540110076949a>>. Accessed: May, 3, 2021. doi: 10.1080/00365540110076949a.

STEPANOVIĆ, S. et al. Identification and characterization of clinical isolates of members of the *Staphylococcus sciuri* Group. **Journal of Clinical Microbiology**, v.43, p.956–958, 2005. Available from: <<https://jcm.asm.org/content/43/2/956>>. Accessed: May, 3, 2021. doi: 10.1128/JCM.43.2.956-958.2005.

TADDEI, S. et al. Conjunctival flora of clinically normal captive green iguanas (*Iguana iguana*). **Veterinary Record**, v.167, p.29–30, 2010. Available from: <<https://bvajournals.onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1136/vr.b4868>>. Accessed: May, 3, 2021. doi: 10.1136/vr.b4868.

TASHO, R. P.; CHO, J. Y. Veterinary antibiotics in animal waste, its distribution in soil and uptake by plants: A review. **The Science of the Total Environment**, v.563–564, p.366–376, 2016. Available from: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0048969716308427?via%3Dihub>>. Accessed: May, 3, 2021. doi: 10.1016/j.scitotenv.2016.04.140.

VAN DUIJKEREN, E. et al. Transmission of methicillin-resistant *Staphylococcus pseudintermedius* between infected dogs and cats and contact pets, humans and the environment in households and veterinary clinics. **Veterinary Microbiology**, v.150, p.338–343, 2011. Available from: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0378113511000770?via%3Dihub>>. Accessed: May, 3, 2021. doi: 10.1016/j.vetmic.2011.02.012.

VON EIFF, C. et al. Pathogenesis of infections due to coagulase-negative staphylococci. **The Lancet Infectious Diseases**, v.2, p.677–685, 2002. Available from: <[https://www.thelancet.com/journals/laninf/article/PIIS1473-3099\(02\)00438-3/fulltext](https://www.thelancet.com/journals/laninf/article/PIIS1473-3099(02)00438-3/fulltext)>. Accessed: May, 3, 2021. doi: 10.1016/S1473-3099(02)00438-3.

WALLER, K. P. et al. CNS species and antimicrobial resistance in clinical and subclinical bovine mastitis. **Veterinary Microbiology**, v.152, p.112–116, 2011. Available from: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0378113511002203?via%3Dihub>>. Accessed: May, 3, 2021. doi: 10.1016/j.vetmic.2011.04.006.

WALTHER, B. et al. Multidrug-resistant opportunistic pathogens challenging veterinary infection control. **Veterinary Microbiology**, v.200, p.71–78, 2017. Available from: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0378113516301419?via%3Dihub>>. Accessed: May, 3, 2021. doi: 10.1016/j.vetmic.2016.05.017.

WEESE, J. S. et al. Suspected transmission of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* between domestic pets and humans in veterinary clinics and in the household. **Veterinary Microbiology**, v.115, p.148–155, 2006. Available from: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0378113506000071?via%3Dihub>>.

Accessed: May, 3, 2021. doi: 10.1016/j.vetmic.2006.01.004.

WIELER, L. H. et al. Methicillin-resistant staphylococci (MRS) and extended-spectrum beta-lactamases (ESBL)-producing *Enterobacteriaceae* in companion animals: nosocomial infections as one reason for the rising prevalence of these potential zoonotic pathogens in clinical samples. **International journal of medical microbiology: IJMM**, v.301, p.635–641, 2011. Available from: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S1438422111000956?via%3Dihub>>. Accessed: May, 3, 2021. doi: 10.1016/j.ijmm.2011.09.009.

RESEARCH ARTICLE

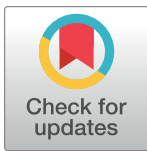
Occurrence and characterization of methicillin-resistant *Staphylococcus* spp. in diseased dogs in Brazil

Flávia Mello Viegas¹, Jordana Almeida Santana¹, Brendhal Almeida Silva¹, Rafael Gariglio Clark Xavier¹, Cláudia Teixeira Bonisson², Júlia Lara Sette Câmara¹, Mário Cesar Rennó², João Luis Reis Cunha³, Henrique César Pereira Figueiredo¹, Francisco Carlos Faria Lobato¹, Rodrigo Otávio Silveira Silva¹*

1 Veterinary School, Federal University of Minas Gerais, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil, **2** VetMaster Veterinary Clinic, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil, **3** Department of Biology, University of York, Heslington, York, United Kingdom

* These authors contributed equally to this work.

* rodrigo.otaviosilva@gmail.com



OPEN ACCESS

Citation: Viegas FM, Santana JA, Silva BA, Xavier RGC, Bonisson CT, Câmara JLS, et al. (2022) Occurrence and characterization of methicillin-resistant *Staphylococcus* spp. in diseased dogs in Brazil. PLoS ONE 17(6): e0269422. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0269422>

Editor: Jose Melo-Cristino, Universidade de Lisboa Faculdade de Medicina, PORTUGAL

Received: January 24, 2022

Accepted: May 20, 2022

Published: June 3, 2022

Copyright: © 2022 Viegas et al. This is an open access article distributed under the terms of the [Creative Commons Attribution License](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Data Availability Statement: All relevant data are within the paper and its [Supporting Information](#) files.

Funding: This work was supported by funds from Coordination for the Improvement of Higher Education Personnel (CAPES – Prêmio CAPES 2015 - 0774/2017), National Council for Scientific and Technological Development (CNPq - 406402/2018-3), Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG - APQ-00524-17) and Pró-Reitoria de Pesquisa da Universidade

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 *Staphylococcus* spp. 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). Sequencing of the *16S rRNA* and *rpoB* genes were used in selected samples that were not identified by MALDI-ToF and by the species-specific PCR. 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 methicillin-resistant. 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 Brazil, which revealed the dispersion of CC71 and nine novel ST. 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.

Federal de Minas Gerais. ROSS has a fellowship from CNPq (Brazil). The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

Competing interests: The authors have declared that no competing interests exist.

Introduction

Staphylococcus pseudintermedius is a major commensal agent of the skin and mucosae of dogs and integrates the *S. intermedius* group (SIG) along with three other species: *S. intermedius*, *S. delphini* and *S. cornubiensis* [1, 2]. Although it is commonly found in the nose and anus of healthy individuals, *S. pseudintermedius* can be responsible for several clinical infections, being one of the leading causes of pyoderma, but it is also a common cause of otitis, wound infections, and urinary tract infections [1, 3–5].

Over the past decade, the emergence of methicillin-resistant *S. pseudintermedius* (MRSP) has become a problem of great concern in veterinary medicine [4, 6, 7] due to the acquisition of the Staphylococcal Cassette Chromosome *mec* (SCC*mec*), a mobile genetic element which harbors the *mecA* gene and confers resistance to all beta-lactam antimicrobials, except for the fifth-generation cephalosporins ceftaroline and ceftobiprole [8]. MRSP strains are also commonly resistant to other antimicrobial classes, such as aminoglycosides, macrolides, and fluoroquinolones, representing a challenge to therapeutic approaches [4, 9–11]. Furthermore, SCC*mec* and/or other antimicrobial resistance genes can be transferred between different staphylococci, which can lead to serious public health issues, especially when involving MRSP and methicillin-resistant *S. aureus* (MRSA) [9, 12, 13]. Similar to MRSP in dogs, MRSA is a major pathogen associated with both hospital and community-acquired infections in humans and is responsible for severe cases of soft tissue infections [11, 12].

Reports of human cases of carriage or infection by *S. pseudintermedius* have been scarcely described over the last few years [9, 14]. *S. pseudintermedius* can cause a range of skin and soft tissue infections in humans, and studies have shown high similarity among strains isolated from human patients and their dogs [15–19]. Furthermore, it seems like long-term contact with dogs may be a risk factor for acquiring the bacterium, with veterinarians and pet owners being the most affected [9, 14, 20, 21]. In this context, MRSP is a relevant one health problem because of its potential zoonotic risk and the limited options of treatment currently available.

In addition to its growing importance, there are few studies on MRSP in Brazil. To date, there is almost no information about its population structure and resistance patterns [22–25]. Furthermore, few studies have investigated the possible relationship between different clinical manifestations caused by *S. pseudintermedius* in dogs and their patterns of antimicrobial resistance (AMR) and genetic background. This study aimed to identify the occurrence of staphylococci, with major focus on *S. pseudintermedius*, in dogs with clinical conditions and investigate its epidemiology in Belo Horizonte, Minas Gerais, by reporting the antimicrobial resistance profiles and analyzing the molecular structure of MRSP isolates.

Materials and methods

Strain isolation and identification

Clinical specimens were obtained from dogs during consultation at the Veterinary Hospital of the Federal University of Minas Gerais (HV-UFMG) and in a veterinary clinic (VetMaster, Belo Horizonte, Minas Gerais) from 2017 to 2020. After informed consent of the owners, samples of dogs with suspected bacterial infection at any site were included in the present study. Patient information data, including reasons for consultation, age, sex, disease, specimen type, involvement of antimicrobial therapy at the time of sampling, and outcome, were collected. This study was approved by the Ethical Committee on Animal Use (CEUA) of the Federal University of Minas Gerais under protocol 287/2019.

All samples were plated on mannitol salt agar (Kasvi, Brazil) and incubated for 24 h at 37°C. Two presumptive colonies from each sample were plated on Müller Hinton agar (Difco,

USA) and identified by matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight (MALDI-TOF) mass spectrometry, as described previously [26]. Briefly, for each strain, 1 μ l of formic acid (70%) and 1 μ l of MALDI-TOF MS matrix, consisting of a saturated solution of α -cyano-4-hydroxycinnamic acid (HCCA) (Bruker Daltonics, Bremen, Germany), were applied to the spot and allowed to air-dry. Spectra were acquired using the FlexControl MicroFlex LT mass spectrometer (Bruker Daltonics) with a 60-Hz nitrogen laser, in which up to 240 laser shots. Parameters for mass range detection were defined to allow the identification from 1,960 to 20,137 m/z, where Ion source 1 v was 19.99 kv, Ion source 2 voltage was 18.24 kv and the lens voltage was 6.0 kv for data acquisition. Prior to measurements, calibration was preceded with a bacterial test standard (*E. coli* DH5 α ; Bruker Daltonics). The Real Time (RT) identification score criteria used were those recommended by the manufacturer: score ≥ 2.000 indicates a species-level identification. Isolates identified as SIG by MALDI-ToF were confirmed by multiplex polymerase chain reaction (PCR) of *nuc* gene [27]. SIG isolates that were not amplified by multiplex PCR, and non-SIG isolates with MALDI-ToF score under 2.000 were submitted to sequencing of the *16S rRNA* gene and sequencing of the *rpoB* gene, if necessary. Amplification and sequencing of the *16S rRNA* and *rpoB* genes were performed as previously described [28, 29].

Antimicrobial susceptibility testing

Antimicrobial susceptibility of all *Staphylococcus* spp. isolates was tested by the disk diffusion method and interpreted according to the Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) documents, M100-Ed31 [30] and VET01S-Ed5 [31]. Strains were cultivated in Müller-Hinton agar and incubated overnight at 35° C. Inoculation was performed using cell suspensions of 0.5 McFarland turbidity standard and results were read within 18 to 24 hours. The following antimicrobials were tested: oxacillin (OXA, 1 μ g), cefoxitin (FOX, 30 μ g), penicillin (PEN, 10 IU), gentamicin (GEN, 10 μ g), erythromycin (ERY, 15 μ g), clindamycin (CLI, 2 μ g), tetracycline (TET, 30 μ g), ciprofloxacin (CIP, 5 μ g), nitrofurantoin (NIT, 300 μ g), trimethoprim-sulfamethoxazole (SXT, 1,25/23,75 μ g), chloramphenicol (CHL, 30 μ g), and rifampicin (RIF, 5 μ g) (Oxoid, USA). *Staphylococcus aureus* ATCC® 25923 was used as control. The results were recorded as susceptible, intermediate, or resistant by measuring the inhibition halo diameter according to the documents quoted above [30].

DNA extraction and detection of *mecA*

Extraction of bacterial genomic DNA with guanidium thiocyanate was performed according to a method previous described [32]. The extracted DNA was quantified using a Nanodrop spectrophotometer (Thermo Scientific, Wilmington, DE, USA). The purity of the extracted DNA was determined using the absorbance ratio at 260/280 nm. All staphylococci isolates were tested by PCR to determine whether they carry the *mecA* gene [33].

Multilocus sequence typing (MLST)

Multilocus sequence typing was performed for all MRSP isolates, according to literature [34, 35]. STs were determined using the *S. pseudintermedius* MLST database (<https://pubmlst.org/organisms/staphylococcus-pseudintermedius>), and new STs were assigned by the curator Vincent Perreten (vincent.perreten@vbi.unibe.ch). Phyloviz v 2.0, using the goeBURST algorithm [36, 37], was used to infer the population structure, with clonal complexes (CCs) composed of all strains sharing at least six identical alleles (single-locus variant). Multilocus sequence analysis (MLSA) was performed based on concatenated sequences of the seven alleles from the MLST scheme. A phylogenetic tree was constructed using the approximately-maximum-

likelihood (ML) model and Hasegawa-Kishino-Yano models of nucleotide evolution was constructed using IQ-TREE [38], with a bootstrap analysis with 1000 replicates, and visualized and annotated using iTol v.4 [39].

Statistical analysis

Data were summarized using frequency tables and percentages for categorical variables and medians for continuous variables. To measure the association between the categorical variables and isolated strains, a univariate analysis using Fisher's exact test was performed. The associations were expressed as odds ratios (ORs) and their 95% confidence intervals (CIs). Statistical significance was set at $P \leq 0.05$. For quantitative variables, the Mann-Whitney test was used, with a p value ≤ 0.05 , and Tukey's comparison test was applied if statistical significance was observed. All analyses were performed using R Software 4.0.9 (R Development Core Team, NZ).

Results

Data collection

One hundred and sixteen dogs were included in this study, which provided 131 samples of staphylococcal species. When two isolates from the same animal were obtained from the same site and had the same antimicrobial resistance profile, only one of them was maintained in the study. Most of the isolates (95/131–72.5%) were obtained from HV-UFGM, while 27.5% (36/131) samples from 27 animals were obtained in a private clinic. The animals belonged to different breeds and ages ranging from 12 to 204 months, with a mean of 88 months (± 46.3). Fifty-seven animals were female, fifty-eight were male, and one was not provided with gender information (see [S1 File](#)). At least 64 animals (55.2%) had previous use of antimicrobials, 56 received different systemic antibiotics, eight of them had used only topical antibiotics, and 15 of them used both systemic and topical products. The main prescribed antibiotics were cefalexin (29/64), amoxicillin (9/64), or a combination of amoxicillin and clavulanic acid (16/64) and enrofloxacin (11/64). Most of the clinical specimens were associated with dermatological conditions: 58 (44.3%) with pyoderma, 28 (21.4%) with otitis, 20 (15.3%) with urogenital tract infections, 15 (11.4%) with surgical site infections (SSIs), and 10 (7.6%) from other sites.

Strain isolation and identification

A total of 131 samples were obtained and confirmed to be *Staphylococcus* spp. by MALDI-ToF. A total of 102 isolates (77.9%) were identified by MALDI-TOF as part of the SIG ([Table 1](#)). Among these, PCR of the *nuc* gene confirmed 98 (96.1%) isolates as *S. pseudintermedius* and four (3.9%) as *S. delphini*. Sequencing of the *16S rRNA* gene confirmed all species, except in one case. The only sample sent for sequencing of the *rpoB* gene was identified as *S. delphini*, confirming the MALDI-ToF results. The most frequent species isolated was *S. pseudintermedius* (98/131, 74.8%), followed by *S. schleiferi* (20/131, 15.3%) (see [Fig 1](#)), although it is important to state that the possible differentiation of *S. schleiferi* into two species, *S. coagulans* and *S. schleiferi* [40], was not investigated. Nine animals had both pyoderma and otitis at time of sampling—two of them caused by *S. pseudintermedius* and two caused by *S. schleiferi*; in all those cases, isolates from the same animal showed the same antimicrobial resistance profile. The other five animals had otitis and pyoderma caused by different species, more specifically a combination of *S. pseudintermedius* and *S. schleiferi* in four of them and the other one with a combination of *S. pseudintermedius* and *S. delphini*. Two dogs with pyoderma carried methicillin-susceptible *S. pseudintermedius* (MSSP) with different patterns of antimicrobial resistance, one carried both MSSP and MRSP and two carried *S. pseudintermedius* and *S. aureus*.

Table 1. Distribution and proportion of staphylococci species isolated from different sites of sampling from 116 dogs at two different veterinary clinics from Belo Horizonte, Brazil, between 2017 and 2020.

Infection site	Species
Skin (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)
Ear (n = 28–21.4%)	<i>S. pseudintermedius</i> (n = 17)
	<i>S. delphini</i> (n = 1)
	* <i>S. schleiferi</i> (n = 10)
Urogenital tract (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)
	<i>S. warneri</i> (n = 1)
Surgical wound (n = 15–11.4%)	<i>S. pseudintermedius</i> (n = 13)
	<i>S. simulans</i> (n = 1)
	<i>S. capitis</i> (n = 1)
Others (n = 10–7.6%)	<i>S. pseudintermedius</i> (n = 9)
	<i>S. simulans</i> (n = 1)

* The recently approved differentiation of *S. schleiferi* into two species (*S. coagulans* and *S. schleiferi*) was not considered in the present work.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0269422.t001>

Antimicrobial susceptibility

Results of antimicrobial resistance to all staphylococci species are shown in Table 2. A total of 88.2% (90/102) isolates from the SIG were resistant to at least one antibiotic. About 86.7% (85/98) of *S. pseudintermedius* were resistant to penicillin and 24.5% (24/98) were resistant to oxacillin. In sequence, 59.2% (58/98) isolates were resistant to trimethoprim/sulfamethoxazole, 58.2% (57/98) were resistant to tetracycline and 42.9% (42/98) were resistant to clindamycin and erythromycin. All isolates were susceptible to nitrofurantoin. Isolates from SSIs had the highest rates of resistance to nine of the tested antibiotics ($p < 0.05$; Fig 2). Sixty-two isolates (63.3%) were considered multidrug resistant (MDR). Of these, 43.5% (27/62) were isolated from pyoderma, 21% (13/62) from SSIs, 14.5% (9/62) from otitis, 11.3% (7/62) from urogenital infections, and 9.7% (6/62) from other sites. Only one *S. delphini* showed antimicrobial resistance, being resistant to penicillin and tetracycline.

Among the 29 non-SIG isolates, 18 (62.1%) were susceptible to all antimicrobials. Nine isolates (31%) were resistant to penicillin, which was the highest rate of resistance observed among these strains. Two isolates (6.9% - 2/29) were resistant to GEN and two isolates resistant to PEN were also resistant to ERY (3.4% - 1/29) or TET (3.4% - 1/29). One isolate (3.4% - 1/29) was resistant to FOX, PEN, CLI and SXT and positive for the *mecA*, thus being the only isolate considered multidrug resistant.

S. pseudintermedius was significantly associated with resistance to RIF (OR 5.82, 95%CI), CIP (OR 5.83, 95%CI), CLI (OR 7.82, 95%CI), ERY (OR 7.82, 95%CI), PEN (OR 10.11, 95%CI), OXA (OR 13.11, 95%CI), SXT (OR 14.73, 95%CI), and TET (OR 14.73, 95%CI). *S. pseudintermedius* strains were also associated with MDR (OR 18.6, 95%CI 5.3–65.1) when compared to other staphylococci.

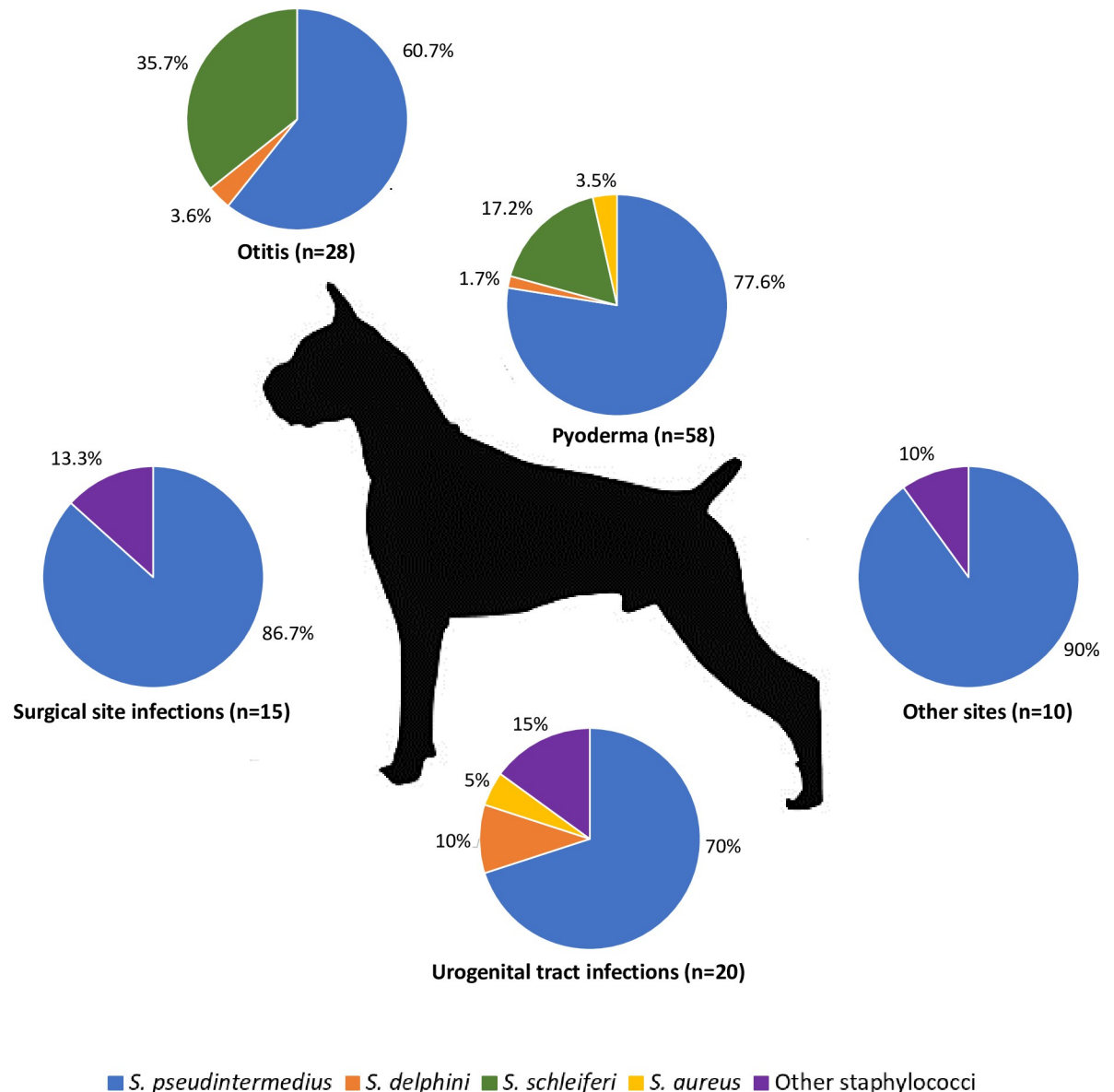


Fig 1. Distribution and proportion of staphylococci from different sites of sampling from 116 dogs attended at two different veterinary clinics from Belo Horizonte, Brazil, between 2017 and 2020. Disclosure—The recently approved differentiation of *S. schleiferi* into two species, *S. coagulans* and *S. schleiferi* [40], was not considered in the present work.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0269422.g001>

Methicillin-resistant staphylococci

Approximately 23.5% (24/102) of SIG isolates were positive for the *mecA* gene, all of them identified as *S. pseudintermedius*. Three (10.3%) of non-SIG isolates were also positive for *mecA*. Of these, two were *S. schleiferi* and one was *S. epidermidis*. However, only *S. epidermidis* was phenotypically resistant to oxacillin or ceftiofur (inhibition halo = 24mm for FOX); this strain was obtained from a dog with a nosocomial UTI. The two *S. schleiferi* positive for *mecA* were not resistant to oxacillin (inhibition halos for FOX 19 and 19,1mm). No MRSA isolates were identified in this study.

Table 2. Antimicrobial resistance among staphylococci isolates from infected dogs attended at two different veterinary clinics, from 2017 to 2020, in Belo Horizonte, Brazil.

Species	Isolates	OXA/ FOX	PEN	ERY	CLI	SXT	RIF	GEN	TET	CIP	CHL	NIT	MDR
<i>S. pseudintermedius</i>	98 (74.8%)	24 (18.3%)	85 (64.9%)	42 (32.1%)	42 (32.1%)	58 (44.3%)	35 (26.7%)	28 (21.4%)	57 (43.5%)	34 (26%)	8 (6.1%)	0 (0%)	62 (47.3%)
<i>S. delphini</i>	4 (3,1%)	0 (0%)	1 (0.8%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	1 (0.8%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)
<i>S. schleiferi</i> *	20 (15.3%)	0 (0%)	2 (1.5%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	2 (1.5%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)
<i>S. aureus</i>	3 (2.3%)	0 (0%)	2 (1.5%)	1 (0.8%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	1 (0.8%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)
<i>S. capitis</i>	2 (1.5%)	0 (0%)	2 (1.5%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)
<i>S. epidermidis</i>	1 (0.8%)	1 (0.8%)	1 (0.8%)	0 (0%)	1 (0.8%)	1 (0.8%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	1 (0.8%)
<i>S. simulans</i>	2 (1.5%)	0 (0%)	1 (0.8%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)
<i>S. warneri</i>	1 (0.8%)	0 (0%)	1 (0.8%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)
Total	131 (100%)	25 (19.1%)	95 (72.5%)	43 (32.8%)	43 (32.8%)	59 (45%)	35 (26.7%)	30 (22.9%)	59 (45%)	34 (26%)	8 (6.1%)	0 (0%)	63 (48.1%)

OXA = oxacillin, FOX = ceftiofur, PEN = penicillin, ERY = erythromycin, CLI = clindamycin, SXT = thiomethoprim/sulfamethoxazole, RIF = rifampicin, GEN = gentamicin, TET = tetracycline, CIP = ciprofloxacin, CHL = chloramphenicol, NIT = nitrofurantoin, MDR = multidrug resistance

* The recently approved differentiation of *S. schleiferi* into two species (*S. coagulans* and *S. schleiferi*) was not considered in the present work.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0269422.t002>

MRSP

Twenty-four isolates of *S. pseudintermedius* were resistant to oxacillin and positive for the *mecA* gene by PCR, thus being considered MRSP (Table 3). Of these, 50% (12/24) were from surgical wounds, 29.2% (7/24) from skin lesions, 12.5% (3/24) from otitis, and 8.3% (2/24) from other sites. When classified by the type of infection, rates of MRSP were 15.6% (7/45) in dogs with skin infections, 17.6% (3/17) in dogs with otitis, 92.3% (12/13) in dogs with SSIs, and 22.2% (2/9) in other sites. None of the MRSP strains were isolated from dogs with urinary tract infection (UTI). All isolates were resistant to at least three classes of non-beta-lactam antimicrobials. The most common antimicrobial resistance profiles were OXA-PEN-ERY--CLI-SXT-RIF-CIP-TET-GEN (16.7% - 4/24) and OXA-PEN-ERY-CLI-SXT-RIF-TET-GEN (16.7% - 4/24).

Ten different ST profiles were identified, including nine new STs (ST2124–ST2131 and ST2164) (Fig 3). In goeBURST analysis, ten isolates (ST71 and ST2130) belonged to well-known CC71 (Fig 4E); ST2124 was related to CC2166 (Fig 4B); STs 2125 and 2128 seemed to be related to CC781 (Fig 4D), while ST2127 was closer to CC558 –which has evolved from CC781 (Fig 4D); STs 2126 and 2131 were close to subfounder ST1709 (Fig 4D); and STs 2129 and 2164 were closer to CC1758 (Fig 4C). In the statistical analysis, CC71 was associated with resistance to ciprofloxacin ($p < 0.05$).

Predictors for MRSP

There was no significant difference in the proportion of MRSP isolates between female and male dogs or between age groups. However, previous antimicrobial treatment (OR9.21 95%CI 2.05–41.25) and hospital-acquired infections were associated with the isolation of MRSP strains. When considering the clinical condition presented by the animals, SSIs were

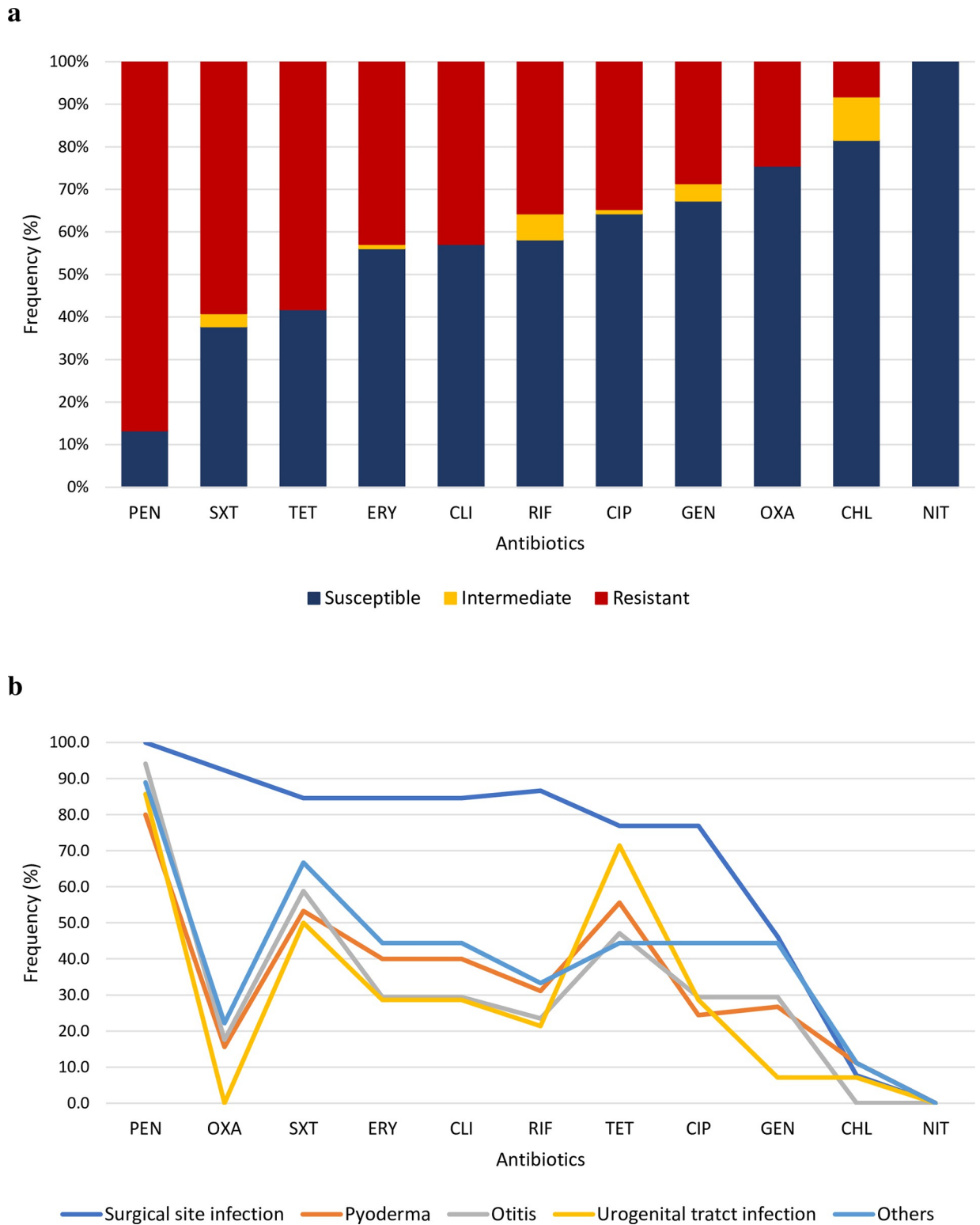


Fig 2. Antimicrobial resistance among clinical *S. pseudintermedius* isolates from infected dogs from two different veterinary clinics from 2017 to 2020 in Belo Horizonte, Brazil. a) Overall prevalence according to the antimicrobial compound; b) According to site of infection.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0269422.g002>

Table 3. Antimicrobial resistance profile of methicillin-resistant *S. pseudintermedius* (MRSP) strains isolated from dogs (Belo Horizonte, Brazil) according to sequence types (STs) and infection sites.

ST	CC	Antimicrobial resistance profile	Infection site
71 (n = 9)	71	OXA, PEN, ERY, CLI, SXT, RIF, CIP, TET, GEN	Surgical wound (2)
			Skin (1)
		OXA, PEN, ERY, CLI, SXT, RIF, CIP, GEN	Surgical wound (1)
			Skin (1)
		Others (1)	
		OXA, PEN, ERY, CLI, SXT, RIF, CIP, TET	Surgical wound (3)
2124 (n = 2)	NA	OXA, PEN, ERY, CLI, SXT, CIP, GEN	Otitis (1)
		OXA, PEN, SXT, RIF, CIP, TET, GEN	Others (1)
2125 (n = 3)	NA	OXA, PEN, ERY, CLI, SXT, RIF, CIP, GEN	Surgical wound (1)
		OXA, PEN, ERY, CLI, SXT, CIP, GEN	Skin (1)
		OXA, PEN, ERY, CLI, SXT, CIP	Surgical wound (1)
2126 (n = 4)	NA	OXA, PEN, ERY, CLI, SXT, RIF, TET, GEN	Skin (2)
			Surgical wound (1)
			Otitis (1)
2127 (n = 1)	NA	OXA, PEN, SXT, RIF, TET	Skin (1)
2128 (n = 1)	NA	OXA, PEN, SXT, RIF, CIP, TET	Surgical wound (1)
2129 (n = 1)	NA	OXA, PEN, ERY, CLI, CHL, CIP, TET, GEN	Surgical wound (1)
2130 (n = 1)	71	OXA, PEN, ERY, CLI, SXT, RIF, CIP, TET, GEN	Otitis (1)
2131 (n = 1)	NA	OXA, PEN, ERY, CLI, SXT, RIF, TET	Surgical wound (1)
2164 (n = 1)	NA	OXA, PEN, ERY, CLI, SXT, RIF, CHL, CIP, TET, GEN	Skin (1)

*NA = not applicable.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0269422.t003>

significantly associated with MRSP isolation: a dog with SSI was more likely to carry an MRSP strain than an MSSP strain (OR 3.7 95%CI 1.5–9.4). In addition, MRSP was more likely to be isolated from SSI than from pyoderma, otitis, urogenital infection, or other site infections ($p < 0.05$).

Discussion

In the present study, we characterized the occurrence of different species of *Staphylococcus* spp. isolated from several different tissues in dogs and evaluated their antibiotic resistance. *S. pseudintermedius* was the most prevalent species in this study. As it is the major causative agent of pyoderma in dogs, most clinical specimens were obtained from skin lesions [1, 41]. The second most frequently observed species was *S. schleiferi*, but it is important to remember that the recently approved differentiation of *S. schleiferi* into *S. coagulans* and *S. schleiferi* [40] was not considered in the present work. Anyway, *S. schleiferi* is rarely found in healthy carriers and is commonly isolated from dogs with otitis or pyoderma [11, 42, 43]. Some animals were infected by both MSSP and MRSP, or even by two different species of *Staphylococcus* spp., similar to previous reports [1, 11]. As these bacteria can share MGE, it is worrisome that strains previously susceptible could acquire resistance and/or virulence genes when in contact with virulent/resistant lineages [10, 12].

High rates of AMR were observed among the SIG isolates to most of the antimicrobials tested in this study. AMR is considered a natural phenomenon, but the excessive or inappropriate use of antimicrobial drugs in human and veterinary medicine accelerates its occurrence [44]. Over half of the animals included in the study had been previously treated with at least one systemic antibiotic, which can be linked to the high rates of AMR found. Unfortunately,

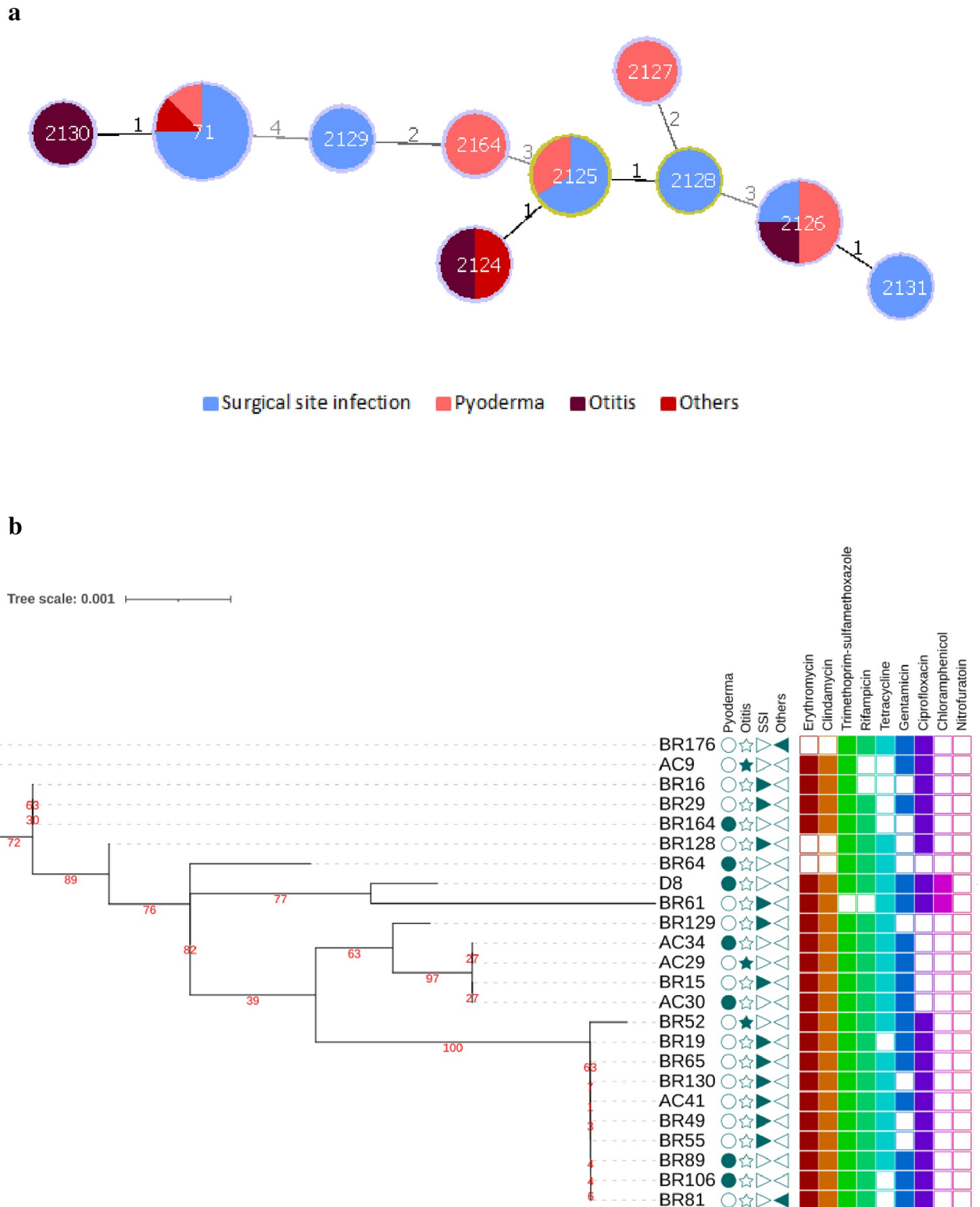


Fig 3. Genetic relationship of MRSP from dogs in Belo Horizonte (2017–2020). a) Population snapshot of MRSP goeBURST full MST analysis. Line numbers and shading indicate the number of differing loci between STs and colors indicate the type of infection related to each ST. b) A phylogenetic tree based on the alignment of all MLST genes of each ST was inferred using iqTree; posterior probabilities are shown in red. Columns with triangles, circle and star indicate the site of infection of each isolate; colored squares' columns indicate presence or absence of resistance to different classes of non-beta-lactams antibiotics.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0269422.g003>

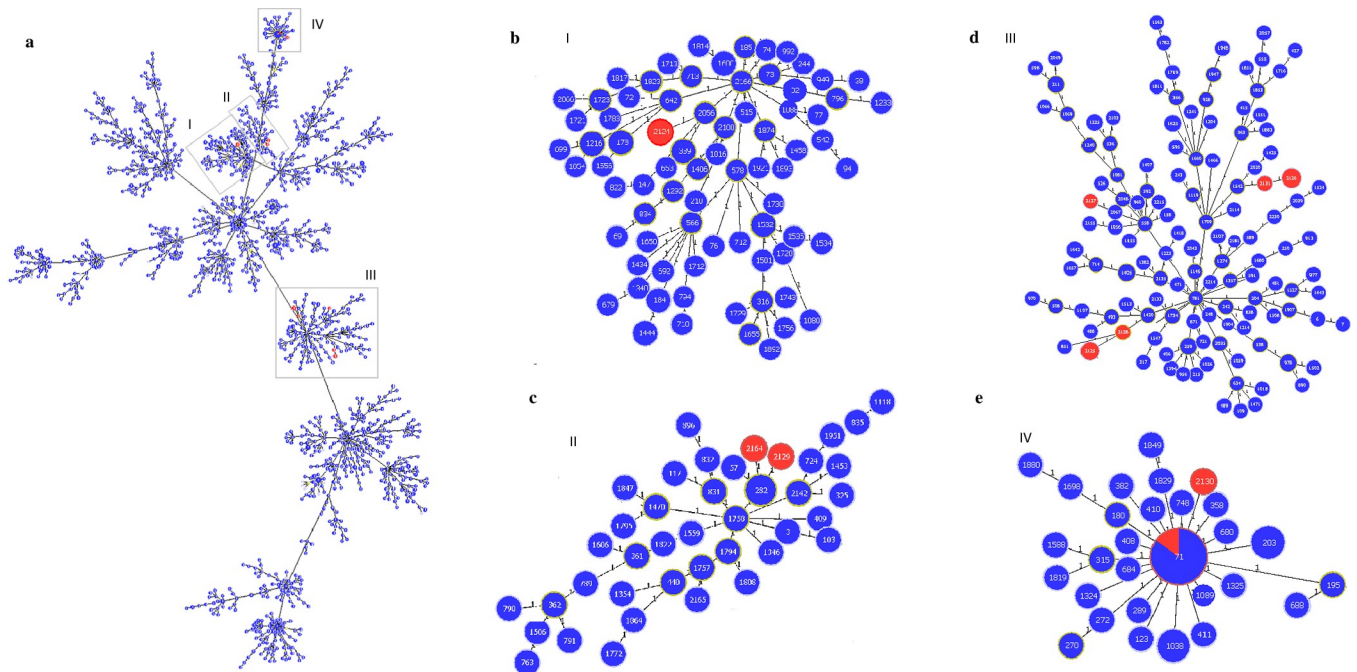


Fig 4. goeBURST population snapshot of *S. pseudintermedius* at single locus variance (SLV). Blue color indicates worldwide strain types, while red color indicates MRSP strains identified in the present study; line numbers indicate allelic variance. **a)** Major populational structure of *S. pseudintermedius*. Clusters of linked isolates correspond to clonal complexes (CCs); singletons are not showed. Gray boxes indicate the localization of STs identified in the current study. **b)** snapshot of CC2166, with ST 2124 in red. **c)** snapshot of CC1758, with STs 2129 and 2164 in red. **d)** snapshot of CC781 and adjacent, with STs 2125, 2126, 2127, 2128 and 2131 in red. **e)** Snapshot of CC71 with STs 71 and 2130 in red.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0269422.g004>

this frequency is not surprising, considering the main clinical manifestations presented by those animals. In small animal practice, skin infections are commonly seen in routine, being the main reason for antimicrobial administration in dogs, accounting for almost one-third of antimicrobial prescriptions in small animal clinics [45]. Similarly, otitis and bacterial urinary tract disease are common causes of morbidity in dogs and are among the leading causes of antimicrobial use [46–48]; and surgery often requires antimicrobial prophylaxis and post-operative administration of antimicrobials [49, 50]. The main prescribed antibiotics were cefalexin, amoxicillin, amoxicillin/clavulanic acid, and enrofloxacin. Beta-lactams are commonly the most used antimicrobial group in small animals, especially when culture is not available [12, 14, 47].

Except for penicillinase-labile antibiotics, MSSP usually presents satisfactory rates of antimicrobial susceptibility reported in the literature [10, 51–53]. However, our results revealed high rates of antimicrobial resistance to several classes of antibiotics, including veterinary critically important antimicrobial agents [54], in both MSSP and MRSP strains, with significant occurrence of MDR. In contrast, chloramphenicol and nitrofurantoin were the antibiotics with major rates of susceptibility among *S. pseudintermedius* strains, which is expected, since both are forbidden for veterinary use in Brazil [55].

The present study identified an overall occurrence of 24.5% of MRSP among all *S. pseudintermedius* isolates, which is within the expected range, since literature reports variable rates of prevalence of MRSP in dogs, ranging from 0% to 60% [3, 9, 56]. Previous studies conducted in Brazil showed similar or higher rates of MRSP in animals with pyoderma, otitis and UTI [22–25, 46] when compared to the present work. It is important to emphasize that comparisons between different studies are not easy to make, as the prevalence of MRSP depends not only

on the geographic region but also on the type of sample, the population included, and methodology of the study [1, 57].

Interestingly, over 90% of *S. pseudintermedius* strains isolated from surgical wounds were MRSP. Statistical analysis revealed that SSIs, prior antimicrobial treatment, and nosocomial infections are associated with the occurrence of MRSP. This is in agreement with the literature, which has demonstrated that prior antimicrobial exposure, hospitalization, and skin lesions and/or surgical wounds are associated with a higher risk of acquiring MRSP [9, 35, 58–60]. Furthermore, it is possible that the large use of amoxicillin/clavulanic acid, cephalosporins, and fluoroquinolones, which were the main antimicrobials prescribed to dogs included in this study, may be linked to the selection of MRSP [12, 14].

Previous studies using MLST provided information about the population structure of MRSP and have shown that dissemination of this pathogen is linked to some successful clonal lineages, particularly CC71 and CC258 in Europe, CC68 in North America, and both CC45 and CC112 in Asia [56, 61, 62]. In Brazil, only one study has reported the CC of their isolates—a single MRSP ST71 strain isolated from the nostril of a healthy dog [63], so there is no extensive knowledge about the genetic background of *S. pseudintermedius* currently circulating in the country. In the present study, approximately 41.7% (10/24) of the MRSP strains belonged to CC71, which was also reported in Brazil previously [63]. Studies have shown that CC71 is frequently resistant to all antimicrobials used in the routine of small animals, including macrolides, aminoglycosides, and fluoroquinolones, and that it can be associated with higher rates of resistance to oxacillin, amoxicillin/clavulanic acid, cephalothin, and ampicillin [4, 21, 64]. In fact, isolates belonging to CC71 in the present study were all resistant to at least six classes of non-beta-lactam antimicrobials, including fluoroquinolones, which are associated with the successful spread of MDR MRSP lineages [53]. Most CC71 strains were isolated from SSIs at the same veterinary hospital (data not shown), which raised the concern of possible nosocomial transmission as previously reported [59]. Further molecular characterization is required to confirm this hypothesis.

Recent studies across Europe, North America, and Oceania have shown that the prevalence of new lineages is increasing, possibly overcoming the prevalence of CC71 within years [4, 5, 35, 62, 65]. In the present study, 62.5% (15/24) of the MRSP strains belonged to nine new STs. All STs were resistant to at least three different classes of non-beta-lactam antimicrobials, and some of them were isolated from more than one animal. This observation corroborates the hypothesis that events of horizontal gene transfer may be as relevant as clonal dispersion to MRSP and highlights the need for more studies in Brazil to better understand the evolution of these new lineages [1, 4, 35, 56].

This is the first study to extensively investigate the phenotypic and molecular characteristics of *S. pseudintermedius* isolates in Brazil. In addition, this study identified risk factors for acquisition of MRSP and analyzed the population structure of MRSP strains, which contributes to understanding the dispersion of MRSP not only in Brazil, but also in South America, where there is still a lack of information about it. The present study confirmed that *S. pseudintermedius* is the main staphylococcal species isolated from infected dogs in Belo Horizonte. The high rate of MDR observed, especially MRSP-MDR strains, is of great concern. CC71 is currently circulating among Brazilian veterinary clinics and poses a challenge to therapeutic protocols due to its resistance to most antimicrobial classes of daily use in small animal practice and its rapid dispersion. Nevertheless, the new STs found in this study indicate that the spread of MRSP via horizontal gene transfer may be as relevant as clonal dispersion. To our knowledge, this is the first Brazilian report that identified MRSP ST71 in diseased dogs and revealed new circulating STs in the country.

Supporting information

S1 File. Supplementary file: Details of the animals included.
(XLSX)

S2 File. Raw data of the identification and antimicrobial susceptibility tests.
(XLSX)

Acknowledgments

We thank Adriane Pimenta da Costa-Val Bicalho for support and animal samples. We thank Renato Faria for his valuable contribution in the statistical analysis.

Author Contributions

Conceptualization: Júlia Lara Sette Câmara, Rodrigo Otávio Silveira Silva.

Data curation: Flávia Mello Viegas, Henrique César Pereira Figueiredo, Rodrigo Otávio Silveira Silva.

Formal analysis: Flávia Mello Viegas, Jordana Almeida Santana, Rafael Gariglio Clark Xavier, João Luis Reis Cunha, Henrique César Pereira Figueiredo, Rodrigo Otávio Silveira Silva.

Funding acquisition: Rodrigo Otávio Silveira Silva.

Investigation: Flávia Mello Viegas, Jordana Almeida Santana, Brendhal Almeida Silva, Rafael Gariglio Clark Xavier, Júlia Lara Sette Câmara, Mário Cesar Rennó, João Luis Reis Cunha, Henrique César Pereira Figueiredo, Rodrigo Otávio Silveira Silva.

Methodology: Flávia Mello Viegas, Jordana Almeida Santana, Brendhal Almeida Silva, Rafael Gariglio Clark Xavier, Cláudia Teixeira Bonisson, Júlia Lara Sette Câmara, Mário Cesar Rennó, João Luis Reis Cunha, Henrique César Pereira Figueiredo, Francisco Carlos Faria Lobato, Rodrigo Otávio Silveira Silva.

Supervision: Francisco Carlos Faria Lobato.

Validation: João Luis Reis Cunha.

Writing – original draft: Flávia Mello Viegas, Francisco Carlos Faria Lobato, Rodrigo Otávio Silveira Silva.

Writing – review & editing: Flávia Mello Viegas, Jordana Almeida Santana, Brendhal Almeida Silva, Cláudia Teixeira Bonisson, Júlia Lara Sette Câmara, Mário Cesar Rennó, João Luis Reis Cunha, Henrique César Pereira Figueiredo, Rodrigo Otávio Silveira Silva.

References

1. Bannoehr J, Guardabassi L. *Staphylococcus pseudintermedius* in the dog: Taxonomy, diagnostics, ecology, epidemiology and pathogenicity. *Vet Dermatol.* 2012; 23(4). <https://doi.org/10.1111/j.1365-3164.2012.01046.x> PMID: 22515504
2. Murray AK, Lee J, Bendall R, Zhang L, Sunde M, Schau Slette-meås J, et al. *Staphylococcus cornubien-sis* sp. nov., a member of the *Staphylococcus intermedius* group (SIG). *Int J Syst Evol Microbiol* 2018; 68: 3404–8. <https://doi.org/10.1099/ijsem.0.002992> PMID: 30204583
3. Weese JS, van Duijkeren E. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus pseudintermedius* in veterinary medicine. *Vet Microbiol.* 2010; 140: 418–29. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2009.01.039> PMID: 19246166
4. Duim B, Verstappen KM, Broens EM, Laarhoven LM, Van Duijkeren E, Hordijk J, et al. Changes in the population of methicillin-resistant *Staphylococcus pseudintermedius* and dissemination of

- antimicrobial-resistant phenotypes in the Netherlands. *J Clin Microbiol*. 2016; 54(2): 283–8. <https://doi.org/10.1128/JCM.01288-15> PMID: 26582835
5. Bergot M, Martins-Simoes P, Kilian H, Châtre P, Worthing KA, Norris JM, et al. Evolution of the population structure of *Staphylococcus pseudintermedius* in France. *Front Microbiol*. 2018; 9: 1–10. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.03055>
 6. Wegener A, Broens EM, Zomer A, Spaninks M, Wagenaar JA, Duim B. Comparative genomics of phenotypic antimicrobial resistances in methicillin-resistant *Staphylococcus pseudintermedius* of canine origin. *Vet Microbiol*. 2018; 225: 125–31. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2018.09.013> PMID: 30322524
 7. Gagetti P, Wattam AR, Giacoboni G, De Paulis A, Bertona E, Corso A, et al. Identification and molecular epidemiology of methicillin resistant *Staphylococcus pseudintermedius* strains isolated from canine clinical samples in Argentina. *BMC Vet Res*. 2019; 15(1): 1–12. <https://doi.org/10.1186/s12917-019-1990-x>
 8. Krapp M, Müller E, Reissig A, Slickers P, Braun SD, Müller E, et al. Molecular characterisation of methicillin-resistant *Staphylococcus pseudintermedius* from dogs and the description of their SCCmec elements. *Vet Microbiol*. 2019; 233: 196–203. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2019.04.002> PMID: 31053353
 9. van Duijkeren E, Catry B, Greko C, Moreno MA, Pomba MC, Pyörälä S, et al. Review on methicillin-resistant *Staphylococcus pseudintermedius*. *J Antimicrob Chemother*. 2011; 66(12): 2705–14. <https://doi.org/10.1093/jac/dkr367> PMID: 21930571
 10. Kadlec K, Schwarz S. Antimicrobial resistance of *Staphylococcus pseudintermedius*. *Vet Dermatol*. 2012; 23(4): 19–25. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3164.2012.01056.x> PMID: 22681522
 11. Morris DO, Loeffler A, Davis MF, Guardabassi L, Weese JS. 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. *Vet Dermatol*. 2017; 28(3): 304–e69. <https://doi.org/10.1111/vde.12444> PMID: 28516494
 12. Pomba C, Rantala M, Greko C, Baptiste KE, Catry B, van Duijkeren E, et al. Public health risk of antimicrobial resistance transfer from companion animals. *J Antimicrob Chemother*. 2016; 72(4): 957–68. <https://doi.org/10.1093/jac/dkw481>
 13. Kang JH, Hwang CY. One health approach to genetic relatedness in SCCmec between methicillin-resistant *Staphylococcus* isolates from companion dogs with pyoderma and their owners. *Vet Microbiol*. 2021; 253: 108957. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2020.108957> PMID: 33385887
 14. Guardabassi L, Larsen J, Weese JS, Butaye P, Battisti A, Kluytmans J, et al. Public health impact and antimicrobial selection of methicillin-resistant staphylococci in animals. *J Glob Antimicrob Resist*. 2013; 1(2): 55–62. <https://doi.org/10.1016/j.jgar.2013.03.011> PMID: 27873579
 15. Somayaji R, Priyantha MAR, Rubin JE, Church D. Human infections due to *Staphylococcus pseudintermedius*, an emerging zoonosis of canine origin: report of 24 cases. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2016; 85(4): 471–6. <https://doi.org/10.1016/j.diagmicrobio.2016.05.008> PMID: 27241371
 16. Lozano C, Rezusta A, Ferrer I, Pérez-Laguna V, Zarazaga M, Ruiz-Ripa L, et al. *Staphylococcus pseudintermedius* Human Infection Cases in Spain: Dog-to-Human Transmission. *Vector-Borne Zoonotic Dis*. 2017; 17(4): 268–70. <https://doi.org/10.1089/vbz.2016.2048> PMID: 28075235
 17. Ference EH, Danielian A, Kim HW, Yoo F, Kuan EC, Suh JD. Zoonotic *Staphylococcus pseudintermedius* sinonasal infections: risk factors and resistance patterns. *Int Forum Allergy Rhinol*. 2019; 9(7): 724–9. <https://doi.org/10.1002/alr.22329> PMID: 30907985
 18. Blondeau LD, Rubin JE, Deneer H, Kanthan R, Morrison B, Sanche S, et al. Persistent infection with *Staphylococcus pseudintermedius* in an adult oncology patient with transmission from a family dog. *J Chemother*. 2020: 1–5. <https://doi.org/10.1080/1120009X.2020.1735142> PMID: 32124685
 19. Gagetti P, Errecalde L, Wattam AR, De Belder D, Ojeda Saavedra M, Corso A, et al. Characterization of the First mecA-Positive Multidrug-Resistant *Staphylococcus pseudintermedius* Isolated from an Argentinian Patient. *Microb Drug Resist*. 2020: 1–5. <https://doi.org/10.1089/mdr.2019.0308>
 20. Stegmann R, Burnens A, Maranta CA, Perreten V. Human infection associated with methicillin-resistant *Staphylococcus pseudintermedius* ST71. *J Antimicrob Chemother*. 2010; 65(9): 2047–8. <https://doi.org/10.1093/jac/dkq241> PMID: 20601356
 21. Paul NC, Moodley A, Ghibaud G, Guardabassi L. Carriage of methicillin-resistant *Staphylococcus pseudintermedius* in small animal veterinarians: Indirect evidence of zoonotic transmission. *Zoonoses Public Health*. 2011; 58(8): 533–9. <https://doi.org/10.1111/j.1863-2378.2011.01398.x> PMID: 21824350
 22. Penna B, Varges R, Martins R, Martins G, Lilienbaum W. In vitro antimicrobial resistance of staphylococci isolated from canine urinary tract infection. *Can Vet J*. 2010; 51(7): 738–42. PMID: 20885826










23. Botoni LS, Scherer CB, Silva RO, Coura FM, Heinemann MB, Paes-Leme FO, et al. Prevalence and in vitro susceptibility of methicillin-resistant *Staphylococcus pseudintermedius* (MRSP) from skin and nostrils of dogs with superficial pyoderma. *Pesqui Vet Bras*. 2016; 36(12): 1178–80. <https://doi.org/10.1590/S0100-736X2016001200006>
24. Bourguignon E, Viçosa GN, Corsini CMM, Moreira MAS, Nero LA, Conceição LG. Description of Methicillin-resistant *Staphylococcus pseudintermedius* from canine pyoderma in Minas Gerais state, Brazil. *Arq Bras Med Vet e Zootec*. 2016; 68(2): 299–306. <https://doi.org/10.1590/1678-4162-8150>
25. Scherer CB, Botoni LS, Coura FM, Silva RO, Dos Santos RD, Heinemann MB, et al. Frequency and antimicrobial susceptibility of *Staphylococcus pseudintermedius* in dogs with otitis externa. *Cienc Rural*. 2018; 48(4): e20170738. <https://doi.org/10.1590/0103-8478cr20170738>
26. Assis GBN, Pereira FL, Zegarra AU, Tavares GC, Leal CA, Figueiredo HCP. Use of MALDI-TOF mass spectrometry for the fast identification of gram-positive fish pathogens. *Front Microbiol*. 2017; 8. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.01492> PMID: 28848512
27. Sasaki T, Tsubakishita S, Tanaka Y, Sakusabe A, Ohtsuka M, Hirotsuki S, et al. Multiplex-PCR method for species identification of coagulase-positive staphylococci. *J Clin Microbiol*. 2010; 48(3): 765–9. <https://doi.org/10.1128/JCM.01232-09> PMID: 20053855
28. Fox JG, Ge Z, Whary MT, Erdman SE, Horwitz BH. *Helicobacter hepaticus* infection in mice: Models for understanding lower bowel inflammation and cancer. *Mucosal Immunol*. 2011; 4(1): 22–30. <https://doi.org/10.1038/mi.2010.61> PMID: 20944559
29. Mellmann A, Becker K, Von Eiff C, Keckevoet U, Schumann P, Harmsen D. Sequencing and staphylococci identification. *Emerg Infect Dis*. 2006; 12(2): 333–6. <https://doi.org/10.3201/eid1202.050962> PMID: 16494767
30. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing. 31st ed. CLSI supplement M100; ISBN 978-1-68440-105-5. Clinical and Laboratory Standards Institute, USA, 2021.
31. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Performance Standards for Antimicrobial Disk and Dilution Susceptibility Tests for Bacteria Isolated From Animals. 5th ed. CLSI supplement VET01S; ISBN 978-1-68440-093-5. Clinical and Laboratory Standards Institute, USA, 2020.
32. Pitcher DG, Saunders NA, Owen RJ. Rapid extraction of bacterial genomic DNA with guanidium thiocyanate. *Lett Appl Microbiol*. 1989; 8(4): 151–6. <https://doi.org/10.1111/j.1472-765X.1989.tb00262.x>
33. Murakami K.; Minamide W.; Wada K.; Nakamura E.; Teraoka H.; Watanabe S. Identification of Methicillin-Resistant Strains of Staphylococci by Polymerase Chain Reaction. *Am J Clin Pathol [Internet]*. 1991; 29(10): 2240–4. <https://doi.org/10.1128/jcm.29.10.2240-2244.1991> PMID: 1939577
34. Solyman SM, Black CC, Duim B, Perreten V, Van Duijkeren E, Wagenaar JA, et al. Multilocus sequence typing for characterization of *Staphylococcus pseudintermedius*. *J Clin Microbiol*. 2013; 51(1): 306–10. <https://doi.org/10.1128/JCM.02421-12> PMID: 23115265
35. Grönthal T, Eklund M, Thomson K, Piiparinen H, Sironen T, Rantala M. Antimicrobial resistance in *Staphylococcus pseudintermedius* and the molecular epidemiology of methicillin-resistant *S. pseudintermedius* in small animals in Finland. *J Antimicrob Chemother*. 2017; 72(4): 1021–30. <https://doi.org/10.1093/jac/dkw559> PMID: 28065889
36. Nascimento M, Sousa A, Ramirez M, Francisco AP, Carriço JA, Vaz C. PHYLOViZ 2.0: Providing scalable data integration and visualization for multiple phylogenetic inference methods. *Bioinformatics*. 2017; 33(1): 128–9. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btw582> PMID: 27605102
37. Francisco AP, Bugalho M, Ramirez M, Carriço JA. Global optimal eBURST analysis of multilocus typing data using a graphic matroid approach. *BMC Bioinformatics*. 2009; 10: 1–15. <https://doi.org/10.1186/1471-2105-10-152>
38. Minh BQ, Schmidt HA, Chernomor O, Schrempf D, Woodhams MD, Von Haeseler A, et al. IQ-TREE 2: New Models and Efficient Methods for Phylogenetic Inference in the Genomic Era. *Mol Biol Evol*. 2020; 37(5): 1530–4. <https://doi.org/10.1093/molbev/msaa015> PMID: 32011700
39. Letunic I, Bork P. Interactive Tree of Life (iTOL) v4: Recent updates and new developments. *Nucleic Acids Res*. 2019; 47: 256–9. <https://doi.org/10.1093/nar/gkz239> PMID: 30931475
40. Madhaiyan M, Wirth JS, Saravanan VS. Phylogenomic analyses of the *Staphylococcaceae* family suggest the reclassification of five species within the genus *Staphylococcus* as heterotypic synonyms, the promotion of five subspecies to novel species, the taxonomic reassignment of five *Staphylococcus* species to *Mammaliococcus* gen. Nov., and the formal assignment of *Nosocomiicoccus* to the family *Staphylococcaceae*. *Int J Syst Evol Microbiol*. 2020; 70(11): 5926–36. <https://doi.org/10.1099/ijsem.0.004498> PMID: 33052802
41. Hensel N, Zabel S, Hensel P. Prior antibacterial drug exposure in dogs with methicillin-resistant *Staphylococcus pseudintermedius* (MRSP) pyoderma. *Vet Dermatol*. 2016; 27(2): 72–e20. <https://doi.org/10.1111/vde.12292> PMID: 26909526

42. Morris DO, Rook KA, Shofer FS, Rankin SC. 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). *Vet Dermatol*. 2006; 17(5): 332–7. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3164.2006.00536.x> PMID: 16961819
43. Lee GY, Lee HH, Hwang SY, Hong J, Lyoo KS, Yang SJ. Carriage of *Staphylococcus schleiferi* from canine otitis externa: Antimicrobial resistance profiles and virulence factors associated with skin infection. *J Vet Sci*. 2019; 20(2): 1–11. <https://doi.org/10.4142/jvs.2019.20.e6> PMID: 30944529
44. World Organisation for Animal Health (OIE). Antimicrobial resistance. Available at <https://www.oie.int/en/what-we-do/global-initiatives/antimicrobial-resistance/>
45. Larsen RF, Boysen L, Jessen LR, Guardabassi L, Damborg P. Diversity of *Staphylococcus pseudintermedius* in carriage sites and skin lesions of dogs with superficial bacterial folliculitis: potential implications for diagnostic testing and therapy. *Vet Dermatol*. 2018; 29(4): 291–e100. <https://doi.org/10.1111/vde.12549> PMID: 29781542
46. Penna B, Varges R, Medeiros L, Martins GM, Martins RR, Lilenbaum W. Species distribution and antimicrobial susceptibility of staphylococci isolated from canine otitis externa. *Vet Dermatol* [Internet]. 2010(3): 292–6. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3164.2009.00842.x> PMID: 20042036
47. Weese JS, Blondeau J, Boothe D, Guardabassi LG, Gumley N, Papich M, 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. *Vet J*. 2019; 247: 8–25. <https://doi.org/10.1016/j.tvjl.2019.02.008> PMID: 30971357
48. Lynch SA, Helbig KJ. The complex diseases of *Staphylococcus pseudintermedius* in canines: Where to next? *Vet Sci*. 2021; 8(1): 1–19. <https://doi.org/10.3390/vetsci8010011> PMID: 33477504
49. Nelson LL. Surgical site infections in small animal surgery. *Vet Clin North Am—Small Anim Pract*. 2011; 41(5): 1041–56. <https://doi.org/10.1016/j.cvsm.2011.05.010> PMID: 21889700
50. British Small Animal Veterinary Association. BSAVA/SAMSoc Guide to Responsible Use of Antibacterials: PROTECT ME. 2018. Available at <https://www.bsavalibrary.com/content/book/10.22233/9781910443644#overview>.
51. Frank LA, Loeffler A. Methicillin-resistant *Staphylococcus pseudintermedius*: clinical challenge and treatment options. *Vet Dermatol*. 2012; 23(4): 283–e56. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3164.2012.01047.x> PMID: 22486942
52. Moodley A, Damborg P, Nielsen SS. Antimicrobial resistance in methicillin susceptible and methicillin resistant *Staphylococcus pseudintermedius* of canine origin: Literature review from 1980 to 2013. *Vet Microbiol*. 2014; 171: 337–41. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2014.02.008> PMID: 24613081
53. McCarthy AJ, Harrison EM, Stanczak-Mrozek K, Leggett B, Waller A, Holmes MA, et al. Genomic insights into the rapid emergence and evolution of MDR in *Staphylococcus pseudintermedius*. *J Antimicrob Chemother*. 2015; 70(4): 997–1007. <https://doi.org/10.1093/jac/dku496> PMID: 25527273
54. World Organisation for Animal Health (OIE). OIE List of Antimicrobial Agents of Veterinary Importance. OIE Int Committee. 2018. Available at: <http://www.oie.int>
55. BRAZIL. MAPA (Ministry of Agriculture, Livestock and Food Supply). Instrução normativa n. 9 de 27 de junho de 2003. Brasília. Diário oficial da União, Seção 1. 2003: p. 4. Available at <https://www.gov.br/agricultura/pt-br/assuntos/insumos-agropecuarios/insumos-pecuarios/alimentacao-animal/arquivos-alimentacao-animal/legislacao/instrucao-normativa-no-9-de-27-de-junho-de-2003.pdf/view>
56. Pires dos Santos T, Damborg P, Moodley A, Guardabassi L. Systematic Review on Global Epidemiology of Methicillin-Resistant *Staphylococcus pseudintermedius*: Inference of Population Structure from Multilocus Sequence Typing Data. *Front Microbiol*. 2016; 7: 1–12. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.01599>
57. Hritcu OM, Schmidt VM, Salem SE, Maciucă IE, Moraru RF, Lipovan I, et al. Geographical Variations in Virulence Factors and Antimicrobial Resistance Amongst Staphylococci Isolated From Dogs From the United Kingdom and Romania. *Front Vet Sci*. 2020; 7: 1–10. <https://doi.org/10.3389/fvets.2020.00414>
58. Weese JS, Faires MC, Frank LA, Reynolds LM, Battisti A. Factors associated with methicillin-resistant versus methicillin-susceptible *Staphylococcus pseudintermedius* infection in dogs. *J Am Vet Med Assoc*. 2012; 240(12): 1450–5. <https://doi.org/10.2460/javma.240.12.1450> PMID: 22657928
59. Grönthal T, Moodley A, Nykäsenoja S, Junnila J, Guardabassi L, Thomson K, 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*. 2014; 9(10): e110084. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0110084> PMID: 25333798
60. Saputra S, Jordan D, Worthing KA, Norris JM, Wong HS, Abraham R, et al. Antimicrobial resistance in coagulase-positive staphylococci isolated from companion animals in Australia: A one year study. Smith TC, editor. *PLoS One*. 2017; 12(4): e0176379. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0176379> PMID: 28430811

61. Perreten V, Kadlec K, Schwarz S, Gronlund Andersson U, Finn M, Greko C, et al. Clonal spread of methicillin-resistant *Staphylococcus pseudintermedius* in Europe and North America: an international multicentre study. *J Antimicrob Chemother.* 2010; 65(6): 1145–54. <https://doi.org/10.1093/jac/dkq078> PMID: 20348087
62. Meroni G, Soares Filipe JF, Drago L, Martino PA. Investigation on Antibiotic-Resistance, Biofilm Formation and Virulence Factors in Multi Drug Resistant and Non Multi Drug Resistant *Staphylococcus pseudintermedius*. *Microorganisms.* 2019; 7(702). <https://doi.org/10.3390/microorganisms7120702> PMID: 31888149
63. Quitoco IMZ, Ramundo MS, Silva-Carvalho MC, Souza RR, Beltrame CO, de Oliveira TF, 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 Res Notes.* 2013; 6(336). <https://doi.org/10.1186/1756-0500-6-336> PMID: 23981343
64. Wegener A, Damborg P, Guardabassi L, Moodley A, Mughini-Gras L, Duim B, et al. Specific staphylococcal cassette chromosome *mec* (SCC*mec*) types and clonal complexes are associated with low-level amoxicillin/clavulanic acid and cefalotin resistance in methicillin-resistant *Staphylococcus pseudintermedius*. *J Antimicrob Chemother.* 2020; 75(3): 508–11. <https://doi.org/10.1093/jac/dkz509> PMID: 31846043
65. Nisa S, Bercker C, Midwinter AC, Bruce I, Graham CF, Venter P, et al. Combining MALDI-TOF and genomics in the study of methicillin resistant and multidrug resistant *Staphylococcus pseudintermedius* in New Zealand. *Sci Rep.* 2019; 9(1271). <https://doi.org/10.1038/s41598-018-37503-9> PMID: 30718644



Identification and characterization of pathogenic and multidrug-resistant bacteria in feral pigeons surrounding a veterinary hospital in Minas Gerais, Brazil

Jordana Almeida Santana¹  Carolina Pantuzza Ramos¹  Brendhal Almeida Silva¹ 
 Graciela Kunrath Lima¹  Alexandra Tiso Comerlato¹  Amanda Cristina Araújo¹ 
 Salene Angelini Colombo¹  Gustavo Canesso Bicalho¹  Rodrigo Otávio Silveira Silva^{1*} 

¹Faculdade de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), 31270-901, Belo Horizonte, MG, Brasil. E-mail: rodrigo.otaviosilva@gmail.com. *Corresponding author.

ABSTRACT: Pigeons are known for their capacity to harbor and spread several zoonotic agents. Studies have suggested that pigeons are also relevant disseminators of multidrug-resistant strains. In this study, pigeons surrounding a veterinary hospital were sampled and tested for the presence of pathogenic *Escherichia coli*, *Salmonella* spp., *Staphylococcus* spp., and *Clostridioides (Clostridium) difficile*. *E. coli* isolates from 19 (40.4%) pigeons tested positive for the *E. coli* heat-stable enterotoxin 1 (EAST1)-encoding gene. The intimin-encoding gene (*eae*) of enteropathogenic *E. coli* (EPEC) was found in one isolate (2.1%). *Salmonella* spp. were found in nine (19.1%) pigeons, all from the first capture event ($P < 0.001$). *S. Typhimurium* and *S. Heidelberg* were isolated from six and three pigeons, respectively. Enterobacterial repetitive intergenic consensus (ERIC-PCR) of the *Salmonella* spp. isolates suggested that eight of the nine strains had a high genetic similarity, supporting the hypothesis of an outbreak of salmonellosis in these pigeons. Twenty (42.5%) staphylococcal isolates were recovered from 18 (38.3%) pigeons. Eight different species were detected, with *S. xylosus* being the most frequent. Two (4.3%) *C. difficile* strains were isolated. Three isolates, one each of *S. Typhimurium*, *S. aureus*, and *C. difficile*, were classified as multidrug-resistant strains. The present research suggested that pigeons residing in urban areas can act as reservoirs and disseminators of pathogenic bacteria, including nosocomial pathogens, such as diarrheagenic *E. coli* and multidrug-resistant *Staphylococcus* spp., *C. difficile*, and *Salmonella* spp.

Key words: *Salmonella*, *Clostridioides (Clostridium) difficile*, pigeons, *Staphylococcus*, synanthropes.

Identificação de bactérias patogênicas e multirresistentes a antimicrobianos em pombos urbanos no entorno de um Hospital Veterinário em Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil

RESUMO: Pombos urbanos são conhecidos pela sua capacidade de carrear e disseminar diversos agentes zoonóticos. Estudos tem sugerido que pombos são também relevantes na disseminação de estirpes resistentes a múltiplas drogas. No presente estudo, pombos no ambiente de um hospital veterinário foram amostrados em três diferentes períodos e testados para a presença de *Escherichia coli* patogênica, *Salmonella* spp., *Staphylococcus* spp. e *Clostridioides (Clostridium) difficile*. Isolados de *E. coli* de 19 pombos (40.4%) foram positivos para o gene codificador da toxina EAST1. O gene codificador de intimina (*eae*) do patótipo *E. coli* enteropatogênica foi encontrada em um isolado (2.1%). *Salmonella* spp. foi encontrada em nove pombos (19.1%), sendo todos isolados do primeiro período de captura ($P < 0.001$). *S. Typhimurium* foi isolado de seis animais e *S. Heidelberg* de três. A tipagem molecular de isolados de *Salmonella* spp. por ERIC-PCR demonstrou que oito estirpes possuíam alta similaridade genética entre si, sugerindo a ocorrência de um surto de salmonelose nos animais carreadores. Vinte *Staphylococcus* (42.5%) foram isolados de 18 animais (38.3%). Oito diferentes espécies foram detectadas, sendo *S. xylosus* a mais frequente. Duas estirpes de *C. difficile* não-toxigênica (4.3%) foram isoladas. Uma estirpe de *S. Typhimurium*, uma de *S. aureus* e um isolado de *C. difficile* foram classificados como resistentes a múltiplas drogas antimicrobianas. O presente estudo sugere que pombos capturados no ambiente do hospital veterinário podem atuar como reservatórios e disseminadores de bactérias patogênicas e envolvidas em infecção hospitalar, incluindo *E. coli* diarrreogênica e *Staphylococcus* sp., *C. difficile* e *Salmonella* spp multirresistente.

Palavras-chave: *Salmonella*, *Clostridioides (Clostridium) difficile*, pestes, *Staphylococcus*, sinantrópicos.

1 INTRODUCTION

2
 3 Urban feral pigeons (*Columba livia* f.
 4 *urbana*) are birds with a worldwide distribution
 5 commonly reported in most large cities (FERMAN et
 6 al., 2010; GARGIULO et al., 2014; SPENNEMANN
 7 & WATSON, 2017). The large population densities of

urban pigeons in cities are mainly related to the large
 availability of food, lack or less number of predators,
 and the built environment resembling the original
 habitat of urban pigeon ancestors (SPENNEMANN
 & WATSON, 2017). They are known for their
 capacity to harbor and spread several zoonotic agents,
 such as *Cryptococcus neoformans* and *Salmonella*

1 spp. (HAAG-WACKERNAGEL & MOCH, 2004;
 2 DUTTA et al., 2013; HAESSENDONCK et al., 2016;
 3 SPENNEMANN & WATSON, 2017). Recently,
 4 studies have suggested that pigeons can also be
 5 relevant carriers of multidrug-resistant (MDR)
 6 bacteria (BORGES et al., 2017; TORRES-MEJÍA et
 7 al., 2018; CUNHA et al., 2019). Thus, close contact
 8 with pigeons and their feces is a risk for people who
 9 frequently share the same environment with these
 10 animals (HAAG-WACKERNAGEL & MOCH,
 11 2004; TANAKA et al., 2005; GARGIULO et al.,
 12 2014). This is the scenario for employees, students,
 13 owners, and animals in the Veterinary Hospital of the
 14 Federal University of Minas Gerais (HV-UFMG),
 15 where the pigeon population has increased markedly
 16 in the last few years.

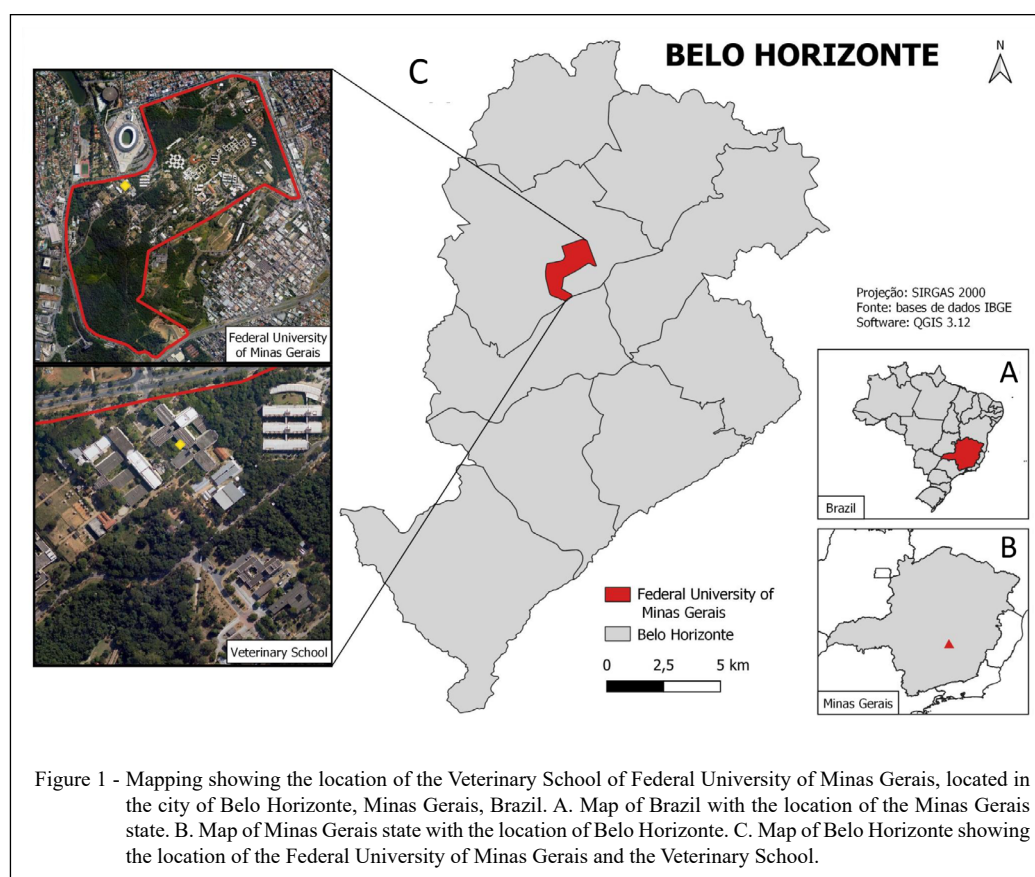
17 Despite the known importance of pigeons
 18 as reservoirs of several pathogens, no studies have
 19 evaluated them in a university environment, and their
 20 possible role in the epidemiology of some relevant
 21 nosocomial infections in companion animals is still
 22 unknown. In addition, the presence of *Staphylococcus*

sp. and *Clostridioides* (previously *Clostridium*)
difficile in pigeons has been reported in a few studies;
 however, none of the studies have been conducted in
 Brazil. Thus, this study investigated the occurrence
 and antimicrobial susceptibility of enteric bacteria
 isolated from pigeons captured in an urban area
 surrounding a veterinary hospital in Belo Horizonte,
 Minas Gerais, Brazil.

MATERIALS AND METHODS

Samples

This study was conducted at the Veterinary
 Hospital of the Federal University of Minas Gerais
 (HV-UFMG), which receives approximately 35,000
 animals per year, including dogs, cats, horses,
 cattle, and wild animals. It is located inside the
 university campus and is surrounded by a green area
 (Figure 1). This study was motivated by the increase
 in pigeon population in the last few years in HV-
 UFMG, raising the need for a better understanding
 of the risks associated with these birds. Forty-seven



1 pigeons (*Columba livia*) were sampled after three
2 capture campaigns (January/2019, July/2019, and
3 January/2020), captured using mist nets (30 mm
4 mesh size; four shelves, ap. 3 m high x 9 m length)
5 during early mornings, in places where large animals
6 fed. The first capture event occurred in January
7 2019 during the wet season, with a monthly mean
8 precipitation of 2.3 mm and a mean temperature of
9 25.6 °C (INMET, 2019), with 18 birds captured. The
10 second capture event occurred in July of the same
11 year during the dry season, with 0 mm of precipitation
12 and a mean temperature of 19.2 °C (INMET, 2019),
13 with 13 birds captured. The third and last capture
14 occurred in January 2020, with a monthly mean
15 precipitation of 1.3 mm and a mean temperature of
16 21.5 °C (INMET, 2020), with 16 birds captured. The
17 pigeons were physically restrained, given colored
18 leg rings for identification and monitoring purposes,
19 and left to rest in individual cages. Fresh feces were
20 collected immediately after dropping and stored
21 in microtubes using sterile spatulas (ROSARIO
22 MEDINA et al., 2017). The samples were stored in a
23 transport box with ice packs and sent to the Bacterial
24 and Research Laboratory of the Veterinary School of
25 UFMG for immediate processing. Each pigeon was
26 returned to its environment once sample collection
27 was completed.

29 *Escherichia coli*

30 For *E. coli* isolation, the samples were plated
31 onto MacConkey agar (Difco, USA) and incubated at
32 37 °C for 24 h (RAMOS et al., 2019a). Three lactose-
33 fermenting colonies were identified using polymerase
34 chain reaction (PCR) and subjected to subsequent
35 reactions for phylogenetic group characterization
36 (A, B1, B2, C, D, E, and F) (MCDANIELS et
37 al., 1996; CLERMONT et al., 2013). Virulence
38 genes associated with pathogenic *E. coli*, such as
39 enterotoxigenic *E. coli* (ETEC), enteropathogenic
40 *E. coli* (EPEC), Shiga toxin-producing *E. coli* (STEC),
41 enterohemorrhagic *E. coli* (EHEC), necrotoxic
42 *E. coli* (NTEC), and enteroaggregative *E. coli*
43 (EAEC), were also identified using PCR (BLANCO
44 et al., 1996; YAMAMOTO & NAKAZAWA, 1997;
45 FRANCK et al., 1998). Antibiotic resistance patterns
46 of all *E. coli* isolates that tested positive for virulence
47 factors were evaluated using the disc diffusion
48 method (DDM), according to the Clinical and
49 Laboratory Standards Institute (CLSI) manual (CLSI,
50 2017; CLSI, 2018). The following antimicrobial
51 agents, commonly used in human and animal clinical
52 practice, were tested: chloramphenicol (30 µg),
53 trimethoprim/sulfamethoxazole (25 µg), ceftriaxone

(30 µg), ceftiofur (30 µg), amoxicillin/clavulanic
acid (30 µg), ampicillin (10 µg), tetracycline (30 µg),
enrofloxacin (5 µg), ciprofloxacin (5 µg), gentamicin
(10 µg), and amikacin (30 µg) (DME, BRA).

6 *Salmonella* spp.

7 For *Salmonella* spp. isolation, cloacal
8 samples were pre-enriched in Rappaport broth (Oxoid,
9 USA) and plated onto Hektoen enteric agar (Oxoid,
10 USA) (RAMOS et al., 2019a). Sulfite-reducing
11 colonies were identified as *Salmonella* spp. by genus-
12 specific PCR, according to KUANG et al. (2015).
13 Antigenic characterization was done according to the
14 White-Kauffmann-Le Minor Scheme (LE MINOR &
15 POPOFF, 1987) at the Brazilian National Reference
16 Laboratory of Enterobacteria of the Oswaldo Cruz
17 Foundation, followed by species, subspecies, and
18 serotype identification (GRIMONT & WEILL,
19 2007). *Salmonella* spp. strains were fingerprinted
20 using enterobacterial repetitive intergenic consensus
21 (ERIC)-PCR and analyzed using Bionumerics 7.6
22 software (Applied Maths NV, Belgium) to evaluate
23 the genetic diversity between isolates from different
24 pigeon samples (VERSALOVIC et al., 1991;
25 RAMOS et al., 2019b). Additionally, DDM was used
26 to evaluate the resistance patterns of *Salmonella* spp.
27 isolates to antimicrobial agents (CLSI, 2017; CLSI,
28 2018) using the following drugs: chloramphenicol
29 (30 µg), trimethoprim/sulfamethoxazole (25 µg),
30 ceftriaxone (30 µg), ceftiofur (30 µg), amoxicillin/
31 clavulanic acid (30 µg), ampicillin (10 µg), tetracycline
32 (30 µg), nalidixic acid (30 µg), enrofloxacin (5 µg),
33 and ciprofloxacin (5 µg) (DME, BRA).

35 *Staphylococcus* spp.

36 For *Staphylococcus* spp. isolation, fecal
37 samples were first suspended in 0.85% saline
38 solution. The resultant solution (100 µL) was then
39 streaked onto mannitol salt agar (Difco Laboratories
40 Inc., USA), which was incubated at 37 °C for 24 h.
41 Colonies were sub-cultured on brain heart infusion
42 agar (Difco Laboratories Inc., USA) and identified by
43 matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-
44 flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS; Bruker
45 Daltonics, Germany). A cutoff log score of 2 was
46 used to validate identification at the species level,
47 as recommended by the manufacturer. The strains
48 were then subjected to DNA extraction (PITCHER
49 et al., 1989), and methicillin-resistant staphylococci
50 were investigated by detecting the *mecA* gene
51 (MURAKAMI et al., 1991). In addition, isolates
52 identified as *Staphylococcus intermedius* group
53 (SIG) using MALDI-TOF were further confirmed by

1 multiplex PCR of the *nuc* gene (SASAKI et al., 2010).
 2 Non-SIG isolates with MALDI-TOF score under 2.0
 3 were subjected to sequencing of the 16S ribosomal
 4 RNA gene as described by FOX et al. (2011).
 5 Antimicrobial susceptibility tests were performed
 6 using DDM in agar, according to the Clinical and
 7 Laboratory Standards Institute (CLSI) documents
 8 M100-S30 and VET08 (CLSI 2018; CLSI, 2020). The
 9 following antimicrobials were tested: ceftiofur (30 µg),
 10 penicillin (10 units), tetracycline (30 µg), trimethoprim/
 11 sulfamethoxazole (25 µg), chloramphenicol (30 µg),
 12 erythromycin (15 µg), clindamycin (2 µg), gentamicin
 13 (10 µg), and ciprofloxacin (5 µg) (DME, BRA).
 14 *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 was used as the
 15 control strain. Isolates were considered MDR when
 16 resistant to three or more classes of antimicrobial
 17 agents (SWEENEY et al., 2018).

18 *Clostridioides difficile*

19 Samples were incubated in 96% ethanol
 20 for 30 min (1:1), and aliquots of 10 µL were
 21 plated on cycloserine-ceftiofur fructose agar
 22 supplemented with 7% horse blood and 0.1%
 23 sodium taurocholate (Sigma, USA) (SILVA
 24 et al., 2013). After incubation in an anaerobic
 25 atmosphere at 37 °C for 72 h, characteristic *C.*
 26 *difficile* isolates (flat, irregular, and with a ground-
 27 glass appearance) were subjected to multiplex
 28 PCR to identify the housekeeping gene (*tpi*) and
 29 virulence genes of toxin A (*tcdA*), toxin B (*tcdB*),
 30 and binary toxin (*cdtB*) (SILVA et al., 2011).
 31 The minimal inhibitory concentrations (MICs)
 32 of metronidazole, vancomycin, clindamycin,
 33 moxifloxacin, ciprofloxacin, erythromycin,
 34 rifampicin, and tetracycline were determined using
 35 Etest strips (bioMérieux Marcy l’Etoile, France) in
 36 Brucella agar (Oxoid, USA) with 5% lysed blood
 37 supplemented with hemin (Difco Laboratories,
 38 USA) and vitamin K (Sigma-Aldrich Co., USA).
 39 MIC values were interpreted according to the
 40 clinical breakpoints of the CLSI and European
 41 Committee on Antimicrobial Susceptibility
 42 Testing guidelines (PIRŠ et al., 2013; CLSI, 2015;
 43 EUCAST, 2019).

44 *Statistical analysis*

45 The association between capture events,
 46 presence of the tested pathogens, and frequency of
 47 each isolated microorganism was evaluated using chi-
 48 square and Fisher’s exact tests. The chi-squared test
 49 for adherence was used to evaluate the distribution
 50 of variables. All statistical analyses were performed
 51 using GraphPad Prism v.8 (GraphPad Software,
 52 San Diego, CA, USA). Differences were considered
 53 statistically significant at $P < 0.05$.

RESULTS

Escherichia coli

E. coli was identified in 42 (89.3%)
 pigeons, with a total of 120 isolated strains (Table 1).
 All seven phylogenetic groups of *E. coli* were identified
 (Table 2) in the sampled pigeons, with B1 being the
 most common phylogroup (52/120 strains, 43.3%).
 A total of 41 strains (34%) from 19 (40.4%) pigeons
 tested positive for enteroaggregative *E. coli* heat-
 stable enterotoxin 1 (EAST1) encoding gene. The
 intimin-encoding gene (*eae*) of EPEC was detected
 in one isolate (2.1%), which was also positive for
 EAST1. No resistance to the tested antimicrobials
 was observed in the 41 *E. coli* isolates that tested
 positive for virulence factors.

Salmonella spp.

Salmonella spp. were found in nine
 (19.1%) pigeons, all from the first capture event
 (n=18; isolation rate of 50%), indicating a strong
 difference between the first and the other two events
 ($P < 0.001$). *S. Typhimurium* and *S. Heidelberg*
 were isolated from six (66.7%) and three pigeons,
 respectively. One bird died a few days after the capture
 event (Figure 2; isolate “PB13”). Macroscopically,
 the bird had hepatomegaly, and the serosa of the small
 intestine was diffusely hyperemic with hemorrhagic
 intestinal contents. *S. Typhimurium* was isolated again
 from the excreta and liver of this bird. ERIC-PCR of
 the *Salmonella* spp. isolates suggested that eight out of
 the nine strains had high genetic similarity (Figure 2).
 These strains showed no resistance to all antimicrobials
 tested, while the remaining strain (*S. Typhimurium*) was
 resistant to trimethoprim/sulfamethoxazole, amoxicillin/
 clavulanic acid, ampicillin, tetracycline, enrofloxacin,
 ciprofloxacin, and nalidixic acid. Thus, it was classified
 as an MDR strain (MAGIORAKOS et al., 2012).

Staphylococcus spp.

A total of 20 (42.5%) staphylococcal
 isolates were recovered from 18 (38.3%) pigeons
 of the 47 captured pigeons. Eight different species
 were detected, with *S. xylosus* (30%) being the most
 common (Table 1). Overall, 7 (35%) isolates were
 resistant to at least one antimicrobial agent, whereas
 13 (65%) were susceptible to all the tested compounds.
 Some isolates were resistant to tetracycline (35.5%),
 penicillin G (15%), erythromycin (5%), and
 clindamycin (5%). No significant differences were

Table 1 - Frequency of *Escherichia coli*, *Salmonella* spp., *Staphylococcus* spp., and *Clostridioides difficile* isolated from free-living pigeons (n=47) in three capture events in the Veterinary Hospital of Federal University of Minas Gerais (Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil).

Pathogen	-----Capture (%)-----			Total (n=47)
	First	Second	Third	
<i>E. coli</i>	18/18 (100)	10/13 (76.9)	14/16 (87.5)	42/47 (89.3)
EAST-1	8/18 (44.4)	6/13 (46.1)	5/16 (31.3)	19/47 (40.4)
EPEC (<i>eae</i>)	1/18 (5.5)	0/13 (0)	0/16 (0)	1/47 (2.1)
<i>Salmonella</i> spp.	9/18 (50) ^a	0/13 (0) ^b	0/16 (0) ^b	9/47 (12.8)
<i>S. Typhimurium</i>	6/18 (33.3)	0/13 (0)	0/16 (0)	6/47 (6.4)
<i>S. Heildeberg</i>	3/18 (18.7)	0/13 (0)	0/16 (0)	3/47 (6.4)
<i>Staphylococcus</i> spp.	7/18 (38.9)	6/13 (46.1)	7/16 (43.7)	20/47 (42.5)
<i>S. xylosum</i>	3/18 (16.7)	2/13 (15.4)	1/16 (6.3)	6/47 (12.8)
<i>S. sciuri</i>	2/18 (11.1)	1/13 (7.7)	2/16 (12.5)	5/47 (10.6)
<i>S. lentus</i>	0/18 (0)	0/13 (0)	3/16 (18.7)	3/47 (6.4)
<i>S. haemolyticus</i>	0/18 (0)	2/13 (15.4)	0/16 (0)	2/47 (4.2)
<i>S. aureus</i>	0/18 (0)	0/13 (0)	1/16 (6.3)	1/47 (2.1)
<i>S. intermedius</i>	1/18 (5.6)	0/13 (0)	0/16 (0)	1/47 (2.1)
<i>S. succinus</i>	0/18 (0)	1/13 (7.7)	0/16 (0)	1/47 (2.1)
<i>S. schleiferi</i>	1/18 (5.6)	0/13 (0)	0/16 (0)	1/47 (2.1)
<i>C. difficile</i> (Non-toxigenic)	2/18 (11.1)	0/13 (0)	0/16 (0)	2/47 (4.2)

Different lower-case letters indicate a significant difference ($P < 0.05$).

Legend: EPEC - Enteropathogenic *Escherichia coli*; EAST-1 - Enteropathogenic *Escherichia coli*.

1 reported in resistance to these antimicrobials. One
2 *S. aureus* isolate showed resistance to penicillin G,
3 erythromycin, and clindamycin; and therefore, was
4 classified as MDR. All isolates were susceptible
5 to cefoxitin, chloramphenicol, gentamicin,
6 ciprofloxacin, and trimethoprim-sulfamethoxazole
7 and were negative for *mecA*.

8
9 *Clostridioides difficile*
10 Two (4.3%) *C. difficile* isolates were recovered
11 from the pigeons. Both were nontoxigenic (A-B-CDT-).

1 One isolate was classified as MDR due to resistance to
2 erythromycin, rifampicin, and tetracycline, while both
3 isolates were susceptible to all other antimicrobials tested,
4 including metronidazole and vancomycin.

DISCUSSION

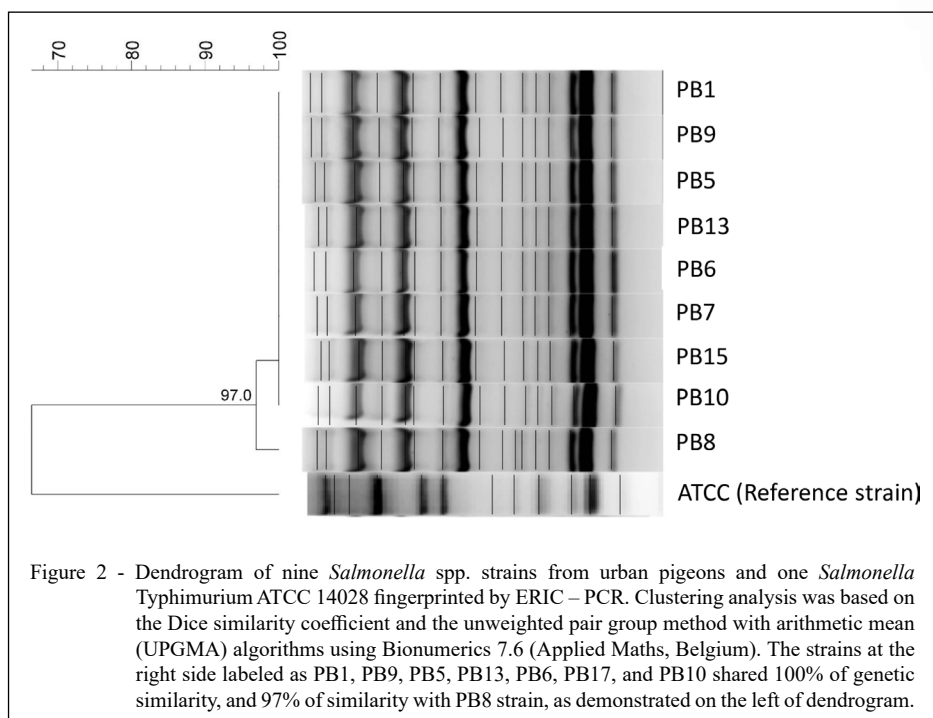
5
6
7
8 Despite the known importance of pigeons
9 as reservoirs of several pathogens, no studies have
10 evaluated them in a university environment and their
11 role in the epidemiology of nosocomial bacteria.

Table 2 - Phylogroups of *Escherichia coli* isolates (n=120) from pigeons (n=47) captured in the Veterinary Hospital of Federal University of Minas Gerais (Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil).

<i>E. coli</i>	-----Phylogenetic groups-----									Total
	A	B1	B2	C	D	E	F	Clade ²	Unassignable ¹	
Isolates (%)	11 (9.2)	52 (43.3)	12 (10) ^a	18 (15)	3 (2.5)	16 (13.3) ^a	1 (0.8)	4 (3.3)	3 (2.5)	120 (100)

¹Identified as *E. coli* but not corresponding to any of the phylogroups according to CLERMONT et al. (2013).

²Clade 1, 2, 3, 4, or 5.



1 This study revealed the presence of zoonotic MDR
2 pathogens in pigeons captured in the surroundings
3 of a veterinary hospital, suggesting that pigeons can
4 act as reservoirs and disseminators of diarrheagenic
5 *E. coli* and MDR *Staphylococcus* spp., *C. difficile*,
6 and *Salmonella* spp.

7 The high isolation rate of *E. coli* from
8 phylogroup B1 was similar to that reported in previous
9 studies on urban pigeons (GORDON & COWLING,
10 2003; SILVA et al., 2009; GHANBARPOUR
11 & DANESHDOOST, 2012). Interestingly, we
12 identified two virulence factors in the *E. coli* isolates.
13 *E. coli* isolates positive for the EAST-1 encoding gene
14 were detected in more than 40% of the birds, whereas
15 the *eae* encoding gene from EPEC was detected in a
16 single isolate. The high frequency of pigeons positive
17 for EAST-1 was surprising, since this virulence factor,
18 previously associated with outbreaks of diarrhea
19 in humans (ZHOU et al., 2002; SUKKUA et al.,
20 2017), has never been reported in *E. coli* isolates
21 from pigeons. Further, pigeons are known reservoirs
22 of EPEC (SILVA et al., 2009; GHANBARPOUR
23 & DANESHDOOST, 2012; SACRISTÁN et al.,
24 2014; BORGES et al., 2017; TORRES-MEJÍA
25 et al., 2018), a major cause of childhood diarrhea
26 worldwide (CROXEN et al., 2013; TORRES-
27 MEJÍA et al., 2018). Together, these results reinforce

the role of pigeons as potential reservoirs of zoonotic
E. coli pathotypes.

We tested all 42 *E. coli* isolates that
were positive for virulence factors for antimicrobial
resistance. Results revealed that all isolates were
susceptible to all antimicrobials tested, surprisingly
showing that despite living in a heavily anthropized
environment, the sampled pigeons had *E. coli* isolates
with no drug resistance. Our results are in contrast
with previous studies that described the occurrence
of MDR *E. coli* strains in pigeons in several countries
(GHANBARPOUR & DANESHDOOST, 2012;
BORGES et al., 2017; KARIM et al., 2020).

The fecal shedding of *Salmonella* spp.
in the sampled pigeons (19.1%) was higher than
that found in several previous studies, which often
reported frequencies of up to 10% (DOVC et al.,
2004; TANAKA et al., 2005; PEDERSEN et al.,
2006; GARGIULO et al., 2014; HAESSENDONCK
et al., 2016; CARVALHO et al., 2020; KACZOREK-
ŁUKOWSKA et al., 2020). Interestingly, the
isolation of *Salmonella* spp. was significantly
associated with the first capture event ($P < 000.1$)
conducted during the rainy season. This result raised
the hypothesis of an outbreak of salmonellosis in
the pigeons during this sampling period, which was
reinforced after the re-isolation of *Salmonella* from

1 the intestinal content and liver of a pigeon that died
2 a few days after the capture event. Furthermore, the
3 post-mortem alterations observed in this pigeon are
4 commonly reported in pigeons and other species with
5 salmonellosis (SAWA & HIRAI, 1981; OLIVEIRA
6 et al., 2019; RAMOS et al., 2021).

7 To better understand this possible
8 outbreak, one *Salmonella* isolate from each animal
9 was subjected to ERIC-PCR, a method with high
10 discriminatory power already in use for *Salmonella*
11 typing in outbreaks (PURIGHALLA et al., 2017;
12 RAMOS et al., 2019b). The high similarity among
13 the eight isolates, as suggested by ERIC-PCR,
14 strongly suggests the occurrence of an outbreak
15 of salmonellosis in these pigeons. Previous
16 studies have indicated that; although, pigeons are
17 commonly asymptomatic carriers of *Salmonella*
18 spp., salmonellosis may occur in urban pigeons,
19 which could significantly increase the isolation
20 rate of this agent in the affected pigeons (SAWA &
21 HIRAI, 1981; TIZARD, 2004; HOELZER et al.,
22 2011; DUTTA et al., 2013; ROCHA-E-SILVA et
23 al., 2014). Additionally, salmonellosis outbreaks in
24 animals seem to be more common during the rainy
25 season, which may be a risk factor for bacterial spread
26 (PANGLOLI et al., 2008; RAMOS et al., 2019b).

27 Notably, we detected two well-known
28 zoonotic *Salmonella* spp. serovars, *S. Typhimurium*
29 and *S. Heidelberg*, in our study. Previous studies
30 have demonstrated that *Salmonella enterica* isolates
31 from urban pigeons commonly belong to serotype
32 *Typhimurium* (DUTTA et al., 2013; OSMAN
33 et al., 2013; ROCHA-E-SILVA et al., 2014;
34 HAESSENDONCK et al., 2016; TORRES-MEJÍA et
35 al., 2018; CARVALHO et al., 2020; KACZOREK-
36 ŁUKOWSKA et al., 2020). It is also known that
37 *S. Typhimurium* and *S. Heidelberg* are important
38 foodborne pathogens (CDC, 2014), which can also
39 infect humans after direct contact with healthy or
40 diseased animals (HALE et al., 2012; RAMOS et al.,
41 2019b). Transmission of *Salmonella* spp. from pigeons
42 to humans has already been reported; however, studies
43 associating human salmonellosis with pigeon contact
44 are scarce (HAAG-WACKERNAGEL & MOCH,
45 2004; SPENNEMANN & WATSON, 2017). Despite
46 this, the common shedding of these zoonotic *Salmonella*
47 serotypes by urban pigeons and their close contact
48 with humans should be considered a potential risk to
49 human health, especially for those most susceptible,
50 such as children and immunocompromised individuals
51 (HALE et al., 2012).

52 Most *Salmonella* spp. isolates showed no
53 resistance to the antimicrobials tested. Interestingly,

1 all isolates were genetically similar according to
2 ERIC-PCR analysis, which also contributed to
3 the hypothesis of an outbreak. Conversely, one
4 *S. Typhimurium* strain was resistant to seven
5 antimicrobials and thus, was classified as MDR
6 (MAGIORAKOS et al., 2012). According to the
7 World Health Organization (WHO, 2019), there are
8 specific public health concerns related to the spread
9 of fluoroquinolone-resistant *Salmonella* spp. In
10 addition, β -lactams and sulfonamides are commonly
11 used antimicrobials for the treatment of *Salmonella*
12 spp. infections in animals and humans, and resistance
13 to both important drugs may severely reduce the
14 treatment options (KUANG et al., 2015).

15 More than one-third of the captured
16 pigeons were positive for staphylococci and eight
17 different species were recovered (Table 1). According
18 to other studies, pigeons seem to harbor a high
19 diversity of staphylococcal species, whereas other
20 animals, such as free-living reptiles and rodents,
21 seem to show a more homogeneous colonization
22 pattern (SCHWARZ & WERCKENTHIN, 1994;
23 ZIGO, 2017; SANTANA et al., 2021; SANTANA
24 et al., 2022). It may be that the close and daily
25 contact of the pigeons with humans and animals,
26 combined with the hospital environment, may have
27 influenced this large number of recovered species
28 (SCHWARZ & WERCKENTHIN, 1994; ZIGO,
29 2017; KAMATHEWATTA et al., 2019).

30 *S. xyloso*, the most frequent species
31 reported in our study, has been previously isolated from
32 pigeons and other birds, suggesting commensalism
33 (VELA et al., 2012; MAHMMOUD, 2013; ZIGO,
34 2017; MATIAS et al., 2018). This coagulase-negative
35 *Staphylococcus* (CoNS) has also been found in different
36 mammals and reptiles (BECKER et al., 2014; RISSI
37 et al., 2015; MATIAS et al., 2018; SANTANA et al.,
38 2021; SANTANA et al., 2022), and despite being
39 mostly labeled as non-pathogenic, it has caused several
40 opportunistic infections in animals and humans (WON
41 et al., 2002; KOKSAL et al., 2009; AKHADDAR et
42 al., 2010; RISSI et al., 2015).

43 Except for *S. succinus*, all other CoNS
44 isolates have been reported in previous studies on
45 pigeons (SCHWARZ & WERCKENTHIN, 1994;
46 ZIGO, 2017). Similar to *S. xyloso*, all these species
47 can integrate into the microbiota of skin and mucous
48 membranes of different hosts and act as opportunistic
49 pathogens causing distinct infections (RISSI et al.,
50 2015). Notably, *S. haemolyticus* is highly relevant
51 to human health and is the second most frequently
52 isolated CoNS from nosocomial infections (SIDHU
53 et al., 2007; CZEKAJ et al., 2015).

We also isolated *S. intermedius* and coagulase-positive *S. aureus* in this study. Both species have been frequently reported in pigeons (KIZERWETTER-ŚWIDA et al., 2015; CHROBAK-CHMIEL et al., 2021). However, *S. intermedius* is more commonly reported in wild pigeons, and its isolation from domestic pigeons is scarce (KIZERWETTER-ŚWIDA et al., 2015). In contrast, *S. aureus* is widespread among humans and different animal species, facilitating bilateral transmission between distinct hosts (WEESE & VAN DUIJKEREN, 2010). This microorganism is one of the world's most frequent causes of nosocomial infections in humans. It is also a relevant pathogen in dogs, and its treatment is often hampered by resistance to multiple antimicrobials (IPPOLITO et al., 2010; WALTHER et al., 2017; TURNER et al., 2019). Interestingly, *S. aureus* isolated in our study was an MDR strain, which reinforces the hypothesis that pigeons are potential disseminators of MDR staphylococci (KUTKOWSKA et al., 2019; CHROBAK-CHMIEL et al., 2021).

More than one-third of the staphylococci isolates showed resistance to at least one of the antimicrobials tested, mainly to tetracycline and penicillin, which are widely used in human and veterinary medicine (ARGUDÍN et al., 2017; CERBO et al., 2019). It is possible that this specific environment, where the pigeons can get directly and indirectly in contact with humans and healthy and sick animal species, may have influenced the diversity of staphylococci isolated in our study, as well as the frequency of isolates resistant to antimicrobials, as previously indicated in other studies on staphylococci in different animals and settings (FUTAGAWA-SAITO et al., 2007; HAABER et al., 2017; CERBO et al., 2019; KAMATHEWATTA et al., 2019; FROSINI et al., 2020; PALMA et al., 2020). FUTAGAWA-SAITO et al., (2007) compared the resistance profiles of staphylococci isolated from pigeons and suggested that isolates from pigeons that have direct contact with humans and other animals are more associated with resistance to several antimicrobials, which supports the idea that resistance may be acquired because of the mutual coexistence of different species.

Although, *C. difficile* is recognized as an emerging pathogen causing zoonotic diseases in humans (KNIGHT & RILEY, 2019) and has previously been reported to cause nosocomial infections in dogs (WEESE & ARMSTRONG, 2003), little is known about the role of pigeons in the epidemiology of this anaerobic microorganism.

Previous studies of other avian species have suggested that *C. difficile* is either absent or present at a very low frequency (BANDELJ et al., 2011; BURT et al., 2012; BANDELJ et al., 2014). In our study, two *C. difficile* strains were isolated (4.3%), which is lower than the previously reported rate (12.5%) by ANDRÉS-LASHERAS et al. (2017) in a study on pigeons and rodents trapped within pest control programs in pig farms. Notably, the colonization of *C. difficile* in pigeons and other birds seems to be directly linked to environmental contamination (ANDRÉS-LASHERAS et al., 2017), which may explain the difference in its isolation rates. Additionally, one isolate in our study was classified as MDR due to its resistance to erythromycin, rifampicin, and tetracycline. Our results are similar to those previously reported by ANDRÉS-LASHERAS et al. (2017) and reinforce the hypothesis that pigeons may play a role in the transmission of *C. difficile*, including antimicrobial-resistant strains.

Our research suggested that pigeons captured in the surroundings of a veterinary hospital can act as reservoirs and disseminators of pathogenic and nosocomial bacteria, including diarrheagenic *E. coli* and MDR *Staphylococcus* sp., *C. difficile*, and *Salmonella* spp. Together with previous studies, our findings reinforce the importance of pigeon population control owing to their potential role in the spread of zoonotic diseases.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank all students and professionals who contributed to pigeon capture and Professor Marcelo Pires Nogueira de Carvalho for clinical evaluation of the birds. This work was supported by funds received from Coordination for the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES – Prêmio CAPES 2015 - 0774/2017), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e (CNPq - 406402/2018-3), Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG - APQ-00524-17), and Pró-Reitoria de Pesquisa da Universidade Federal de Minas Gerais (PRPq/UFGM).

DECLARATION OF CONFLICT OF INTEREST

We have no conflict of interest to declare.

BIOETHICS AND BIOSECURITY COMMITTEE APPROVAL

This study was approved by the Ethical Committee on Animal Use (CEUA) of the Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG) under protocol 361/2018 and by the Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade (ICMBio) under protocol SISBIO 66535-2.

AUTHOR'S CONTRIBUTIONS

All authors contributed equally to the conception and writing of the manuscript. All authors critically revised and approved the final version of the manuscript.

REFERENCES

AKHADDAR, A. et al. *Staphylococcus xylosum* isolated from an otogenic brain abscess in an adolescent. **Surgical Infections**, v.11, p.559–561, 2010. Available from: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20969474/>>. Accessed: Jun. 16, 2022. doi: 10.1089/sur.2010.010.

ANDRÉS-LASHERAS, S. et al. Presence of *Clostridium difficile* in pig faecal samples and wild animal species associated with pig farms. **Journal of Applied Microbiology**, v.122, p.462–472, 2017. Available from: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27990723/>>. Accessed: Jun. 16, 2022. doi:10.1111/jam.13343.

ARGUDÍN, M. et al. Bacteria from Animals as a Pool of Antimicrobial Resistance Genes. **Antibiotics**, v.6, p.12, 2017. Available from: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28587316/>>. Accessed: Jun. 16, 2022. doi: 10.3390/antibiotics6020012.

BANDELJ, P.; et al. Prevalence and molecular characterization of *Clostridium difficile* isolated from European Barn Swallows (*Hirundo rustica*) during migration. **BMC Veterinary Research**, v.10, p.40, 2014. Available from: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24507706/>>. Accessed: Jun. 16, 2022. doi: 10.1186/1746-6148-10-40.

BANDELJ, P. et al. Zero prevalence of *Clostridium difficile* in wild passerine birds in Europe. **FEMS microbiology letters**, v.321, p.183–185, 2011. Available from: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21658108/>>. Accessed: Jun. 16, 2022. doi: 10.1111/j.1574-6968.2011.02333.x

BECKER, K. et al. Coagulase-negative staphylococci. **Clinical Microbiology Reviews**, v.27, p.870–926, 2014. Available from: <<https://journals.asm.org/doi/10.1128/CMR.00109-13>>. Accessed: Jun. 16, 2022. doi: 10.1128/CMR.00109-13.

BLANCO, M. et al. Polymerase chain reaction for detection of *Escherichia coli* strains producing cytotoxic necrotizing factor type 1 and type 2 (CNF1 and CNF2). **Journal of Microbiological Methods**, v.26, p.95–101, 1996. Available from: <[https://doi.org/10.1016/0167-7012\(96\)00900-1](https://doi.org/10.1016/0167-7012(96)00900-1)>. Accessed: Jun. 16, 2022. doi: 10.1016/0167-7012(96)00900-1.

BORGES, C.A. et al. Wild birds and urban pigeons as reservoirs for diarrheagenic *Escherichia coli* with zoonotic potential. **Journal of Microbiology**, v.55, p.344–348, 2017. Available from: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28281197/>>. Accessed: Jun. 16, 2022. doi: 10.1007/s12275-017-6523-3.

BURT, S.A. et al. Vermin on pig farms are vectors for *Clostridium difficile* PCR ribotypes 078 and 045. **Veterinary Microbiology**, v.160, p.256–258, 2012. Available from: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22682200/>>. Accessed: Jun. 16, 2022. doi: 10.1016/j.vetmic.2012.05.014.

CARVALHO, D. et al. Antimicrobial susceptibility and detection of virulence-associated genes of *Escherichia coli* and *Salmonella*

spp. isolated from domestic pigeons (*Columba livia*) in Brazil. **Folia Microbiologica**, v.65, p.735–745, 2020. Available from: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32180120/>>. Accessed: Jun. 16, 2022. doi: 10.1007/s12223-020-00781-w.

CERBO, A. et al. Tetracyclines: Insights and Updates of their Use in Human and Animal Pathology and their Potential Toxicity. **The Open Biochemistry Journal**, v.13, 2019. Available from: <<https://openbiochemistryjournal.com/VOLUME/13/PAGE/1/ABSTRACT/>>. Accessed: Jun. 16, 2022. doi: 10.2174/1874091X01913010001.

CDC. Foodborne Diseases Active Surveillance Network (FoodNet): FoodNet Surveillance Report for 2012 (Final Report). Atlanta, Georgia: U.S. Department of Health and Human Services, CDC. 2014.

CHROBAK-CHMIEL, D. et al. Pigeons as Carriers of Clinically Relevant Multidrug-Resistant Pathogens—A Clinical Case Report and Literature Review. **Frontiers in Veterinary Science**, v.8, 2021. Available from: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34109235/>>. Accessed: Jun. 16, 2022. doi: 10.3389/fvets.2021.664226.

CLERMONT, O. et al. The Clermont *Escherichia coli* phylo-typing method revisited: improvement of specificity and detection of new phylo-groups. **Environmental Microbiology Reports**, v.5, p.58–65, 2013. Available from: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23757131/>>. Accessed: Jun. 16, 2022. doi: 10.1111/1758-2229.12019.

CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE (CLSI). Wayne, PA, USA. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; **Twenty-Fifth Informational Supplement**, 2015.

CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE (CLSI). Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing. 27th ed. CLSI M100 (ISBN 1-56238-804-5; ISBN 1-56238-805-3). **Clinical and Laboratory Standards Institute**, 950 West Valley Road, Suite 2500, Wayne, Pennsylvania 19087 USA, 2017.

CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE (CLSI). Performance Standards for Antimicrobial Disk and Dilution Susceptibility Tests for Bacteria Isolated From Animals. 4th ed. CLSI supplement VET08 (ISBN 978-1-68440-010-2 [Print]; ISBN 978-1-68440-011-9 [Electronic]). **Clinical and Laboratory Standards Institute**, 950 West Valley Road, Suite 2500, Wayne, Pennsylvania 19087 USA, 2018.

CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE (CLSI). Wayne, PA, USA. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing. **30th ed. CLSI supplement M100, 19087**, 2020.

CROXEN, M. A. et al. Recent advances in understanding enteric pathogenic *Escherichia coli*. **Clinical Microbiology Reviews**, v.26, p.822–880, 2013. Available from: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24092857/>>. Accessed: Jun. 16, 2022. doi: 10.1128/CMR.00022-13.

CUNHA, M. P. V. et al. CTX-M-producing *Escherichia coli* Isolated from urban pigeons (*Columba livia domestica*) in Brazil. **The Journal of Infection in Developing Countries**, v.13, p.1052–1056, 2019. Available from: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32087078/>>. Accessed: Jun. 16, 2022. doi: 10.3855/jidc.11441.

- 1 CZEKAJ, T. et al. *Staphylococcus haemolyticus* - an emerging
2 threat in the twilight of the antibiotics age. **Microbiology**
3 **(Reading, England)**, v.161, p.2061–2068, 2015. Available from:
4 <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26363644/>>. Accessed: Jun. 16,
5 2022. doi: 10.1099/mic.0.000178.
6
- 7 DOVC, A. et al. Health status of free-living pigeons (*Columba livia*
8 *domestica*) in the city of Ljubljana. **Acta Veterinaria Hungarica**,
9 v.52, p.219–226, 2004. Available from: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15168753/>>. Accessed: Jun. 16, 2022. doi: 10.1556/
10 AVet.52.2004.2.10.
11
- 12 DUTTA, P. et al. Isolation of *Salmonella* Typhimurium from
13 pigeons (*Columba livia*) in Greater Guwahati, its histopathological
14 impact and antibiogram. **Comparative Clinical Pathology**, v.22,
15 p.147–150, 2013. Available from: <[https://link.springer.com/
16 article/10.1007/s00580-012-1614-3](https://link.springer.com/article/10.1007/s00580-012-1614-3)>. Accessed: Jun. 16, 2022.
17 doi: 10.1007/s00580-012-1614-3.
18
- 19 EUCAST - The European Committee on Antimicrobial
20 Susceptibility Testing (EUCAST). Breakpoint tables for
21 interpretation of MICs and zone diameters. In: **European Society**
22 **of Clinical Microbiology and Infectious Diseases Basel**, 2019.
23
- 24 FERMAN, L. M. et al. A study of feral pigeon *Columba livia* var.
25 in urban and suburban areas in the city of Jena, Germany. **Arxius**
26 **de Miscel-lànea Zoològica**, 8, 1–8, 2010. Available from: <[http://
27 www.bcn.cat/mciencies/publicacions/AMZ/vol8.1/AMZ-1001.
28 htm](http://www.bcn.cat/mciencies/publicacions/AMZ/vol8.1/AMZ-1001.htm)>. Accessed: Jun. 16, 2022.
29
- 30 FOX, J. G.; GE et al. *Helicobacter hepaticus* infection in mice:
31 models for understanding lower bowel inflammation and cancer.
32 **Mucosal Immunology**, v.4, p.22–30, 2011. Available from:
33 <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20944559/>>. Accessed: Jun. 16,
34 2022. doi: 10.1038/mi.2010.61.
35
- 36 FRANCK, S. M. et al. Multiplex PCR for Enterotoxigenic,
37 Attaching and Effacing, and Shiga Toxin-Producing *Escherichia*
38 *coli* Strains from Calves. **Journal of Clinical Microbiology**, v.36,
39 p.1795–1797, 1998. Available from: <[https://www.ncbi.nlm.nih.
40 gov/pmc/articles/PMC104926/](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC104926/)>. Accessed: Jun. 16, 2022. doi:
41 10.1128/jcm.36.6.1795-1797.1998.
42
- 43 FROSINI, S. M. et al. A. Genes on the Move: In Vitro
44 Transduction of Antimicrobial Resistance Genes between Human
45 and Canine Staphylococcal Pathogens. **Microorganisms**, v.
46 8, p.2031, 2020. Available from: <[https://pubmed.ncbi.nlm.
47 nih.gov/33353175/](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33353175/)>. Accessed: Jun. 16, 2022. doi: 10.3390/
48 microorganisms8122031.
49
- 50 FUTAGAWA-SAITO, K. et al. High occurrence of multi-
51 antimicrobial resistance in *Staphylococcus intermedius* isolates
52 from healthy and diseased dogs and domesticated pigeons.
53 **Research in Veterinary Science**, v.83, p.336–339, 2007. Available
54 from: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17368493/>>. Accessed:
55 Jun. 16, 2022. doi: 10.1016/j.rvsc.2007.01.013.
56
- 57 GARGIULO, A. et al. Occurrence of Enteropathogenic Bacteria
58 in Urban Pigeons (*Columba livia*) in Italy. **Vector-Borne and**
59 **Zoonotic Diseases**, v.14, p.251–255, 2014. Available from:
60 <<https://www.liebertpub.com/doi/10.1089/vbz.2011.0943>>.
61 Accessed: Jun. 16, 2022. doi: 10.1089/vbz.2011.0943.
62
- 63 GHANBARPOUR, R.; DANESHDOOST, S. Identification of
64 shiga toxin and intimin coding genes in *Escherichia coli* isolates
65 from pigeons (*Columba livia*) in relation to phylotypes and
66 antibiotic resistance patterns. **Tropical Animal Health and**
67 **Production**, v.44, p.307–312, 2012. Available from: <[https://
68 pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22105907/](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22105907/)>. Accessed: Jun. 16, 2022.
69 doi: 10.1007/s11250-011-0021-0.
70
- 71 GORDON, D. M.; COWLING, A. The distribution and genetic structure
72 of *Escherichia coli* in Australian vertebrates: host and geographic
73 effects. **Microbiology (Reading, England)**, v.149, p.3575–3586,
74 2003. Available from: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/14663089/>>.
75 Accessed: Jun. 16, 2022. doi: 10.1099/mic.0.26486-0.
76
- 77 GRIMONT, P.; WEILL, F. X. Antigenic Formulae of the *Salmonella*
78 serovars, (9th ed.) Paris: WHO Collaborating Centre for Reference
79 and Research on *Salmonella*. **Institute Pasteur.**, p.1–166, 2007.
80 Available from: <[https://www.pasteur.fr/sites/default/files/veng_0.
81 pdf](https://www.pasteur.fr/sites/default/files/veng_0.pdf)>. Accessed: Jun. 16, 2022.
82
- 83 HAABER, J. et al. Transfer of Antibiotic Resistance in
84 *Staphylococcus aureus*. **Trends in Microbiology**, v.25,
85 p.893–905, 2017. Available from: <[https://pubmed.ncbi.nlm.
86 nih.gov/28641931/](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28641931/)>. Accessed: Jun. 16, 2022. doi: 10.1016/j.
87 tim.2017.05.011.
88
- 89 HAAG-WACKERNAGEL, D.; MOCH, H. Health hazards posed
90 by feral pigeons. **The Journal of Infection**, v.48, p.307–313, 2004.
91 Available from: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15066331/>>.
92 Accessed: Jun. 16, 2022. doi: 10.1016/j.jinf.2003.11.001.
93
- 94 HAESSENDONCK, R. et al. Feral pigeons: A reservoir of zoonotic
95 *Salmonella* Enteritidis strains? **Veterinary Microbiology**, v.195,
96 p.101–103, 2016. Available from: <[https://pubmed.ncbi.nlm.
97 nih.gov/27771054/](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27771054/)>. Accessed: Jun. 16, 2022. doi: 10.1016/j.
98 vetmic.2016.09.017.
99
- 100 HALE, C. R. et al. Estimates of enteric illness attributable to contact
101 with animals and their environments in the United States. **Clinical**
102 **Infectious Diseases: An Official Publication of the Infectious**
103 **Diseases Society of America**, v.54 Suppl 5, p.S472–479, 2012.
104 Available from: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22572672/>>.
105 Accessed: Jun. 16, 2022. doi: 10.1093/cid/cis051.
106
- 107 HOELZER, K. et al. Animal contact as a source of human non-
108 typhoidal salmonellosis. **Veterinary Research**, v.42, p.34, 2011.
109 Available from: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21324103/>>.
110 Accessed: Jun. 16, 2022. doi: 10.1186/1297-9716-42-34.
111
- 112 INMET - Instituto Nacional de Meteorologia. Available from:
113 <[http://sisdagro.inmet.gov.br/sisdagro/app/monitoramento/bhs/
114 mapaperiodoacum](http://sisdagro.inmet.gov.br/sisdagro/app/monitoramento/bhs/mapaperiodoacum)>. Accessed: Jun. 16, 2022.
115
- 116 INMET - Instituto Nacional de Meteorologia. Available from:
117 <[http://sisdagro.inmet.gov.br/sisdagro/app/monitoramento/bhs/
118 mapaperiodoacum](http://sisdagro.inmet.gov.br/sisdagro/app/monitoramento/bhs/mapaperiodoacum)>. Accessed: Jun. 16, 2022.
119
- 120 IPPOLITO, G. LE et al. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*:
121 the superbug. **International journal of infectious diseases: IJID:**
122 **official publication of the International Society for Infectious**
123 **Diseases**, v.14 Suppl 4, p.S7–11, 2010. Available from: <[https://
124 pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20851011/](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20851011/)>. Accessed: Jun. 16, 2022.
125 doi: 10.1016/j.ijid.2010.05.003.
126
- 127 KACZOREK-LUKOWSKA, E. et al. Can domestic pigeon be a
128 potential carrier of zoonotic *Salmonella*? **Transboundary and**
129 **Emerging Diseases**, v.68, 2020. Available from: <[https://doi.
130 org/10.1111/tbed.13891](https://doi.org/10.1111/tbed.13891)>. Accessed: Jun. 16, 2022. doi: 10.1111/
131 tbed.13891.
132

- 1 KAMATHEWATTA, K. I. et al. Exploration of antibiotic resistance
2 risks in a veterinary teaching hospital with Oxford Nanopore long
3 read sequencing. **PLoS ONE**, v.14, p.e0217600, 2019. Available
4 from: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31145757/>>. Accessed:
5 Jun. 16, 2022. doi: 10.1371/journal.pone.0217600.
6
- 7 KARIM, S. J. I. et al, Multidrug-resistant *Escherichia coli* and
8 *Salmonella* spp. isolated from pigeons. **Veterinary World**, v.13,
9 p.2156–2165, 2020. Available from: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7704316/>>. Accessed: Jun. 16, 2022. doi:
10.14202/vetworld.2020.2156-2165.
11
- 12 KIZERWETTER-ŚWIDA, M. et al. Genetic characterization of
13 coagulase-positive staphylococci isolated from healthy pigeons.
14 **Polish Journal of Veterinary Sciences**, v.18, p.627–634, 2015.
15 Available from: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26618597/>>.
16 Accessed: Jun. 16, 2022. doi: 10.1515/pjvs-2015-0081.
17
- 18 KNIGHT, D. R.; RILEY, T. V. Genomic delineation of zoonotic
19 origins of *Clostridium difficile*. **Frontiers in Public Health**,
20 v.7, p.164, 2019. Available from: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31281807/>>. Accessed: Jun. 16, 2022. doi: 10.3389/
21 fpubh.2019.00164.
22
- 23 KOKSAL, F. et al. Antibiotic resistance patterns of coagulase-
24 negative staphylococcus strains isolated from blood cultures of
25 septicemic patients in Turkey. **Microbiological Research**, v.164,
26 p.404–410, 2009. Available from: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17475456/>>. Accessed: Jun. 16, 2022. doi: 10.1016/j.
27 micres.2007.03.004.
28
- 29 KUANG, X. et al. Serotypes and antimicrobial susceptibility of
30 *Salmonella* spp. isolated from farm animals in China. **Frontiers**
31 **in Microbiology**, v.6, p.602, 2015. Available from: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4476277/>>. Accessed: Jun. 16,
32 2022. doi: 10.3389/fmicb.2015.00602.
33
- 34 KUTKOWSKA, J. et al. Methicillin-resistant *Staphylococcus*
35 *aureus* and glycopeptide-resistant enterococci in fecal samples of
36 birds from South-Eastern Poland. **BMC Veterinary Research**,
37 v.15, p.472, 2019. Available from: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31888629/>>. Accessed: Jun. 16, 2022. doi: 10.1186/s12917-
38 019-2221-1.
39
- 40 LE MINOR, L.; POPOFF, M. Y. Y. 1987. Designation of *Salmonella*
41 *enterica* sp. nov., nom. rev., as the Type and Only Species of the
42 Genus *Salmonella*: Request for an Opinion. **International Journal of**
43 **Systematic and Evolutionary Microbiology**, v.37, p.465–468, [s.d.].
44
- 45 MAGIORAKOS, A. P. et al. Multidrug-resistant, extensively drug-
46 resistant and pandrug-resistant bacteria: an international expert
47 proposal for interim standard definitions for acquired resistance.
48 **Clinical Microbiology and Infection**, v.18, p.268–281, 2012.
49 Available from: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21793988/>>. Accessed: Jun. 16, 2022. doi: 10.1111/j.1469-0691.2011.03570.x.
50
- 51 MATIAS, C. A. R. et al. *Staphylococcus* spp. isolated from wild
52 birds apprehended in the local illegal trade in Rio de Janeiro, Brazil,
53 and relevance in public health. **Letters in Applied Microbiology**,
54 v.67, p.292–298, 2018. Available from: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29924392/>>. Accessed: Jun. 16, 2022. doi: 10.1111/
55 lam.13035.
56
- 57 MCDANIELS, A. E. et al. Confirmational identification of
58 *Escherichia coli*, a comparison of genotypic and phenotypic assays
59 for glutamate decarboxylase and beta-D-glucuronidase. **Applied**
60 **and Environmental Microbiology**, v.62, p.3350–3354, 1996.
61 Available from: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/8795225/>>.
62 Accessed: Jun. 16, 2022. doi: 10.1128/aem.62.9.3350-3354.1996.
63
- 64 MURAKAMI, K. et al. Identification of methicillin-resistant
65 strains of staphylococci by polymerase chain reaction. **Journal of**
66 **Clinical Microbiology**, v.29, p.2240–2244, 1991. Available from:
67 <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/1939577/>>. Accessed: Jun. 16,
68 2022. doi: 10.1128/JCM.29.10.2240-2244.1991.
69
- 70 MAHMMOUD, E. N. Isolation and Identification of Bacteria
71 from Genital Organs of Pigeons. **Rafidain Journal of Science**,
72 v.24, p.1–15, 2013. Available from: <https://rsci.mosuljournals.com/article_78799.html>. Accessed: Jun. 16, 2022. doi: 10.3389/
73 rjs.2013.78799.
74
- 75 OLIVEIRA, J. G. et al. *Salmonella* Typhimurium - associated
76 meningoencephalomyelitis in a foal. **Ciência Rural**, v.49, 2019.
77 Available from: <<https://doi.org/10.1590/0103-8478cr20190008>>.
78 Accessed: Jun. 16, 2022. doi: 10.1590/0103-8478cr20190008.
79
- 80 OSMAN, K. M. et al. *Salmonella enterica* isolated from pigeon
81 (*Columba livia*) in Egypt. **Foodborne Pathogens and Disease**,
82 v.10, p.481–483, 2013. Available from: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23531124/>>. Accessed: Jun. 16, 2022. doi: 10.1089/
83 fpd.2012.1347.
84
- 85 PALMA, E.; TILOCCA, B.; RONCADA, P. Antimicrobial
86 Resistance in Veterinary Medicine: An Overview. **International**
87 **Journal of Molecular Sciences**, v.21, p.1914, 2020. Available from:
88 <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7139321/>>.
89 Accessed: Jun. 16, 2022. doi: 10.3390/ijms21061914.
90
- 91 PANGLOLI, P. et al. Seasonal incidence and molecular
92 characterization of *Salmonella* from dairy cows, calves, and
93 farm environment. **Foodborne Pathogens and Disease**, v.5,
94 p.87–96, 2008. Available from: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18260819/>>. Accessed: Jun. 16, 2022. doi: 10.1089/
95 fpd.2008.0048.
96
- 97 PEDERSEN, K. et al. Prevalence of shiga toxin-producing
98 *Escherichia coli* and *Salmonella enterica* in rock pigeons captured in
99 Fort Collins, Colorado. **Journal of Wildlife Diseases**, v.42, p.46–55,
100 2006. Available from: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16699148/>>.
101 Accessed: Jun. 16, 2022. doi: 10.7589/0090-3558-42.1.46.
102
- 103 PIRŠ, T. et al. Antimicrobial susceptibility of animal and human
104 isolates of *Clostridium difficile* by broth microdilution. **Journal of**
105 **Medical Microbiology**, v.62, p.1478–1485, 2013. Available from:
106 <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23861298/>>. Accessed: Jun. 16,
107 2022. doi: 10.1099/jmm.0.058875-0.
108
- 109 PITCHER, D. G. et al. Rapid extraction of bacterial genomic DNA
110 with guanidium thiocyanate. **Letters in Applied Microbiology**,
111 v.8, p.151–156, 1989. Available from: <<https://doi.org/10.1111/j.1472-765X.1989.tb00262.x>>. Accessed: Jun. 16, 2022. doi:
112 10.1111/j.1472-765X.1989.tb00262.x.
113
- 114 PURIGHALLA, S. et al. Investigation into a community outbreak
115 of *Salmonella* Typhi in Bengaluru, India. **The Indian Journal**
116 **of Medical Research**, v.146, p.S15–S22, 2017. Available from:
117 <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29205191/>>. Accessed: Jun. 16,
118 2022. doi: 10.4103/ijmr.IJMR_1201_16.
119
- 120 RAMOS, C. P. et al. Enteric Organisms Detected in Feces of Dogs
121 with Bloody Diarrhea: 45 Cases. **Topics in Companion Animal**
122

- 1 **Medicine**, v.45, p.100549, 2021. Available from: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34044173/>>. Accessed: Jun. 16, 2022. doi: 10.1016/j.jtcam.2021.100549.
- 2
3
4
- 5 RAMOS, C. P. et al. Identification and Characterization of
6 *Escherichia coli*, *Salmonella* Spp., *Clostridium perfringens*, and
7 *C. difficile* Isolates from Reptiles in Brazil. **BioMed Research**
8 **International**, v.2019, p.1–9, 2019a. Available from: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31263711/>>. Accessed: Jun. 16, 2022.
9 doi: 10.1155/2019/9530732.
- 10
11
- 12 RAMOS, C. P. et al. Outbreak of multidrug-resistant Salmonella
13 Typhimurium in calves at a veterinary hospital in Brazil. **Ciência**
14 **Rural**, v.49, 2019b. Available from: <<https://doi.org/10.1590/0103-8478cr20180788>>. Accessed: Jun. 16, 2022. doi: 10.1590/0103-8478cr20180788.
- 15
16
- 17 RISSI, D. R.; ELSMO, E. J.; SANCHEZ, S. **Cystitis and**
18 **peritonitis caused by *Staphylococcus xylosus* infection in a calf**.
19 v.8, p.99–101, 2015. Available from: <<https://pesquisa.bvsalud.org/portal/resource/pt/vti-22003>>. Accessed: Jun. 16, 2022.
- 20
21
22
- 23 ROCHA-E-SILVA, R. C. et al. O pombo (*Columba livia*) como
24 agente carreador de *Salmonella* spp. e as implicações em saúde
25 pública. **Arquivos do Instituto Biológico**, v.81, p.189–194, 2014.
26 Available from: <<https://doi.org/10.1590/1808-1657000702012>>. Accessed: Jun. 16, 2022. doi: 10.1590/1808-1657000702012.
- 27
28
- 29 ROSARIO MEDINA, I. et al. Pigeons and their droppings
30 as reservoirs of *Candida* and other zoonotic yeasts. **Revista**
31 **Iberoamericana de Micologia**, v.34, p.211–214, 2017.
32 Available from: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1130140617300529>>. Accessed: Jun. 16, 2022. doi: 10.1016/j.riam.2017.03.001.
- 33
34
35
- 36 SACRISTÁN, C. et al. Virulence genes, antibiotic resistance and
37 integrons in *Escherichia coli* strains isolated from synanthropic
38 birds from Spain. **Avian Pathology: Journal of the W.V.P.A.**,
39 v.43, p.172–175, 2014. Available from: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24689431/>>. Accessed: Jun. 16, 2022. doi:10.1080/03079457.2014.897683.
- 40
41
42
- 43 SANTANA, J. A. et al. *Clostridioides difficile* and multi-drug-
44 resistant staphylococci in free-living rodents and marsupials
45 in parks of Belo Horizonte, Brazil. **Brazilian Journal of**
46 **Microbiology**, 2021. Available from: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34761356/>>. Accessed: Jun. 16, 2022. doi: 10.1007/s42770-021-00640-x.
- 47
48
49
- 50 SANTANA, J. A. et al. Isolation and antimicrobial resistance of
51 coagulase-negative staphylococci recovered from healthy tortoises
52 in Minas Gerais, Brazil. **Ciência Rural**, v.52, p.e20210354, 2022.
53 Available from: <<https://doi.org/10.1590/0103-8478cr20210354>>. Accessed: Jun. 16, 2022. doi: 10.1590/0103-8478cr20210354.
- 54
55
- 56 SASAKI, T. et al. Multiplex-PCR method for species identification
57 of coagulase-positive staphylococci. **Journal of Clinical**
58 **Microbiology**, v.48, p.765–769, 2010. Available from: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2832457/>>. Accessed:
59 Jun. 16, 2022. doi: 10.1128/JCM.01232-09.
- 60
61
- 62 SAWA, H.; HIRAI, K. An outbreak of *Salmonella* Typhimurium
63 subserovar copenhagen infection in pigeons (*Chalcophaps*
64 *indica*) imported from Hong Kong. **Nihon Juigaku Zasshi. The**
65 **Japanese Journal of Veterinary Science**, v.43, p.277–279,
66 1981. Available from: <<https://agris.fao.org/agris-search/search.do?recordID=JP19820771480>>. Accessed: Jun. 16, 2022. doi: 10.1292/jvms.1939.43.277.
- 67
68
69
- 70 SCHWARZ, S.; WERCKENTHIN, C. Antibiotic Resistance
71 in Staphylococci Isolated from Pigeons. **Veterinary**
72 **Dermatology**, v.5, p.9–12, 1994. Available from: <<https://doi.org/10.1111/j.1365-3164.1994.tb00003.x>>. Accessed: Jun. 16,
73 2022. doi: 10.1111/j.1365-3164.1994.tb00003.x.
- 74
75
- 76 SIDHU, M. S. et al. Persistence of multidrug-resistant
77 Staphylococcus haemolyticus in an animal veterinary teaching
78 hospital clinic. **Microbial Drug Resistance (Larchmont, N.Y.)**,
79 v.13, p.271–280, 2007. Available from: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18184053/>>. Accessed: Jun. 16, 2022. doi: 10.1089/mdr.2007.756.
- 80
81
- 82 SILVA, R. O. S. et al. Detection of A/B toxin and isolation of
83 *Clostridium difficile* and *Clostridium perfringens* from foals.
84 **Equine Veterinary Journal**, v.45, p.671–675, 2013. Available
85 from: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23452044/>>. Accessed:
86 Jun. 16, 2022. doi: 10.1111/evj.12046.
- 87
88
- 89 SILVA, R. O. S. et al. Detection of enterotoxin A and cytotoxin B,
90 and isolation of *Clostridium difficile* in piglets in Minas Gerais,
91 Brazil. **Ciência Rural**, v.41, p.1430–1435, 2011. Available from:
92 <<https://doi.org/10.1590/S0103-84782011005000100>>. Accessed:
93 Jun. 16, 2022. doi: 10.1590/S0103-84782011005000100.
- 94
95
- 96 SILVA, V. L. et al. Diarrheagenic *Escherichia coli* strains
97 recovered from urban pigeons (*Columba livia*) in Brazil and their
98 antimicrobial susceptibility patterns. **Current Microbiology**, v.59,
99 p.302–308, 2009. Available from: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19504156/>>. Accessed: Jun. 16, 2022. doi: 10.1007/s00284-009-9434-7.
- 100
101
- 102 SPENNEMANN, D. H.; WATSON, M. J. Dietary habits of urban
103 pigeons (*Columba livia*) and implications of excreta pH – A review.
104 **European Journal of Ecology**, v.3, p.27–41, 2017. Available
105 from: <<https://journals.ku.edu/EuroJecol/article/view/11598>>. Accessed: Jun. 16, 2022. doi: 10.1515/eje-2017-0004.
- 106
107
- 108 SUKKUA, K.; MANOTHONG, S.; SUKHUMUNGOON, P. Seroprevalence and molecular epidemiology of EAST1 gene-carrying *Escherichia coli* from diarrheal patients and raw meats. **Journal of Infection in Developing Countries**, v.11, p.220–227, 2017. Available from: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28368855/>>. Accessed: Jun. 16, 2022. doi: 10.3855/jidc.6865.
- 109
110
- 111 SWEENEY, M. T. et al. Applying definitions for multidrug
112 resistance, extensive drug resistance and pandrug resistance to
113 clinically significant livestock and companion animal bacterial
114 pathogens. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v.73,
115 p.1460–1463, 2018. Available from: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29481657/>>. Accessed: Jun. 16, 2022. doi: 10.1093/jac/dky043.
- 116
117
- 118 TANAKA, C. et al. Bacteriological survey of feces from feral
119 pigeons in Japan. **The Journal of Veterinary Medical Science**,
120 v.67, p.951–953, 2005. Available from: <https://www.jstage.jst.go.jp/article/jvms/67/9/67_9_951/article>. Accessed: Jun. 16,
121 2022. doi: 10.1292/jvms.67.951.
- 122
123
- 124 TIZARD, I. Salmonellosis in wild birds. **Seminars in Avian and Exotic Pet Medicine**, Emerging Diseases. v.13, p.50–66, 2004. Available from: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S1055937X04000039>>. Accessed: Jun. 16, 2022. doi: 10.1053/j.saep.2004.01.008.

- 1 TORRES-MEJÍA, A. M. et al. Zoonotic Agents in Feral Pigeons
2 (*Columba livia*) from Costa Rica: Possible Improvements to
3 Diminish Contagion Risks. **Vector-Borne and Zoonotic Diseases**,
4 v.18, p.49–54, 2018. Available from: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29243991/>>. Accessed: Jun. 16, 2022. doi: 10.1089/
5 vbz.2017.2131.
6
7
- 8 TURNER, N. A. et al. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*:
9 an overview of basic and clinical research. **Nature Reviews**.
10 **Microbiology**, v.17, p.203–218, 2019. Available from: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30737488/>>. Accessed: Jun. 16, 2022.
11 doi: 10.1038/s41579-018-0147-4.
12
13
- 14 VELA, J. et al. Characterization of *Staphylococcus xylosum*
15 isolated from broiler chicken barn bioaerosol. **Poultry Science**,
16 v.91, p.3003–3012, 2012. Available from: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23155006/>>. Accessed: Jun. 16, 2022. doi: 10.3382/
17 ps.2012-02302.
18
19
- 20 VERSALOVIC, J.; KOEUTH, T.; LUPSKI, J.R. Distribution
21 of repetitive DNA sequences in eubacteria and application to
22 fingerprinting of bacterial genomes. **Nucleic Acids Research**,
23 v.19, p.6823–6831, 1991. Available from: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC329316/>>. Accessed: Jun. 16, 2022. doi:
24 10.1093/nar/19.24.6823.
25
26
- 27 WALTHER B, TEDIN K, LÜBKE-BECKER A. Multidrug-
28 resistant opportunistic pathogens challenging veterinary infection
29 control. **Vet Microbiol.** 2017 Feb; 200:71-78. Available from:
30 <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27291944/>>. Accessed: Jun. 16,
31 2022. doi: 10.1016/j.vetmic.2016.05.017.
32
- 33 WEESE, J. S.; DUIJKEREN, E. VAN. Methicillin-resistant
34 *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus pseudintermedius*
35 in veterinary medicine. **Veterinary Microbiology**, v.140,
36 p.418–429, 2010. Available from: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19246166/>>. Accessed: Jun. 16, 2022. doi: 10.1016/j.
37 vetmic.2009.01.039.
38
- WEESE JS, ARMSTRONG J. Outbreak of *Clostridium difficile*-
associated disease in a small animal veterinary teaching hospital.
J Vet Intern Med. 2003 Nov-Dec; 17(6):813-6. Available from:
<<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/14658717/>>. Accessed: Jun. 16,
2022. doi: 10.1111/j.1939-1676.2003.tb02519.x.
- WON, Y. S. et al. Identification of *Staphylococcus xylosum*
isolated from C57BL/6J-Nos2(tm1Lau) mice with dermatitis.
Microbiology and Immunology, v.46, p.629–632, 2002. Available
from: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12437030/>>. Accessed:
Jun. 16, 2022. doi: 10.1111/j.1348-0421.2002.tb02744.x.
- WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). Critically
important antimicrobials for human medicine, 2019. Available
from: <<https://www.who.int/publications/i/item/9789241515528>>.
Accessed: Jun. 16, 2022.
- YAMAMOTO, T.; NAKAZAWA, M. Detection and sequences
of the enteroaggregative *Escherichia coli* heat-stable enterotoxin
1 gene in enterotoxigenic *E. coli* strains isolated from piglets
and calves with diarrhea. **Journal of Clinical Microbiology**,
v.35, p.223–227, 1997. Available from: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/8968912/>>. Accessed: Jun. 16, 2022. doi: 10.1128/
jcm.35.1.223-227.1997.
- ZHOU, Z. et al. An outbreak of gastroenteritis in Osaka, Japan due
to *Escherichia coli* serogroup O166:H15 that had a coding gene
for enteroaggregative *E. coli* heat-stable enterotoxin 1 (EAST1).
Epidemiology and Infection, v.128, p.363–371, 2002. Available
from: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12113479/>>. Accessed:
Jun. 16, 2022. doi: 10.1017/s0950268802006994.
- ZIGO, F. Changes in Bacterial Microflora in Young Carrier Pigeons
during the Race Season. **International International Journal of
Avian & Wildlife Biology**, v.2, 2017. Available from: <<https://medcraveonline.com/IJAWB/changes-in-bacterial-microflora-in-young-carrier-pigeons-during-the-race-season.html>>. Accessed:
Jun. 16, 2022. doi: 10.15406/ijawb.2017.02.00013.

3. Bacterias resistentes a antimicrobianos em hospitais veterinários: um desafio crescente

pixabay.com

Jordana Almeida Santana - CRMV MG 12487
Isabela Pádua Zanon - UFMG
Thayanne Gabryelle Viana de Souza - CRMV-BA 7187
Rodrigo Otávio Silveira Silva - CRMV MG 10763

Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Avenida Presidente Antônio Carlos, 6627, Belo Horizonte - MG, 31270-901

Introdução

Na medicina humana, o profundo impacto de infecções hospitalares sobre a morbidade e a mortalidade de pacientes hospitalizados destacou a necessidade de implementação de medidas de controle e prevenção cada vez melhores. Inicialmente, essas mudanças foram reativas, após a doença e a morte de grande número de indivíduos. Hoje, o controle

e a prevenção de infecções é um campo desenvolvido e reconhecido na medicina humana, com funcionários especificamente treinados e certificados e com grandes programas de vigilância fornecendo a avaliação aprofundada da epidemiologia de infecções hospitalares.

Em contraste, o controle e a prevenção de infecções em medicina veterinária encontram-se ainda em um estágio inicial, com poucos funcionários dedi-

cados, oportunidades de treinamento raros e sem sistemas de vigilância, sobretudo, por questões de financiamento limitado. Assim como aconteceu na medicina humana, os esforços para controle e prevenção de infecções em hospitais veterinários ainda são reativos, em resposta a situações desequilibradas, como surtos.

Conforme a medicina veterinária avança, pacientes são submetidos a procedimentos cada vez mais invasivos e terapias imunossupressoras que aumentam sua susceptibilidade a infecções hospitalares. Diante dessa situação, o controle e a prevenção de infecções também precisam avançar.

Por um tempo, com a descoberta dos antimicrobianos, acreditou-se que as doenças infecciosas se extinguiriam, o que reduziu consideravelmente o foco nas medidas de prevenção. Entretanto, atualmente, com a eficácia do arsenal antimicrobiano diminuindo, a prevenção de infecções voltou ao topo das soluções.

Assim, existe uma necessidade real de aderência às melhores práticas de controle e prevenção de infecções em

existe uma necessidade real de aderência às melhores práticas de controle e prevenção de infecções em hospitais veterinários. Programas bem definidos reduzirão significativamente a ocorrência de infecções nosocomiais, resultando em melhores condições de saúde e bem-estar dos pacientes, dos funcionários, dos proprietários e, indiretamente, da comunidade.

hospitais veterinários. Programas bem definidos reduzirão significativamente a ocorrência de infecções nosocomiais, resultando em melhores condições de saúde e bem-estar dos pacientes, dos funcionários, dos proprietários e, indiretamente, da comunidade.

Infecções nosocomiais em hospitais veterinários

Por definição, infecções nosocomiais ou IRAS (infecções relacionadas à assistência à

saúde) são infecções adquiridas em unidades de assistência à saúde, associadas à internação e/ou a procedimentos hospitalares, que não estavam presentes ou em incubação no momento da admissão do paciente. Atualmente, seja na saúde humana ou na animal, têm sido motivo de preocupação global, considerando o alto potencial de disseminação e as reduzidas opções terapêuticas de perfis multirresistentes dos diferentes patógenos envolvidos, que, frequentemente, estão presentes nesses ambientes.

Em medicina veterinária, as IRAS mais frequentemente relatadas abrangem infecções de sítios cirúrgicos, corrente sanguínea, trato urinário, trato

gastrintestinal e trato respiratório. A infecção de sítios cirúrgicos tem sido descrita como uma das principais complicações pós-operatórias em medicina veterinária. Segundo Nelson (2011), 0,8% a 18,1% das cirurgias realizadas em pequenos animais terminam em infecções bacterianas dos sítios envolvidos. A principal fonte de contaminação pode ser a própria microbiota endógena dos pacientes, uma vez que a preparação asséptica pode não eliminar suficientemente as bactérias associadas à pele. Porém, microrganismos exógenos provindos do equipamento cirúrgico, do ambiente físico e dos funcionários (mãos, mucosas e roupas) também são grandes responsáveis por esse tipo de infecção. As bactérias que têm sido isoladas com maior frequência de sítios cirúrgicos são: estafilococos resistentes à meticilina (MRS), enterobactérias produtoras de betalactamases de espectro estendido (ESBL), *Enterococcus* spp., *Acinetobacter* spp., *Staphylococcus pseudintermedius* e *Pseudomonas* spp. resistentes a múltiplas drogas. Mais recentemente, tem-se discutido o potencial disseminação do fungo *Sporothrix* sp.,

As bactérias que têm sido isoladas com maior frequência de sítios cirúrgicos são: estafilococos resistentes à meticilina (MRS), enterobactérias produtoras de betalactamases de espectro estendido (ESBL), *Enterococcus* spp., *Acinetobacter* spp., *Staphylococcus pseudintermedius* e *Pseudomonas* spp. resistentes a múltiplas drogas.

causador da esporotricose, em ambiente hospitalar. Independentemente do patógeno, os fatores de risco geralmente associados às infecções de sítios cirúrgicos incluem condições de saúde do paciente, classificação da ferida (tipo e grau de contaminação), tricotomia até 4 horas antes da cirurgia, ausência de antibioticoterapia profilática apropriada, duração da anestesia e cirurgia, número de pessoas na sala de cirurgia, uso de implantes e drenos, duração da hospitalização e não conformidade da equipe veterinária com os protocolos de controle e prevenção de infecções.

Infecções da corrente sanguínea adquiridas em hospitais normalmente estão relacionadas a dispositivos intravasculares. A cateterização, assim como

sua duração, está amplamente associada a esse tipo de infecção, que frequentemente ocorre devido à contaminação dos dispositivos com patógenos comensais e ambientais. Alguns fatores de risco já foram associados à contaminação de cateteres, como preparação inadequada da pele do paciente, uso de material contaminado, longa duração na colocação do dispositivo, imunossupressão

do paciente e infusão de dextrose. *Staphylococcus* spp., *Pseudomonas* spp. e algumas enterobactérias (*Escherichia coli*, *Enterobacter* spp., *Proteus* spp. e *Klebsiella* spp.) têm sido os microrganismos mais encontrados nesse tipo de infecção.

Infecções do trato urinário geralmente estão associadas ao uso de cateteres e são IRAS muito comuns em pequenos animais. A introdução do dispositivo pode interferir nos mecanismos de defesa normais da mucosa, favorecendo a colonização bacteriana do cateter e a ascensão de microrganismos patogênicos até a bexiga urinária do paciente. Fêmeas e animais senis parecem compor o grupo de maior risco. Os agentes infectantes, mais uma vez, podem ser de origem endógena ou exógena, sendo *E. coli*, *Proteus* spp., *Staphylococcus* spp. e *Streptococcus* spp. mais frequentemente encontrados nesse sítio. Atenção deve ser dada à formação de biofilme na superfície dos cateteres, pois essa pode estar associada à resistência aos antimicrobianos e, conseqüentemente, a falhas terapêuticas.

Diarreias infecciosas adquiridas em hospitais veterinários normalmente são notadas quando há aumento considerável na incidência de casos no local. Devido à ampla gama de possíveis patógenos envolvidos, determinar a causa da diarreia é um desafio. Em clínicas e hospitais de pequenos animais, o principal patógeno associado à diarreia infec-

çiosa tem sido *Salmonella* spp.. Fatores de risco frequentemente relatados para colonização/infecção de cães e gatos por *Salmonella* spp. abrangem contato com algumas espécies animais (répteis, anfíbios, aves jovens e animais de produção), consumo de alimentos crus de origem animal (carne, couro e ovos) e uso de probióticos. Além da colonização/infecção, esses animais tornam-se elementos-chave na propagação do microrganismo, pois eliminam constantemente o patógeno em suas fezes. Em contraste com hospitais humanos, a diarreia nosocomial parece não ser tão frequentemente relatada em hospitais veterinários, talvez pela ausência de notificação ou, até mesmo, pela não confirmação por diagnóstico laboratorial do patógeno causador.

Pneumonias são IRAS mais observadas na saúde humana, principalmente devido ao uso de ventiladores mecânicos e tubos nasogástricos e endotraqueais, os quais não são empregados com a mesma frequência na medicina veterinária. Entretanto, pneumonia aspirativa é um evento não tão raro em pequenos animais, e pode ocorrer por distúrbios laríngeos e esofágicos, bem como em animais saudáveis submetidos à anestesia ou sedação. A hospitalização prolongada dos animais aumenta o risco de colonização bacteriana da orofaringe com microrganismos do ambiente ou mesmo das mãos dos funcionários e, comumente,

os agentes infecciosos causadores da pneumonia são multirresistentes *E. coli* e *Acinetobacter* spp. foram os patógenos mais frequentes em um estudo de casos de pneumonia hospitalar em gatos.

Como é possível observar, a maioria dos microrganismos frequentemente envolvidos em IRAS geralmente são oportunistas, resistentes a diferentes classes de antimicrobianos e persistentemente estáveis no ambiente. Uma ampla gama de patógenos pode estar envolvida em IRAS, incluindo diferentes vírus, fungos e bactérias. Porém, atualmente, o principal foco tem sido a emergência de bactérias resistentes a múltiplas drogas (MDR), devido ao aumento global de ocorrências, às opções limitadas e, muitas vezes, ausentes de tratamento, assim como as consequências de saúde pública, visto que grande parte dessas bactérias apresentam potencial zoonótico.

No Quadro 1 descrevem-se as principais bactérias MDR envolvidas em infecções nosocomiais em hospitais veterinários. Além disso, também são descritos os fatores de risco inerentes ao paciente para colonização/infecção por cada um desses patógenos.

De maneira geral, todos os animais admitidos diariamente em clínicas e hospitais veterinários, doentes ou saudáveis, são potenciais carreadores e transmissores de patógenos causadores de infecções nosocomiais. Desde o primeiro contato, é muito importante avaliar os fatores de risco inerentes ao paciente,

Quadro 1 – Principais bactérias envolvidas em infecções nosocomiais e fatores de risco inerentes à colonização/infecção do paciente.

Bactéria	Infecções nosocomiais mais relacionadas	Fatores de risco inerentes ao paciente	Referências
MRSP	Infecções de feridas cirúrgicas.	Hospitalização prévia recente, visitas frequentes ao veterinário, animais com doenças de pele crônicas e uso prévio de antimicrobianos (principalmente, betalactâmicos).	Nienhoff et al. (2011a); Nienhoff et al. (2011b); Weese et al. (2012); Lehner et al. (2014); Hensel et al. (2016); Viegas et al. (2020).
MRSA	Infecções de feridas cirúrgicas.	Hospitalização prévia, hospitalização de longa duração (>3 dias), uso prévio de antimicrobianos (principalmente cefalosporinas e fluoroquinolonas), implantes cirúrgicos e tutores que estudam ou trabalham na área de saúde.	Faires et al. (2009); Faires et al. (2010); Magalhães et al. (2010); Hoet et al. (2013); Vincze et al. (2014); Walther, Tedin e Lübke-Becker (2017).

(Continua)

(Continuação)

Quadro 1 – Principais bactérias envolvidas em infecções nosocomiais e fatores de risco inerentes à colonização/infecção do paciente.

Bactéria	Infecções nosocomiais mais relatadas	Fatores de risco inerentes ao paciente	Referências
<i>E. coli</i> ESBL	Infecções de feridas cirúrgicas e do trato geniturinário.	Duração prolongada da hospitalização (>3 dias), uso de antimicrobianos antes ou durante a internação (principalmente cefalosporinas e metronidazol) e pátios de internação mistos (grandes animais).	Gibson <i>et al.</i> (2011); Maddox <i>et al.</i> (2011); Shnaiderman-Torban <i>et al.</i> (2019).
<i>Acinetobacter baumannii</i>	Infecções associadas a drenos cirúrgicos e cateteres (venosos e urinários), infecções de feridas cirúrgicas, infecções da corrente sanguínea e pneumonias.	Hospitalização (>1 dia) e uso de antimicrobianos (<15 dias).	Francey <i>et al.</i> (2000); Belmonte <i>et al.</i> (2014); Stull e Weese, (2015).
<i>Salmonella</i> spp.	Diarreia.	Uso de antimicrobianos, alimentação com carne crua ou derivados, uso de probióticos (<30 dias) e exposição a animais de produção e répteis.	Lenz <i>et al.</i> (2009); Stull e Weese (2015); Ramos <i>et al.</i> (2019); Davies, Lawes e Wales (2019); Viegas <i>et al.</i> (2020).
<i>Pseudomonas</i> spp.	Infecções de feridas cirúrgicas, infecções associadas a dispositivos invasivos (implantes e dispositivos cardiovasculares), infecções de pele, infecções do trato geniturinário e otites.	Alergias crônicas, doença endócrina e imunossupressão.	Peremans <i>et al.</i> (2002); Gatoria <i>et al.</i> (2006); Fine e Tobias (2007); Nuttall e Cole (2007); Paterson e Matyskiewicz (2018).
<i>Enterococcus faecium</i> e <i>E. faecalis</i>	Infecções do trato geniturinário (incluindo associadas a cateter), infecções de feridas cirúrgicas, infecções da corrente sanguínea e pneumonias.	Uso de antimicrobianos, imunossupressão e estadia prolongada em UTIs.	Ghosh, Dowd e Zurek (2011); Stull e Weese, 2015); Prieto <i>et al.</i> (2016).

pois é dessa forma que se determina o risco que o animal apresenta de se infectar e, também, o risco de transmitir para outros pacientes, funcionários ou para o ambiente. Entre os diferentes fatores de risco, hospitalização prévia ou de longa duração e uso de antimicrobianos foram comuns à aquisição da maioria dos patógenos citados (Quadro 1). Por isso, animais que já tenham sido expostos a esses fatores devem receber atenção redobrada e ser manejados cumprindo-se, rigorosamente, protocolos que impeçam a infecção e a disseminação do patógeno pelas instalações.

Outros fatores de risco frequentemente associados à introdução de patógenos MDR, em geral, estão sumarizados no Quadro 2. Juntamente, são apresentados, também, fatores de risco para pacientes se tornarem portadores de patógenos MDR, assim como para desenvolverem infecções por patógenos MDR dentro de instalações veterinárias.

Nas últimas décadas, muitos avanços técnicos foram obtidos na medicina veterinária com o objetivo de melhorar e prolongar a vida dos animais. Dispositivos e procedimentos cirúrgicos invasivos, terapias imunossupressoras, antimicrobianos, hospitalizações prolongadas e cuidados mais intensivos são considerados progressos na saúde veterinária. Porém, em contrapartida, tudo isso tem contribuído para o aumento da incidência de infecções nosocomiais em hospitais veterinários (Quadro 2).

É evidente que existe um risco constante de introdução, disseminação e exposição a patógenos zoonóticos MDR em hospitais veterinários. O nível desse risco pode ser estimado pela população animal atendida, pelos patógenos circulantes em animais daquela comunidade, pela proporção de pacientes cujos proprietários tomam medidas preventivas, pelos tipos de serviço oferecidos aos pacientes, pelas práticas de controle e prevenção de infecções estabelecidas e pela aderência a elas pelos funcionários e clientes. Dessa forma, é essencial que hospitais e clínicas veterinárias realizem investigações epidemiológicas que avaliem criteriosamente esses fatores, além de pesquisar taxas basais e a dinâmica de infecção dos principais patógenos MDR envolvidos nas infecções nosocomiais em seus estabelecimentos. Esse seria o primeiro passo para gerar informações úteis à elaboração e implementação de medidas de controle e prevenção para combater a resistência aos antimicrobianos em clínicas e hospitais veterinários.

Possíveis formas de transmissão de patógenos em hospitais veterinários

O controle e a prevenção de infecções estão associados à interrupção da transmissão de patógenos de suas fontes (humanos ou animais infectados/colonizados) para novos hospedeiros (humano ou animal) ou ambientes. O conhecimento das possíveis rotas de transmissão

Quadro 2 – Fatores de risco associados à introdução, à colonização e ao desenvolvimento de infecção por bactérias MDR em instalações veterinárias.

Risco	Fatores de risco	Referências
Introdução de bactérias MDR.	Clínicas e hospitais com maior encaminhamento de pacientes; animais que já tiveram infecções anteriores por patógenos MDR ou convivem com animal ou pessoas que já tiveram; animais residentes de clínicas e hospitais veterinários; veterinários com carregamento assintomático de patógenos MDR.	Hanselman et al. (2006); Duijkeren et al. (2010); Jordan et al. (2011); Ghosh et al. (2012); Stull e Weese (2015); Morris et al. (2017); Walther, Tedin e Lübke-becker (2017).
Colonização por bactérias MDR dentro de instalações veterinárias.	Hospitalização prolongada; tratamento com antimicrobiano antes da admissão; tratamento prolongado com antimicrobianos; profilaxia antimicrobiana; internação na Unidade de Terapia Intensiva (UTI); uso de doses subterapêuticas de antimicrobianos, biocidas e compostos metálicos por longos períodos.	Weese et al. (2006); Gibson et al. (2011); Ghosh, Dowd e Zurek (2011); Nienhoff et al. (2011a); Damborg et al. (2012); Maddox et al. (2012); Lehner et al. (2014); Argudín et al. (2017).
Desenvolvimento de infecção por bactérias MDR dentro de instalações veterinárias.	Hospitalização prolongada; tratamento com antimicrobianos; cateterismo intravenoso; quantidade de funcionários trabalhando no ambiente; pacientes imunossuprimidos.	Faires et al. (2010); Van den Eede et al. (2012); Suthar et al. (2014); Walther et al. (2014); Stull et al. (2018).

e de suas contribuições na propagação de microrganismos permite a adoção de medidas de controle e prevenção efetivas não somente para doenças específicas, mas para todas aquelas que são disseminadas pela mesma rota, incluindo doenças infecciosas não previstas. As principais formas de transmissão de patógenos incluem contato direto, fômites, aerossóis, ingestão e vetores, lembrando que alguns microrganismos podem ser transmitidos por mais de uma rota.

A transmissão por contato direto ocorre pelo contato do corpo com tecidos ou fluidos de um indivíduo infectado. A entrada do microrganismo pode ocorrer através de membranas mucosas, feridas e pele desgastada, ou ainda por inoculação direta, mediante mordidas e arranhões. De acordo com Stull *et al.* (2018), essa é, provavelmente, a rota mais comum e que envolve maior risco de transmissão de patógenos entre pacientes e pessoas (funcionários e proprietários).

A transmissão por fômites acontece quando indivíduos susceptíveis entram em contato com objetos/superfícies contaminados por indivíduos infectados. Em ambientes hospitalares, fômites podem incluir mesas de exames, gaiolas, canis, equipamentos e dispositivos médicos, superfícies ambientais, roupas e outros adereços utilizados pelos pacientes.

Na transmissão por aerossóis, patógenos são transferidos por partículas/gotículas muito pequenas que são inaladas por indivíduos susceptíveis ou deposita-

das em membranas mucosas ou superfícies ambientais. Dessa forma, respiração, tosse, espirro e vocalização de um indivíduo infectado, assim como alguns procedimentos hospitalares, como sucção, broncoscopia, odontologia e anestesia inalatória, podem acarretar a transmissão de microrganismos. As micropartículas podem, ainda, permanecer suspensas no ar por longos períodos e, por correntes de ar, ser disseminadas por cômodos ou pelo perímetro da instalação. Entretanto, em medicina veterinária de animais de companhia, os patógenos mais comuns em ambientes hospitalares não “viajam” grandes distâncias e requerem proximidade ou contato para que a transmissão ocorra.

A transmissão oral pode ocorrer por ingestão de comida ou água contaminada, mastigação ou lambedura de objetos e superfícies, frequentemente, contaminados por patógenos presentes em fezes, urina, saliva ou exsudatos.

Os vetores são organismos vivos que podem carrear patógenos e transmitir para indivíduos ou ambientes. Em instalações de saúde, podem ser representados por artrópodes, roedores e outras espécies. O potencial papel de carrapatos, pulgas e moscas não deve ser ignorado. Além da possibilidade de carrear microrganismos patogênicos, vetores residentes ou em contato regular com ambientes hospitalares também podem abrigar microrganismos resistentes a antimicrobianos, que, mesmo que não sejam causadores de doenças, po-

dem servir como reservatório de genes de resistência.

Princípios básicos para a implementação de um programa de controle e prevenção de infecções em hospitais veterinários

De acordo com estudos sobre infecções nosocomiais em hospitais humanos, 10 a 70% de todas as IRAS podem ser prevenidas com a implementação de protocolos de controle e prevenção de infecções, desde que haja conformidade com as medidas estabelecidas. Não há dados similares sobre infecções nosocomiais em medicina veterinária, mas esses procedimentos, vistos como efetivos na saúde humana, podem ser incorporados aos programas veterinários com a expectativa de resultados similares até que tenhamos estudos específicos fomentando medidas mais adequadas para nossa realidade.

Embora os problemas associados a infecções nosocomiais e à emergência de patógenos multirresistentes e zoonó-

... os passos para desenvolvimento de um programa de controle e prevenção de infecções são: (a) designar um profissional para supervisão e implementação do programa; (b) identificar as necessidades e desenvolver protocolos e checklists; (c) realizar uma avaliação inicial da instalação para identificar pontos fortes e áreas de melhoria; (d) desenvolver um plano de educação e treinamento dos funcionários; (e) estabelecer um funcionário para coletar materiais de educação do cliente específicos para uso em sua clínica; (f) desenvolver e implementar um programa de vigilância; e (g) estabelecer e manter um programa de avaliação de conformidade das medidas adotadas.

ticos em animais de companhia sejam bem conhecidos, a implementação prática de programas de controle e prevenção de infecções ainda é bem limitada na medicina veterinária. Programas de controle e prevenção de infecções descrevem procedimentos que objetivam prevenir a disseminação de patógenos para pacientes, funcionários, proprietários e para a comunidade. Um bom programa deve ser exclusivo de cada hospital, levando em consideração as condições estruturais da instalação veterinária, os funcionários, o suporte financeiro e o apoio dos gestores, as características dos pacientes, os patógenos de risco e os dados epidemiológicos regionais.

Segundo Stull *et al.* (2018), os passos para desenvolvimento de um programa de controle e prevenção de infecções são: (a) designar um profissional para supervisão e implementação do programa; (b) iden-

tificar as necessidades e desenvolver protocolos e *checklists*; (c) realizar uma avaliação inicial da instalação para identificar pontos fortes e áreas de melhoria; (d) desenvolver um plano de educação e treinamento dos funcionários; (e) estabelecer um funcionário para coletar materiais de educação do cliente específicos para uso em sua clínica; (f) desenvolver e implementar um programa de vigilância; e (g) estabelecer e manter um programa de avaliação de conformidade das medidas adotadas. Para o sucesso do programa, diferentes autores recomendam que o plano de ação seja formal, escrito e bem documentado. Todas as políticas e práticas adotadas, incluindo vigilância e avaliação de conformidade, devem ter procedimentos operacionais padrão (POPs) escritos, com treinamento específico para todos os funcionários e, se necessário, orientação para os clientes.

O estabelecimento de um profissional responsável pelo controle e pela prevenção de infecções é descrito como uma das medidas mais importantes para o sucesso do processo. Esse indivíduo atuará como consultor quanto às questões de controle e prevenção de infecções nosocomiais e terá como funções o desenvolvimento, a manutenção e a avaliação do programa, bem como a elaboração e a documentação de treinamentos da equipe, com avaliação de conformidade dos protocolos. Tal papel pode ser desempenhado por um técnico

ou um veterinário que tenha interesse em realizar melhorias e dar suporte ao programa e motivação para isso.

Os POPs são guias para orientar as práticas gerais e específicas dos funcionários. Exemplos de POPs para áreas essenciais de uma instalação de saúde incluem: higiene das mãos, limpeza e desinfecção, sequência para colocar e remover EPIs, identificação de pacientes de alto risco, colocação e manutenção de cateteres intravenosos e urinários, entrada e saída de áreas isoladas ou destinadas a pacientes de alto risco, procedimentos de necropsia, entre outros. A fim de aumentar a eficácia e melhorar a conformidade das práticas, é recomendada a realização de “*checklists*” para verificação das principais tarefas, o que tem auxiliado no controle e na redução de infecções nosocomiais.

A avaliação inicial para identificar pontos fortes e áreas de melhoria na instalação é relevante porque o profissional de controle pode, a partir desse procedimento, focar imediatamente no desenvolvimento de medidas para processos que, até então, são ineficazes e podem impedir o progresso e a efetividade do programa a ser implementado.

Todos os funcionários, incluindo veterinários, tratadores, técnicos, recepcionistas, estudantes, voluntários e pessoas contratadas temporariamente, devem receber treinamento de controle e prevenção de infecções. Os treinamentos devem ocorrer após a contratação,

antes do início das atividades do funcionário, e, se possível, uma atualização deve ser implementada anualmente. A orientação dos funcionários pode ser realizada por meio de leituras, reuniões e aulas, com uma avaliação documentada para pontuar seu conhecimento e sua compreensão após o repasse das informações. Há treinamentos que são específicos para determinados ofícios, mas, para todos os casos, é importante enfatizar os riscos à saúde e os protocolos existentes para reduzir a probabilidade de infecção de pacientes, funcionários e clientes no local de trabalho.

Stull *et al.* (2018) também sugerem que um funcionário seja designado para coletar material exclusivo para educação do cliente. Os autores alegam que proprietários devem estar cientes dos riscos de contrair doenças infecciosas zoonóticas e, muitas vezes, resistentes a múltiplos antimicrobianos. O material deve conter as informações relativas aos riscos e os passos básicos para a prevenção do cliente, de sua família e de seus animais.

Um dos passos mais importantes para a efetividade de um programa de controle e prevenção de infecções é a implementação de um sistema de vigi-

lância. A coleta rotineira de informações fornece um *feedback* sobre a eficácia das medidas adotadas, auxilia na identificação de áreas que necessitam de melhorias e permite a identificação prévia de ameaças, reduzindo os riscos de transmissão, os custos e o tempo de internação.

Um plano de avaliação regular de conformidade é essencial para alinhar os protocolos com as práticas dos funcionários. As auditorias são ações necessárias e

devem incluir inspeção do espaço físico, revisão das práticas de controle de infecções e avaliação do conhecimento dos funcionários. Stull *et al.* (2018) recomendam auditorias anuais, para que o profissional de controle estabeleça parâmetros de referências, identifique e priorize necessidades, encontre recursos e trace cronogramas e planos de ajuste para atender às necessidades apontadas por esse processo.

Procedimentos gerais de um programa de controle e prevenção de infecções em hospitais veterinários

Existe uma coleção de procedimentos e práticas projetados para reduzir o risco de exposição a vários patógenos. Algumas medidas são básicas e devem

O uso apropriado de EPIs é um componente crítico de um programa de controle de infecção. O objetivo é reduzir o risco de contaminação das roupas, diminuir a exposição da pele e das mucosas dos funcionários e amenizar a troca de patógenos com os pacientes.

integrar todos os programas de controle e prevenção de infecções em clínicas e hospitais veterinários.

• Uso de EPI

O uso apropriado de EPIs é um componente crítico de um programa de controle de infecção. O objetivo é reduzir o risco de contaminação das roupas, diminuir a exposição da pele e das mucosas dos funcionários e amenizar a troca de patógenos com os pacientes. Os EPIs mais comumente utilizados incluem jalecos, pijamas cirúrgicos, luvas, máscaras, óculos de proteção, gorros e protetores de calçados. A escolha desses itens irá depender da rota de transmissão da doença e dos procedimentos que serão realizados no consultório.

Jalecos e luvas são itens recomendados para todas as situações em que há contato com o animal e seu ambiente. Máscaras e óculos são indicados quando há risco de transmissão aerógena, como em procedimentos dentários, lavagens de ferimentos, doenças respiratórias potencialmente zoonóticas e necrópsias. Protetores de calçados são recomendados sempre que houver suspeita de contaminação do chão com patógenos altamente transmissíveis, MDR e/ou zoonóticos, geralmente

A higiene das mãos é uma medida simples, porém uma das mais importantes para prevenir infecções em ambientes de saúde (WHO, 2009).

presentes em animais com quadros de vômito e diarreia infecciosos, feridas abertas, leptospirose, entre outros.

Nenhum EPI deve ser utilizado fora do ambiente da clínica ou do hospital. Os jalecos e os pijamas devem ser lavados diariamente, e, se em contato com animal suspeito ou confirmado para doença infecciosa, substituídos logo após o atendimento do dele. Luvas, máscaras, gorros e protetores

de calçados devem ser utilizados apenas uma vez e descartados. A remoção do EPI é muito importante para evitar a transmissão dos patógenos para a pele e a mucosa. Antes da remoção, para evitar

contaminação do ambiente, é necessário atenção para não tocar/encostar em superfícies que serão tocadas sem luvas, como telefone, computador e material de escritório.

• Higiene das mãos

A higiene das mãos é uma medida simples, porém uma das mais importantes para prevenir infecções em ambientes de saúde. A lavagem correta utilizando água e sabão ou a higienização adequada com sanitizantes à base de álcool mata ou remove os microrganismos da pele, reduzindo a carga de patógenos que podem ser facilmente compartilhados durante os atendimen-

tos. A Figura 1, adaptada do documento “*World Health Organization (WHO) - Guidelines on Hand Hygiene in Health Care*”, descreve a técnica correta para higienização das mãos com água e sabão e recomenda que a execução do procedimento deve levar de 40 a 60 segundos.

A higiene das mãos deve ser empregada pelos funcionários imediatamente

antes e após o contato com pacientes, principalmente em procedimentos invasivos; antes e após o contato com itens no ambiente dos pacientes; após exposição a fluidos corpóreos dos pacientes; antes e após o uso de luvas; antes e após o uso do banheiro; e antes de se alimentar. É importante salientar que não é recomendada a utilização de sabão em



Duração do procedimento: 40 a 60 segundos

Figura 1: Técnica de higienização das mãos.

Traduzido e adaptado de “*World Health Organization (WHO) - Guidelines on Hand Hygiene in Health Care*”, 2009.

barra, pois são veículos de contaminação e disseminação de patógenos para outras pessoas. Deve-se utilizar sabão líquido ou espuma e, caso os recipientes sejam recarregáveis, antes da recarga, deve ocorrer a limpeza e a desinfecção deles.

• Limpeza e desinfecção

Em instalações de saúde, o ambiente e os equipamentos servem como rotas de transmissão de diversos patógenos responsáveis por doenças nosocomiais. Medidas de limpeza e desinfecção são responsáveis por reduzir consideravelmente a carga desses microrganismos e, coincidentemente, a ocorrência de doenças associadas à saúde.

A limpeza consiste na remoção de matéria orgânica visível com água e sabão, o que dificulta a sobrevivência ambiental de muitos patógenos e potencializa a ação posterior dos desinfetantes, pois esses são ineficazes na presença de matéria orgânica. A desinfecção envolve a aplicação de substâncias químicas para a inativação dos microrganismos remanescentes. Essa medida é dependente da limpeza para que alcance uma boa efetividade, ainda mais que alguns patógenos, como aqueles produtores de esporos (*Clostridium* sp.), são altamente resistentes à desinfecção, demandando uma boa limpeza para remoção desses microrganismos.

Os desinfetantes devem ser escolhidos baseados nos patógenos de interes-

se, na compatibilidade com os materiais da instalação e no nível de risco para o usuário. A Figura 2 fornece informações sobre o espectro antimicrobiano de diferentes classes de desinfetantes. De maneira geral, um desinfetante composto por amônia quaternária seria útil para a maioria das áreas de uma clínica ou de um hospital veterinário. Mas, para as áreas de isolamento para atendimento de infecções por patógenos MDR, um desinfetante de espectro estendido (aldeídos, alcalinos, biguanidas, halogênios e agentes oxidantes) seria mais indicado por, provavelmente, apresentar maior eficácia nesses locais. Para atingir a eficácia esperada, os desinfetantes devem ser aplicados na diluição correta e agir pelo tempo designado pelo fabricante. Alguns produtos podem ter várias recomendações diferentes de diluições que dependem do patógeno-alvo, e, para obter sucesso, é importante seguir essas diretrizes.

A identificação de superfícies para limpeza e desinfecção e o estabelecimento da frequência de realização dessas medidas devem ser realizados pelo oficial de controle de infecções. As superfícies (mesas, quartos de exame, piso) e os equipamentos (termômetros, estetoscópio, tesouras, eletrocardiograma, tubos endotraqueais, entre outros) que tiveram contato com os animais devem ser limpos e desinfetados entre o atendimento de pacientes. O chão deve ser desinfetado pelo menos uma vez ao

Essa tabela fornece informações gerais para cada classe química de desinfetante. A atividade antimicrobiana pode variar com a formulação e concentração. Sempre leia e siga o rótulo do produto para obter instruções adequadas de preparação e aplicação.

Características dos principais desinfetantes

Categoria	Álcoois	Álcalis	Aldeídos	Agentes oxidantes			Fenóis	Compostos de amônia quaternária
				Halogênios Cloro	Halogênios Iodo	Compostos por peroxigênio		
Ingredientes ativos comuns	<ul style="list-style-type: none"> etanol isopropanol 	<ul style="list-style-type: none"> hidróxido de cálcio carbonato de sódio óxido de cálcio 	<ul style="list-style-type: none"> formaldeído glutaraldeído orto-ftalaldeído 	<ul style="list-style-type: none"> hipoclorito de sódio (água sanitária) hipoclorito de cálcio dióxido de cloro 	<ul style="list-style-type: none"> iodo-povidona 	<ul style="list-style-type: none"> orto-fenilfenol ortobenzilpara-clorofenol 	<ul style="list-style-type: none"> cloro de benzalcônio cloro de alquildimetil amônio 	
Mecanismo de ação	Precipita proteínas; Desnatura lipídios	Altera o pH através de íons hidroxila; Saponificação de gorduras	Desnatura proteínas; ácidos nucleicos alquilados	Desnatura proteínas	Desnatura proteínas e lipídios	Desnatura proteínas; Rompe a parede celular	Desnatura proteínas; Liga-se aos fosfolípidos da membrana celular	
Características	<ul style="list-style-type: none"> Ação rápida; Evaporação rápida; Não deixa resíduos; Pode danificar borrachas e plásticos. 	<ul style="list-style-type: none"> Ação lenta; Afetado pelo pH; Atua melhor em altas temperaturas; Corrosivo para metais; Pode causar queimaduras severas na pele; Irritação da membrana mucosa; Nocivo ao meio ambiente. 	<ul style="list-style-type: none"> Ação lenta; Afetado pelo pH e temperatura; Irritação da pele/mucosas; Use apenas em áreas bem ventiladas; Cheiro forte; Não corrosivo. 	<ul style="list-style-type: none"> Ação rápida; Afetado pelo pH; Aplicação frequente; Inativado pela radiação UV; Corrói metais, borrachas e tecidos; Irritação das membranas mucosas. 	<ul style="list-style-type: none"> Estável no armazenamento; Afetado pelo pH; Requer aplicação frequente; Corrosivo Mancha roupas e superfícies. 	<ul style="list-style-type: none"> Pode deixar película residual nas superfícies; Pode danificar borrachas e plásticos e não é corrosivo; Estável no armazenamento; Provoca irritação na pele e nos olhos. 	<ul style="list-style-type: none"> Estável no armazenamento; Melhor atividade em pH neutro ou alcalino; Eficaz em altas temperaturas; Altas concentrações são corrosivas para metais; Irritação da pele, olhos e trato respiratório. 	
Precauções	Inflamável	Muito cáustico	Carcinogênico	Gás tóxico liberado se misturado com ácidos fortes ou amônia		Pode ser tóxico para animais, especialmente gatos e suínos		
Bactericida	+	+	+	+	+	+	+	
Viricida	±a	+	±	+	+	+	+ Envelopados	
Fungicida	+	+	+	+	+	+	+	
Tuberculocida	+	±	+	+	±	+	-	
Esporicida	-	+	+	±	+	-	+	
Fatores que afetam a eficácia	Inativado por matéria orgânica	Variável	Inativado por matéria orgânica, "água dura", sabões e detergentes	Rapidamente inativado por matéria orgânica	Eficaz na presença de matéria orgânica, "água dura", sabões e detergentes	Eficaz na presença de matéria orgânica, "água dura", sabões e detergentes	Inativado por matéria orgânica, "água dura", sabões e detergentes aniônicos	

+ = eficaz; ± = atividade variável ou limitada; - = não eficaz

a = ação lenta contra vírus não envelopados (por exemplo, norovírus)

Figura 2 – Espectro antimicrobiano de diferentes classes de desinfetantes. Adaptado de Fraise et al. (2013) e Quinn et al. (2011).

dia e, adicionalmente, todas as vezes que animais com doenças infecciosas ou patógenos MDR forem atendidos, assim como quando o ambiente estiver visivelmente sujo (fezes, urina, fluidos corpóreos).

Outras superfícies também devem ser limpas, como interruptores, maçanetas, teclados de computador, entre outras. Em casos de suspeita ou confirmação de patógenos MDR, uma desinfecção melhorada é requerida, com limpeza bem-feita e desinfecção com produto de espectro estendido. Deixar a sala fechada por vários dias não é recomendado devido à boa sobrevivência desses patógenos no ambiente. O que pode ser feito é uma segunda rodada de desinfecção. Não há evidências de que desinfetantes escolhidos adequadamente devam ser substituídos rotineiramente devido ao desenvolvimento de resistência.

• Limpeza e desinfecção de roupas

Itens únicos e descartáveis são essenciais para controle de infecções nosoco-

miais, entretanto há produção de grande volume de resíduos que sobrecarregam o ambiente e geram altos custos na gestão desse material. Dessa forma, a lavagem de roupas de cama, jalecos, pijamas cirúrgicos, toalhas e de outros itens

Itens ... descartáveis são essenciais para controle de infecções nosocomiais, entretanto [tornando-se lixo] ... sobrecarregam o ambiente ... a lavagem de roupas de cama, jalecos, pijamas cirúrgicos, toalhas e de outros [material reutilizável] [deve ser diária] ... de animais infectados ... deve [prever a embebição] por 10 minutos em alvejante apropriadamente diluído para desinfecção, antes de ser destinado à lavagem na máquina.

reutilizáveis também é componente importante para o controle de doenças infecciosas. Lençóis e vestimentas dos profissionais podem agir como fômites, transportando patógenos pela clínica e, até mesmo, para a comunidade. A população de micróbios nas roupas sujas é significativamente reduzida por diluição e, também, pela ação mecânica da lavagem. A secagem por ar quente também diminui a carga de microrganismos. O transporte desses itens para a casa dos funcionários ou para outras instalações aumenta tanto o risco

de infecção nosocomial como o risco de infecção comunitária. Por isso, as vestimentas profissionais e os outros itens reutilizáveis devem ser lavados no próprio hospital/clínica ou por lavanderias comerciais especializadas e equipadas para limpar roupas médicas.

As clínicas/hospitais devem ter la-

vanderias apropriadas ou serviços de lavanderia que comportem a limpeza dos itens diariamente ou com maior frequência, se necessário. Os funcionários da lavanderia devem vestir os EPIs necessários para evitar as infecções por agentes infecciosos. Lençóis com alta carga de contaminação devem ser avaliados se são destinados à limpeza ou ao descarte. Caso sejam destinados à limpeza, a matéria orgânica bruta deve ser removida antes da lavagem. Em se tratando de quartos de isolamento e de animais infectados, os itens devem ser lavados e processados separadamente dos outros materiais da clínica, e os EPIs usados pelos funcionários também devem ser trocados para que não haja disseminação dos patógenos. Esse material deve ser embebido por 10 minutos em alvejante apropriadamente diluído para desinfecção, antes de ser destinado à lavagem na máquina.

Roupa suja de quartos de isolamento deve ser lavada em água quente com alvejante. Após desinfecção e lavagem, a roupa deve ser completamente seca separadamente das outras roupas e retornar ao quarto de isolamento.

A identificação de infecções por patógenos MDR é importante para o controle de infecção, mas também para o gerenciamento adequado dos casos.

O isolamento ... é um conceito básico no controle e na prevenção de infecções

....
Áreas completamente separadas para diferentes serviços são ideais, e ter uma sala exclusiva para doenças infecciosas ajuda a conter [a transmissão de] patógenos ...

• Identificação de animais infectados por patógenos MDR

A identificação de infecções por patógenos MDR é importante para o controle de infecção, mas também para o gerenciamento adequado dos casos. A confirmação do patógeno responsável só é possível com a realização de testes de diagnóstico laboratorial, ou seja, cultura bacteriana e teste de susceptibilidade aos antimicrobianos. Esse procedimento deve ser realizado antes do tra-

tamento empírico, sempre que possível. Em algumas situações, como infecções graves e infecções que não responderam à terapia empírica, os testes referidos são indispensáveis, assim como para pacientes com histórico de infecção por patógenos MDR, exposição recente a antimicrobianos, hospitalização recente ou que convivem com pessoal ou animal com histórico de infecção por patógeno MDR.

• Práticas de isolamento

O isolamento de grupos de risco é um conceito básico no con-

trole e na prevenção de infecções. Em essência, há o agrupamento de casos de infecção semelhantes e a separação física e procedimental desse grupo dos demais. É uma medida valiosa, principalmente em instalações com grande número de infecções de sítios cirúrgicos. Além de animais com infecções por bactérias multirresistentes ou potenciais causadoras de quadros nosocomiais, a separação e o isolamento são de grande valia para diversos outros quadros, como infecções por parvovírus, potenciais quadros causados pelo vírus da cinomose e esporotricose.

Áreas completamente separadas para diferentes serviços são ideais, e ter uma sala exclusiva para doenças infecciosas ajuda a conter os patógenos que possam ser introduzidos. Embora ainda exista o potencial de transmissão de patógenos a outros pacientes e funcionários que visitam a sala, há uma maior contenção, minimizando os riscos de que um paciente internado seja exposto ao patógeno. Além disso, salas de isolamento permitem que clínicos e técnicos possam ter um papel mais ativo na garantia de limpeza e desinfecção adequadas.

O isolamento também deve ser estendido ao fluxo de pacientes e funcionários, reduzindo o contato geral direto e indireto entre diferentes grupos. É importante que áreas de contato potenciais sejam identificadas, considerando-se as formas de gerenciar os riscos. Locais de

contato comuns, como áreas de espera e salas de procedimentos gerais, podem ser uma fonte significativa de exposição a patógenos MDR e são de grande preocupação quando pacientes com alto risco de eliminação desses patógenos estão em contato com aqueles admitidos para procedimentos cirúrgicos, ou com animais imunocomprometidos. O ideal é que pacientes com qualquer suspeita de infecção/colonização por patógenos MDR tenham uma admissão e uma área de espera separadas, embora isso geralmente não seja economicamente viável. Caso o contato não possa ser evitado, esforços para limitar o tempo que pacientes considerados de alto risco passam na área de espera devem ser considerados. Nessas situações, é recomendado a elaboração de um POP que defina onde esses pacientes serão atendidos e quais poderão ser internados.

A identificação prévia e o manejo adequado dos pacientes suspeitos, se possível antes de entrar na instalação, seriam uma forma efetiva de reduzir a contaminação ambiental e a transmissão de patógenos que ocorrem por meio desse contato direto e indireto entre pacientes. A obtenção do histórico dos pacientes antes de seu ingresso na instalação poderia auxiliar na prevenção da introdução de patógenos. A capacitação de funcionários para identificação de pacientes de alto risco já no agendamento das consultas, se possível por chamada telefônica, seria uma fer-

ramenta de grande valia. Assim, o paciente não passaria pela recepção geral e seria orientado por funcionários a se dirigir à área dedicada ao atendimento de casos suspeitos, por vias diferentes do fluxo comum.

Stull *et al.* (2018) ainda sugerem que pacientes suspeitos ou confirmados para infecção por patógenos MDR sejam carregados ou transportados com auxílio de uma maca até a área de isolamento e, também, nas movimentações necessárias dentro da instalação. A rota de transmissão do patógeno envolvido deve ser levada em consideração a fim de que os indivíduos em contato utilizem os EPIs apropriados para evitar disseminação. Se a identificação da infecção/colonização ocorrer durante a consulta, é necessário que os funcionários evitem o contato dos proprietários e do paciente com outros pacientes, funcionários e superfícies. Logo após a consulta, é recomendado que os funcionários identifiquem as áreas que foram expostas a esse paciente e providenciem a limpeza e a desinfecção apropriada, com desinfetante de eficácia comprovada contra o patógeno diagnosticado.

• **Uso prudente de antimicrobianos**

O conceito de uso prudente de antimicrobianos surgiu na última década para conscientizar profissionais de saúde a prevenir os efeitos adversos, assim como a seleção de patógenos MDR. O

uso indiscriminado de antimicrobianos na saúde humana e animal é, sem dúvida, um dos fatores-chave que têm levado à atual epidemia de resistência aos antimicrobianos.

A escolha cuidadosa e o uso apropriado de antimicrobianos são etapas importantes para combater o desenvolvimento de patógenos MDR no paciente, assim como a contaminação e a transmissão no ambiente hospitalar. A seleção deve levar em consideração a eficácia contra o patógeno identificado, as condições do paciente (função renal, comorbidades, entre outras) e os fatores da droga (penetração, via de administração, frequência de administração). A administração deve ser criteriosa, apenas quando necessária, e sempre com base em testes de cultura bacteriana e susceptibilidade aos antimicrobianos, evitando, ao máximo, o uso empírico. Doses e duração da terapia devem ser respeitadas, usando-se informações e princípios farmacológicos atuais. Adicionalmente, o antimicrobiano escolhido deve ser sempre, de acordo com o resultado dos testes, aquele com o espectro mais baixo possível.

Antes da prescrição de qualquer antimicrobiano, é recomendado que uma investigação diagnóstica bem-feita, com a solicitação dos testes necessários para confirmação clínica, seja realizada. Médicos veterinários devem se esforçar para detectar enfermidades não infecciosas que não necessitam de

terapia antimicrobiana, como infecções virais, parasitismo, micotoxicoses, desequilíbrios nutricionais, entre outras. Se confirmada a necessidade do uso de antimicrobianos, deve ser considerado, primeiramente, o tratamento com agentes antissépticos. Entretanto, se não for possível, o tratamento tópico deve ter preferência ao tratamento sistêmico, pois atua com maior concentração do antimicrobiano no local da infecção, minimizando a exposição do restante da microbiota do animal e reduzindo a pressão de seleção de bactérias resistentes.

Sobre o uso profilático de antimicrobianos, é importante ressaltar que esse procedimento nunca deve ser usado como substituto para o bom manejo da saúde animal. O ambiente limpo, a técnica estéril e o preparo geral adequado em cenários cirúrgicos devem eliminar a necessidade de uso de antimicrobianos como profilaxia.

Outra consideração relevante sobre o uso prudente de antimicrobianos em animais é minimizar, ao máximo, a escolha de agentes classificados como “criticamente” e “altamente” importantes para a medicina humana. Porém, como é possível observar no Quadro 3, a grande maioria desses agentes estão, também, listados como críticos e/ou altamente importantes para uso na medicina veterinária.

A sobreposição da maioria das classes antimicrobianas entre as duas listas

tem sido um grande obstáculo no combate e na prevenção à resistência aos antimicrobianos, pois grande parte dos medicamentos que devem ser priorizados para seres humanos têm sido rotineiramente utilizados na medicina veterinária. É recomendado que essas bases, em especial carbapenêmicos, só sejam utilizadas em animais após revisão cuidadosa e justificativa razoável dos médicos veterinários. Porém, a grande semelhança entre as duas listas dificulta muito esse processo. Por isso, é muito importante que haja fornecimento de educação continuada para os médicos veterinários, com a implementação de guias sobre o uso prudente de antimicrobianos, para facilitar suas escolhas terapêuticas, conscientizando-os do grande problema que é a resistência aos antimicrobianos.

Apesar da preocupação em torno dos patógenos MDR, as infecções costumam ser tratáveis e são cuidadas com os mesmos princípios gerais usados para tratar qualquer infecção bacteriana. Uma combinação de consciência, teste de diagnóstico adequado, terapia antimicrobiana apropriada, controle de infecção e pesquisa de novas terapias alternativas pode ser capaz de limitar o impacto clínico desses organismos em infecções nosocomiais.

• Gerenciamento de resíduos

Resíduos biomédicos veterinários fonte de patógenos zoonóticos e não

Quadro 3 – Classes de antimicrobianos criticamente e altamente importantes que são utilizadas em ambas as medicinas humana (WHO, 2018) e veterinária (OIE, 2019).

Classes de antimicrobianos	Classificação			
	Criticamente importante		Altamente importante	
	Humanos (WHO, 2018)	Animais (OIE, 2019)	Humanos (WHO, 2018)	Animais (OIE, 2019)
Aminoglicosídeos	x	x		
Ansamicinas	x	x		
Cefalosporinas de 3ª e 4ª	x	x		
Macrolídeos	x	x		
Penicilinas	x	x		
Penicilinas + inibidores de betalactamases	x	x		
Quinolonas	x	x		
Anfenicóis		x	x	
Cefalosporinas de 1ª e 2ª geração			x	x
Lincosamidas			x	x
Sulfonamidas, trimetoprim e combinações		x	x	
Tetraciclinas		x	x	

zoonóticos e incluem perfurocortantes, tecidos, materiais altamente contaminados e carcaças de animais. Para perfurocortantes, é obrigatório o uso de recipientes aprovados e resistentes a perfurações para descarte desses materiais em todos os locais em que são manuseados. Resíduos não anatômicos, como gazes e esponjas com sangue ou secreções infecciosas,

Resíduos biomédicos veterinários são fonte de patógenos zoonóticos e não zoonóticos e incluem perfurocortantes, tecidos, materiais altamente contaminados e carcaças de animais.

são também classificados como resíduo biomédico. Resíduo líquido, como fluido torácico drenado, fluido abdominal, excreções e secreções, pode ser depositado cuidadosamente em um vaso sanitário ou em um dreno conectado a um esgoto sanitário ou a uma fossa séptica. Nesse caso, regulamentos locais, estaduais ou federais devem ditar o volume máximo de san-

gue ou fluidos corporais que podem ser descartados no esgoto sanitário. Deve haver cuidado com respingos e aerossóis, utilizando os EPIs apropriados.

Em áreas de isolamento, é importante acondicionar os resíduos em sacolas duplas, e recipientes utilizados para descarte devem ser completamente limpos e desinfetados quando esvaziados. Todos os resíduos provindos de quartos de isolamento devem ser tratados como potencialmente infecciosos. O lixo dessas áreas deve ser removido por pessoas devidamente vestidas com os EPIs adequados.

Sistemas de vigilância em hospitais veterinários

Nos últimos anos, a saúde veterinária tem dado maior relevância ao controle de infecções nosocomiais. Existe uma tendência em focar nas medidas para controlar as infecções, entretanto um programa com ênfase na prevenção baseada em evidências poderia, previamente, identificar situações de risco, reduzindo a ocorrência de infecções, surtos e óbitos.

A vigilância é essencial para o controle de infecções em ambientes hospitalares. A prática consiste na coleta,

A vigilância é essencial para o controle de infecções em ambientes hospitalares. A prática consiste na coleta, análise e interpretação sistemática de eventos da saúde em uma população, que permite respostas específicas para o controle de resultados adversos.

análise e interpretação sistemática de eventos da saúde em uma população, que permite respostas específicas para o controle de resultados adversos. Um programa de vigilância monitora limites críticos que, se ultrapassados, gerarão ações predeterminadas para reduzir ou eliminar um risco identificado.

Há diferentes formas de vigilância

que podem ser incorporadas na rotina de uma instalação veterinária: passiva, ativa, direcionada e sindrômica. Não há técnica definitivamente correta. Cada instalação deve escolher, desenvolver e implementar o sistema de vigilância de acordo com as características e os recursos disponíveis da clínica/hospital, com o objetivo

de fornecer informações confiáveis para elaboração de medidas de controle e prevenção de infecções.

A vigilância passiva utiliza dados prontamente disponíveis dos pacientes, como cultura bacteriana e antibiograma, para determinar taxas de ocorrência de diferentes doenças, padrões de susceptibilidade de determinados patógenos aos antimicrobianos e mudanças que podem indicar um problema no controle de infecções, como os surtos. Quando centralizada pelo profissional de controle, pode aumentar as chances

de efetividade, pois, com a análise regular dos dados, as ações são direcionadas de acordo com as evidências. O profissional de controle pode lançar mão dos sistemas de registros eletrônicos e configurá-los para rastrear códigos de diagnósticos relevantes, o que favorece o processo. A vigilância passiva é o método de monitoramento mais barato e mais fácil de implementar, porém com qualidade inferior de dados e, conseqüentemente, menor sensibilidade e especificidade, uma vez que se utiliza uma fonte secundária.

A vigilância ativa envolve a coleta de informações exclusivamente para propósito de monitoramento. Há a realização de estudos destinados a identificar agentes infecciosos específicos. Não são utilizados resultados da rotina do hospital/clínica, e sim de uma fonte primária com dados muito mais completos e informações de melhor qualidade. Porém, é um método mais demorado e que demanda mais custos. A vigilância direcionada ou baseada em risco foca em ameaças previamente identificadas ou em fatores de risco conhecidos para um resultado particular. Por exemplo, pacientes infectados por *Salmonella* spp. têm grande probabilidade de eliminar e transmitir esse patógeno para o ambiente e para outros pacientes. Dessa forma, a vigilância pode ser direcionada para pacientes com doenças gastrintestinais ou que apresentem dois de três sintomas co-

mumente associados à infecção por esse microrganismo, como febre, diarreia e leucopenia. A desvantagem desse método é a incapacidade de detectar outras adversidades que podem estar ocorrendo com pacientes que não estão sendo monitorados.

A vigilância sindrômica baseia-se em indicadores de doenças não específicos (síndromes) que estão frequentemente presentes em quadros clínicos de infecção, como inflamação (sítios cirúrgicos, sítios de cateteres intravenosos e trato urinário), febre de origem desconhecida, desordens respiratórias agudas, dermatológicas e gastrintestinais, entre outros. Nessa abordagem, a análise e a interpretação dos dados ocorrem em tempo real, antes mesmo do diagnóstico confirmatório, permitindo a detecção precoce de doenças e surtos. O intuito é reduzir o intervalo de tempo associado à vigilância passiva, monitorando as populações antes da confirmação laboratorial. Conseqüentemente, a subnotificação também é minimizada pela triagem sistemática e contínua de informações em estágios iniciais do processo da doença. A desvantagem observada na implantação dessa técnica tem sido a falta de disponibilidade contínua de dados adequados. Para que esse método seja eficaz, é necessário que haja conformidade quanto à colaboração voluntária de funcionários e médicos veterinários. Embora seja uma técnica de baixo custo e de fácil implementação, a vigilância

sindrômica ainda não é muito adotada em clínicas e hospitais veterinários.

Perante todos os métodos expostos, a vigilância sindrômica parece ser o que dispõe de mais vantagens. Ao acumular dados longitudinais, a técnica permite a detecção e o combate precoce de doenças infecciosas em geral e não depende, como os demais métodos, da confirmação laboratorial do diagnóstico e da habilidade do médico veterinário em identificar corretamente o agente causador. Somada a isso, a vigilância sindrômica, assim como a passiva, possui bom custo-benefício e é um método de fácil implementação.

Independentemente da escolha, que deve ser baseada nas características individuais e nas condições financeiras de cada clínica e hospital veterinário, é essencial que haja um sistema de vigilância contínuo. A coleta, a análise e a interpretação de dados devem fornecer taxas basais de infecções/patógenos MDR, com as quais será possível, posteriormente, detectar situações adversas, como surtos ou infecções infrequentes. Assim, a partir das evidências, são executadas estratégias e planos de ação para controle e prevenção da adversidade, de acordo com o estabelecido pelo programa de controle e prevenção de infecções nosocomiais da instalação.

Considerações finais

- Infecções nosocomiais por patógenos MDR têm sido motivo de preocupa-

ção na medicina veterinária, ainda mais que sua frequência tende a continuar ascendendo com o aumento das práticas de terapia intensiva em muitos hospitais veterinários.

- Para minimizar resultados negativos, as equipes hospitalares devem melhorar seus esforços, limitando a exposição ao patógeno, impedindo a introdução ou a transmissão à população da instituição. Além disso, devem utilizar métodos de vigilância para detectar qualquer nova ocorrência relevante na instalação.
- Os princípios básicos para um programa de controle e prevenção de infecções são: estabelecer um profissional de controle de infecção para coordenar e implementar o programa; desenvolver POPs baseados em evidências relacionados às tarefas realizadas com frequência pela equipe veterinária; avaliar os pontos fortes do programa, assim como áreas de melhoria; criar um plano de educação e treinamento de funcionários; catalogar material de educação do cliente específico para uso na instalação; implementar um sistema de vigilância; e manter um programa de avaliação de conformidade.
- Os procedimentos gerais que compõem um programa de controle e prevenção de infecções são: higiene das mãos; uso de EPIs; limpeza e desinfecção; identificação de animais infectados por patógenos MDR; prá-

ticas de isolamento; uso prudente de antimicrobianos, gerenciamento de resíduos.

- Clínicas com poucos ou nenhum protocolo de controle e prevenção de infecções devem ser encorajadas a dar pequenos passos. A criação de evidências visíveis de que esses protocolos são implementados de forma consistente dentro do hospital, invariavelmente, fortalecerá a lealdade dos clientes ao hospital, bem como aprofundará o orgulho que a equipe terá de suas funções.

Referências

1. AAFP/AAHA Basic guidelines of judicious therapeutic use of antimicrobials, 2014. Disponível em: <<https://www.avma.org/resources-tools/avma-policies/aafpaaha-basic-guidelines-judicious-therapeutic-use-antimicrobials>>. Acesso em: 15 abr. 2021.
2. ANDERSON, M.E.C. Contact precautions and hand hygiene in veterinary clinics. **The Veterinary Clinics of North America. Small Animal Practice**, v.45, p.343–360, vi, 2015. DOI: 10.1016/j.cvsm.2014.11.003.
3. ANDERSON, M.E.C.; MONTGOMERY, J.; WEESE, J.S.; PRESCOTT, J.F. Infection Prevention and Control Best Practices, 2008. Disponível em: <<https://www.wormsandgermsblog.com/files/2008/04/CCAR-Guidelines-Final2.pdf>>. Acesso em: 12 abr. 2021.
4. ARGUDÍN, M.; DEPLANO, A.; MEGHRAOUI, A.; DODÉMONT, M.; HEINRICH, A.; DENIS, O.; NONHOFF, C.; ROISIN, S. Bacteria from Animals as a Pool of Antimicrobial Resistance Genes. **Antibiotics**, v.6, p.12, 2017. DOI: 10.3390/antibiotics6020012.
5. BECO, L.; GUAGUÈRE, E.; MÉNDEZ, C.L.; NOLI, C.; NUTTALL, T.; VROOM, M. Suggested guidelines for using systemic antimicrobials in bacterial skin infections: part 1—diagnosis based on clinical presentation, cytology and culture. **The Veterinary Record**, v.172, p.72, 2013a. DOI: 10.1136/vr.101069.
6. BECO, L.; GUAGUÈRE, E.; MÉNDEZ, C.L.; NOLI, C.; NUTTALL, T.; VROOM, M. Suggested guidelines for using systemic antimicrobials in bacterial skin infections: part 2— antimicrobial choice, treatment regimens and compliance. **The Veterinary Record**, v.172, p.156–160, 2013b. DOI: 10.1136/vr.101070.
7. BELMONTE, O.; PAILHORIÈS, H.; KEMPF, M.; GAULTIER, M.P.; LEMARIÉ, C.; RAMONT, C.; JOLY-GUILLOU, M.L.; EVEILLARD, M. High prevalence of closely-related *Acinetobacter baumannii* in pets according to a multicentre study in veterinary clinics, Reunion Island. **Veterinary Microbiology**, v.170, p.446–450, 2014. DOI: 10.1016/j.vetmic.2014.01.042.
8. BENEDICT, K.M.; MORLEY, P.S.; METRE, D.C.V. Characteristics of biosecurity and infection control programs at veterinary teaching hospitals. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v.233, p.767–773, 2008. DOI: 10.2460/javma.233.5.767.
9. BERGSTRÖM, A.; DIMOPOULOU, M.; ELDH, M. Reduction of Surgical Complications in Dogs and Cats by the Use of a Surgical Safety Checklist. **Veterinary surgery: VS**, v.45, p.571–576, 2016. DOI: 10.1111/vsu.12482.
10. BRAINARD, B.M.; ALWOOD, A.J.; KUSHNER, L.I.; DROBATZ, K.J.; KING, L.G. Postoperative pulmonary complications in dogs undergoing laparotomy: anesthetic and perioperative factors. **Journal of Veterinary Emergency and Critical Care**, v.16, p.184–191, 2006. DOI: 10.1111/j.1476-4431.2006.00177.x.
11. BURGESS, B.A. Prevention and surveillance of surgical infections: A review. **Veterinary Surgery**, v.48, p.284–290, 2019. DOI: <https://doi.org/10.1111/vsu.13176>.
12. BURGESS, B.A. Epidemiology and prevention of *Salmonella enterica* in veterinary hospitals. Tese (Doutorado em Ciências clínicas) – Universidade do Estado do Colorado. Fort Collins, Colorado. p.154, 2014. Disponível em: <https://mountainscholar.org/bitstream/handle/10217/83716/Burgess_colostate_0053A_12531.pdf?sequence=1>. Acesso em: 12 abr. 2021.
13. BURGESS, B.A.; MORLEY, P.S. Veterinary hospital surveillance systems. **The Veterinary Clinics of North America. Small Animal Practice**, v.45, p.235–242, v, 2015. DOI:

- 10.1016/j.cvsm.2014.11.002.
14. CHERRY, B.; BURNS, A.; JOHNSON, G.S.; PFEIFFER, H.; DUMAS, N.; BARRETT, D.; MCDONOUGH, P.L.; EIDSON, M. *Salmonella* Typhimurium Outbreak Associated with Veterinary Clinic - Volume 10, Number 12 - Emerging Infectious Diseases journal - CDC, 2004. DOI: 10.3201/eid1012.040714.
 15. DAMBORG, P.; MARSKAR, P.; BAPTISTE, K.E.; GUARDABASSI, L. Faecal shedding of CTX-M-producing *Escherichia coli* in horses receiving broad-spectrum antimicrobial prophylaxis after hospital admission. **Veterinary Microbiology**, v.154, p.298–304, 2012. DOI: 10.1016/j.vetmic.2011.07.005.
 16. DAVIES, R.H.; LAWES, J.R.; WALES, A.D. Raw Diets for Dogs and Cats: A Review, With Particular Reference to Microbiological Hazards. **Journal of Small Animal Practice**, v.60, p.329–339, 2019. DOI: 10.1111/jsap.13000.
 17. DONKER, T.; WALLINGA, J.; SLACK, R.; GRUNDMANN, H. Hospital Networks and the Dispersal of Hospital-Acquired Pathogens by Patient Transfer. **PLOS ONE**, v.7, p.e35002, 2012. DOI: 10.1371/journal.pone.0035002.
 18. DÓREA, F.C.; SANCHEZ, J.; REVIE, C.W. Veterinary syndromic surveillance: Current initiatives and potential for development. **Preventive Veterinary Medicine**, v.101, p.1–17, 2011. DOI: 10.1016/j.prevetmed.2011.05.004.
 19. DUIJKEREN, E. VAN; MOLEMAN, M.; SLOET VAN OLDRUITENBORGH-OOSTERBAAN, M.M.; MULTEM, J.; TROELSTRA, A.; FLUIT, A.C.; WAMEL, W.J.B. VAN; HOUWERS, D.J.; NEELING, A.J. DE; WAGENAAR, J.A. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in horses and horse personnel: An investigation of several outbreaks. **Veterinary Microbiology**, v.141, p.96–102, 2010. DOI: 10.1016/j.vetmic.2009.08.009.
 20. EUGSTER, S.; SCHAWALDER, P.; GASCHEN, F.; BOERLIN, P. A prospective study of postoperative surgical site infections in dogs and cats. **Veterinary surgery: VS**, v.33, p.542–550, 2004. DOI: 10.1111/j.1532-950X.2004.04076.x.
 21. FAIRES, M.C.; TATER, K.C.; WEESE, J.S. An investigation of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* colonization in people and pets in the same household with an infected person or infected pet. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v.235, p.540–543, 2009. DOI: 10.2460/javma.235.5.540.
 22. FAIRES, M.C.; TRAVERSE, M.; TATER, K.C.; PEARL, D.L.; WEESE, J.S. Methicillin-Resistant and Susceptible *Staphylococcus aureus* Infections in Dogs. **Emerging Infectious Diseases**, v.16, p.69–75, 2010. DOI: 10.3201/eid1601.081758.
 23. FINE, D.M.; TOBIAS, A.H. Cardiovascular Device Infections in Dogs: Report of 8 Cases and Review of the Literature. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v.21, p.1265–1271, 2007. DOI: 10.1111/j.1939-1676.2007.tb01948.x.
 24. FRANCEY, T.; GASCHEN, F.; NICOLET, J.; BURNENS, A.P. The role of *Acinetobacter baumannii* as a nosocomial pathogen for dogs and cats in an intensive care unit. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v.14, p.177–183, 2000. DOI: 10.1892/0891-6640(2000)014<0177:trobba>2.3.co;2.
 25. GATORIA, I.S.; SAINI, N.S.; RAI, T.S.; DWIVEDI, P.N. Comparison of three techniques for the diagnosis of urinary tract infections in dogs with urolithiasis. **Journal of Small Animal Practice**, v.47, p.727–732, 2006. DOI: 10.1111/j.1748-5827.2006.00169.x.
 26. GHOSH, A.; DOWD, S.E.; ZUREK, L. Dogs leaving the ICU carry a very large multi-drug resistant enterococcal population with capacity for biofilm formation and horizontal gene transfer. **PloS One**, v.6, p.e22451, 2011. DOI: 10.1371/journal.pone.0022451.
 27. GHOSH, A.; KUKANICH, K.; BROWN, C.E.; ZUREK, L. Resident Cats in Small Animal Veterinary Hospitals Carry Multi-Drug Resistant Enterococci and are Likely Involved in Cross-Contamination of the Hospital Environment. **Frontiers in Microbiology**, v.3, 2012. DOI: 10.3389/fmicb.2012.00062.
 28. GIBSON, J.S.; MORTON, J.M.; COBBOLD, R.N.; FILIPPICH, L.J.; TROTT, D.J. Risk factors for dogs becoming rectal carriers of multidrug-resistant *Escherichia coli* during hospitalization. **Epidemiology and Infection**, v.139, p.1511–1521, 2011. DOI: 10.1017/S0950268810002785.
 29. GRÖNTHAL, T.; MOODLEY, A.; NYKÄSENOJA, S.; JUNNILA, J.; GUARDABASSI, L.; THOMSON, K.; RANTALA, M. Large Outbreak Caused by Methicillin Resistant *Staphylococcus pseudintermedius* ST71 in a Finnish Veterinary Teaching Hospital - From Outbreak Control to Outbreak

- Prevention. **PLoS ONE**, v.9, 2014. DOI: 10.1371/journal.pone.0110084.
30. GUARDABASSI, L. Veterinary hospital-acquired infections: the challenge of MRSA and other multidrug-resistant bacterial infections in veterinary medicine. **Veterinary Journal (London, England: 1997)**, v.193, p.307–308, 2012. DOI: 10.1016/j.tvjl.2012.04.005.
 31. HANSELMAN, B.A.; KRUTH, S.A.; ROUSSEAU, J.; LOW, D.E.; WILLEY, B.M.; MCGEER, A.; WEESE, J.S. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* Colonization in Veterinary Personnel. **Emerging Infectious Diseases**, v.12, p.1933–1938, 2006. DOI: 10.3201/eid1212.060231.
 32. HARBARTH, S.; SAX, H.; GASTMEIER, P. The preventable proportion of nosocomial infections: an overview of published reports. **The Journal of Hospital Infection**, v.54, p.258–266; quiz 321, 2003. DOI: 10.1016/s0195-6701(03)00150-6.
 33. HENSEL, N.; ZABEL, S.; HENSEL, P. Prior antibacterial drug exposure in dogs with methicillin-resistant *Staphylococcus pseudintermedius* (MRSP) pyoderma. **Veterinary Dermatology**, v.27, p.72–78e20, 2016. DOI: 10.1111/vde.12292.
 34. HOET, A.E.; BALEN, J. VAN; NAVA-HOET, R.C.; BATEMAN, S.; HILLIER, A.; DYCE, J.; WITTUM, T.E. Epidemiological Profiling of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*-Positive Dogs Arriving at a Veterinary Teaching Hospital. **Vector-Borne and Zoonotic Diseases**, v.13, p.385–393, 2013. DOI: 10.1089/vbz.2012.1089.
 35. JAVA, M.A.; DROBATZ, K.J.; GILLEY, R.S.; LONG, S.N.; KUSHNER, L.I.; KING, L.G. Incidence of and risk factors for postoperative pneumonia in dogs anesthetized for diagnosis or treatment of intervertebral disk disease. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v.235, p.281–287, 2009. DOI: 10.2460/javma.235.3.281.
 36. JORDAN, D.; SIMON, J.; FURY, S.; MOSS, S.; GIFFARD, P.; MAIWALD, M.; SOUTHWELL, P.; BARTON, M.D.; AXON, J.E.; MORRIS, S.G.; TROTT, D.J. Carriage of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* by veterinarians in Australia. **Australian Veterinary Journal**, v.89, p.152–159, 2011. DOI: 10.1111/j.1751-0813.2011.00710.x.
 37. LEE, J.A.; DROBATZ, K.J.; KOCH, M.W.; KING, L.G. Indications for and outcome of positive-pressure ventilation in cats: 53 cases (1993–2002). **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v.226, p.924–931, 2005. DOI: 10.2460/javma.2005.226.924.
 38. LEHNER, G.; LINEK, M.; BOND, R.; LLOYD, D.H.; PRENGER-BERNINGHOFF, E.; THOM, N.; STRAUBE, I.; VERHEYEN, K.; LOEFFLER, A. Case-control risk factor study of methicillin-resistant *Staphylococcus pseudintermedius* (MRSP) infection in dogs and cats in Germany. **Veterinary Microbiology**, v.168, p.154–160, 2014. DOI: 10.1016/j.vetmic.2013.10.023.
 39. LENZ, J.; JOFFE, D.; KAUFFMAN, M.; ZHANG, Y.; LEJEUNE, J. Perceptions, practices, and consequences associated with foodborne pathogens and the feeding of raw meat to dogs. **The Canadian Veterinary Journal**, v.50, p.637–643, 2009.
 40. LEONARD, E.K.; PEARL, D.L.; FINLEY, R.L.; JANECKO, N.; PEREGRINE, A.S.; REID-SMITH, R.J.; WEESE, J.S. Evaluation of Pet-Related Management Factors and the Risk of *Salmonella* spp. Carriage in Pet Dogs from Volunteer Households in Ontario (2005–2006). **Zoonoses and Public Health**, v.58, p.140–149, 2011. DOI: 10.1111/j.1863-2378.2009.01320.x.
 41. LING, G.V.; NORRIS, C.R.; FRANTI, C.E.; EISELE, P.H.; JOHNSON, D.L.; RUBY, A.L.; JANG, S.S. Interrelations of organism prevalence, specimen collection method, and host age, sex, and breed among 8,354 canine urinary tract infections (1969–1995). **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v.15, p.341–347, 2001.
 42. LIPPERT, A.C.; FULTON, R.B.J.; PARR, A.M. Nosocomial infection surveillance in a small animal intensive care unit. **The Journal of the American Animal Hospital Association (USA)**, 1988.
 43. MADDOX, T.W.; PINCHBECK, G.L.; CLEGG, P.D.; WEDLEY, A.L.; DAWSON, S.; WILLIAMS, N.J. Cross-sectional study of antimicrobial-resistant bacteria in horses. Part 2: Risk factors for faecal carriage of antimicrobial-resistant *Escherichia coli* in horses. **Equine Veterinary Journal**, v.44, p.297–303, 2012. DOI: 10.1111/j.2042-3306.2011.00440.x.
 44. MADDOX, T.W.; WILLIAMS, N.J.; CLEGG, P.D.; O'DONNELL, A.J.; DAWSON, S.; PINCHBECK, G.L. Longitudinal study of antimicrobial-resistant commensal *Escherichia coli* in the faeces of horses in an equine hospital. **Preventive Veterinary Medicine**, v.100, p.134–145, 2011.

- DOI: 10.1016/j.prevetmed.2011.02.006.
45. MAGALHÃES, R.J.S.; LOEFFLER, A.; LINDSAY, J.; RICH, M.; ROBERTS, L.; SMITH, H.; LLOYD, D.H.; PFEIFFER, D.U. Risk factors for methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) infection in dogs and cats: a case-control study. **Veterinary Research**, v.41, p.55, 2010. DOI: 10.1051/vetres/2010028.
 46. MANDL, K.D.; OVERHAGE, J.M.; WAGNER, M.M.; LOBER, W.B.; SEBASTIANI, P.; MOSTASHARI, F.; PAVLIN, J.A.; GESTELAND, P.H.; TREADWELL, T.; KOSKI, E.; HUTWAGNER, L.; BUCKERIDGE, D.L.; ALLER, R.D.; GRANNIS, S. Implementing Syndromic Surveillance: A Practical Guide Informed by the Early Experience. **Journal of the American Medical Informatics Association**, v.11, p.141–150, 2004. DOI: 10.1197/jamia.M1356.
 47. MARSH-NG, M.L.; BURNEY, D.P.; GARCIA, J. Surveillance of Infections Associated With Intravenous Catheters in Dogs and Cats in an Intensive Care Unit. **Journal of the American Animal Hospital Association**, v.43, p.13–20, 2007. DOI: 10.5326/0430013.
 48. MORLEY, P.S. Biosecurity of veterinary practices. **The Veterinary Clinics of North America. Food Animal Practice**, v.18, p.133–155, vii, 2002. DOI: 10.1016/s0749-0720(02)00009-9.
 49. MORLEY, P.S. Surveillance for nosocomial infections in veterinary hospitals. **Veterinary Clinics of North America: Equine Practice**, v.20, p.561–576, 2004. DOI: 10.1016/j.cveq.2004.08.002.
 50. MORRIS, D.O.; LOEFFLER, A.; DAVIS, M.F.; GUARDABASSI, L.; WEESE, J.S. Recommendations for approaches to methicillin-resistant staphylococcal infections of small animals: diagnosis, therapeutic considerations and preventative measures. **Veterinary Dermatology**, v.28, p.304–e69, 2017. DOI: 10.1111/vde.12444.
 51. NELSON, L.L. Surgical site infections in small animal surgery. **The Veterinary Clinics of North America. Small Animal Practice**, v.41, p.1041–1056, viii, 2011. DOI: 10.1016/j.cvsm.2011.05.010.
 52. NIENHOFF, U.; KADLEC, K.; CHABERNY, I.F.; VERSPOHL, J.; GERLACH, G.-F.; KREIENBROCK, L.; SCHWARZ, S.; SIMON, D.; NOLTE, I. Methicillin-resistant *Staphylococcus pseudintermedius* among dogs admitted to a small animal hospital. **Veterinary Microbiology**, v.150, p.191–197, 2011a. DOI: 10.1016/j.vetmic.2010.12.018.
 53. FRAISE AP, LAMBERT PA ET AL. (eds). RUSSELL, HUGO & AYLIFFE'S Principles and Practice of Disinfection, Preservation and Sterilization, 5th ed. 2013. Ames, IA: Wiley-Blackwell; McDonnell GE. Antisepsis, Disinfection, and Sterilization: Types, Action, and Resistance. 2007. ASM Press, Washington DC. Rutala WA, Weber DJ, Healthcare Infection Control Practices Advisory Committee (HICPAC). 2008. Guideline for disinfection and sterilization in healthcare facilities.
 54. QUINN PJ, MARKY FC et al. (eds). **Veterinary Microbiology and Microbial Disease**. 2nd ed. 2011. West Sussex, UK: Wiley-Blackwell, pp 851-889.
 55. NIENHOFF, U.; KADLEC, K.; CHABERNY, I.F.; VERSPOHL, J.; GERLACH, G.-F.; SCHWARZ, S.; KREIENBROCK, L.; NOLTE, I.; SIMON, D. Methicillin-resistant *Staphylococcus pseudintermedius* among cats admitted to a veterinary teaching hospital. **Veterinary Microbiology**, v.153, p.414–416, 2011b. DOI: 10.1016/j.vetmic.2011.05.045.
 56. NUTTALL, T.; COLE, L.K. Evidence-based veterinary dermatology: a systematic review of interventions for treatment of *Pseudomonas* otitis in dogs. **Veterinary Dermatology**, v.18, p.69–77, 2007. DOI: 10.1111/j.1365-3164.2007.00575.x.
 57. OIE – List of Antimicrobials of Veterinary Importance, 2019. Disponível em: <https://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Our_scientific_expertise/docs/pdf/AMR/A_OIE_List_antimicrobials_July2019.pdf>. Acesso em: 12 abr. 2021.
 58. PATERSON, S.; MATYSKIEWICZ, W. A study to evaluate the primary causes associated with *Pseudomonas* otitis in 60 dogs: Primary causes of *Pseudomonas* otitis. **Journal of Small Animal Practice**, v.59, p.238–242, 2018. DOI: 10.1111/jsap.12813.
 59. PEREMANS, K.; WINTER, F.; JANSSENS, L.; DUMONT, F.; BREE, H.; DIERCKX, R. An infected hip prosthesis in a dog diagnosed with a 99mtc-ciprofloxacin (infecton) scan. **Veterinary Radiology** <html_ent glyph="&" ascii="&"/> **Ultrasound**, v.43, p.178–182, 2002. DOI: 10.1111/j.1740-8261.2002.tb01666.x.
 60. PRIETO, A.M.; SCHAİK, W. VAN; ROGERS,

- M.R.C.; COQUE, T.M.; BAQUERO, F.; CORANDER, J.; WILLEMS, R.J.L. Global Emergence and Dissemination of Enterococci as Nosocomial Pathogens: Attack of the Clones? **Frontiers in Microbiology**, v.7, 2016. DOI: 10.3389/fmicb.2016.00788.
61. RAMOS, C.P.; SANTANA, J.A.; MORCATTI COURA, F.; XAVIER, R.G.C.; LEAL, C.A.G.; OLIVEIRA JUNIOR, C.A.; HEINEMANN, M.B.; LAGE, A.P.; LOBATO, F.C.F.; SILVA, R.O.S. Identification and Characterization of *Escherichia coli*, *Salmonella* Spp., *Clostridium perfringens*, and *C. difficile* Isolates from Reptiles in Brazil. **BioMed Research International**, v.2019, p.1–9, 2019. DOI: 10.1155/2019/9530732.
62. RUPLE-CZERNIAK, A.; ACETO, H.W.; BENDER, J.B.; PARADIS, M.R.; SHAW, S.P.; VAN METRE, D.C.; WEESE, J.S.; WILSON, D.A.; WILSON, J.H.; MORLEY, P.S. Using Syndromic Surveillance to Estimate Baseline Rates for Healthcare-Associated Infections in Critical Care Units of Small Animal Referral Hospitals. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v.27, p.1392–1399, 2013. DOI: 10.1111/jvim.12190.
63. SAINT, S.; CHENOWETH, C.E. Biofilms and catheter-associated urinary tract infections. **Infectious Disease Clinics of North America**, v.17, p.411–432, 2003. DOI: 10.1016/S0891-5520(03)00011-4.
64. SALMAN, M.D. **Animal Disease Surveillance and Survey Systems: Methods and Applications**. [s.l.] John Wiley & Sons, 2008. 242p.
65. SEGUELA, J.; PAGES, J.-P. Bacterial and fungal colonisation of peripheral intravenous catheters in dogs and cats. **Journal of Small Animal Practice**, v.52, p.531–535, 2011. DOI: 10.1111/j.1748-5827.2011.01101.x.
66. SHAFFER, L.E. **Using pre-diagnostic data from veterinary laboratories to detect disease outbreaks in companion animals**. 2007. The Ohio State University,
67. SHEPHARD, R.W. The development of a syndromic surveillance system for the extensive beef cattle producing regions of Australia. 2006.
68. SHNAIDERMAN-TORBAN, A.; PAITAN, Y.; ARIELLY, H.; KONDRATYEVA, K.; TIROSH-LEVY, S.; ABELLS-SUTTON, G.; NAVON-VENEZIA, S.; STEINMAN, A. Extended-Spectrum β -Lactamase-Producing *Enterobacteriaceae* in Hospitalized Neonatal Foals: Prevalence, Risk Factors for Shedding and Association with Infection. **Animals: an Open Access Journal from MDPI**, v.9, 2019. DOI: 10.3390/ani9090600.
69. SILVA, G.M.; CARMO, M.S. DO; MORAES, L.S.; MORAES, F.C.; BARNABÉ, A.S.; FIGUEIREDO, P. DE M.S. Formigas (*Hymenoptera: Formicidae*) como vetores de bactérias em ambiente hospitalar na cidade de São Luis - Maranhão. **Rev. patol. trop**, v.41, p.348–355, 2012.
70. STULL, J.W.; BJORVIK, E.; BUB, J.; DVORAK, G.; PETERSEN, C.; TROYER, H.L. 2018 AAHA Infection Control, Prevention, and Biosecurity Guidelines. **Journal of the American Animal Hospital Association**, v.54, p.297–326, 2018. DOI: 10.5326/JAAHA-MS-6903.
71. STULL, J.W.; WEESE, J.S. Hospital-Associated Infections in Small Animal Practice. **Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice**, v.45, p.217–233, 2015. DOI: 10.1016/j.cvsm.2014.11.009.
72. SUTHAR, N.; ROY, S.; CALL, D.R.; BESSER, T.E.; DAVIS, M.A. An Individual-Based Model of Transmission of Resistant Bacteria in a Veterinary Teaching Hospital. **PLOS ONE**, v.9, p.e98589, 2014. DOI: 10.1371/journal.pone.0098589.
73. VAN DEN EEDE, A.; HERMANS, K.; VAN DEN ABEELE, A.; FLORÉ, K.; DEWULF, J.; VANDERHAEGHEN, W.; CROMBÉ, F.; BUTAYE, P.; GASTHUYS, F.; HAESBROUCK, F.; MARTENS, A. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) on the skin of long-term hospitalised horses. **The Veterinary Journal**, v.193, p.408–411, 2012. DOI: 10.1016/j.tvjl.2011.12.004.
74. VERWILGHEN, D.; SINGH, A. Fighting surgical site infections in small animals: are we getting anywhere? **The Veterinary Clinics of North America. Small Animal Practice**, v.45, p.243–276, v, 2015. DOI: 10.1016/j.cvsm.2014.11.001.
75. VIEGAS, F.M.; RAMOS, C.P.; XAVIER, R.G.C.; LOPES, E.O.; JÚNIOR, C.A.O.; BAGNO, R.M.; DINIZ, A.N.; LOBATO, F.C.F.; SILVA, R.O.S. Fecal shedding of *Salmonella* spp., *Clostridium perfringens*, and *Clostridioides difficile* in dogs fed raw meat-based diets in Brazil and their owners' motivation. **PLoS ONE**, v.15, 2020. DOI: 10.1371/journal.pone.0231275.
76. VINCZE, S.; BRANDENBURG, A.G.;

- ESPELAGE, W.; STAMM, I.; WIELER, L.H.; KOPP, P.A.; LÜBKE-BECKER, A.; WALTHER, B. Risk factors for MRSA infection in companion animals: Results from a case-control study within Germany. **International Journal of Medical Microbiology**, One Health. v.304, p.787-793, 2014. DOI: 10.1016/j.ijmm.2014.07.007.
77. WALTHER, B.; LÜBKE-BECKER, A.; STAMM, I.; GEHLEN, H.; BARTON, A.K.; JANSSEN, T.; WIELER, L.H.; GUENTHER, S. Suspected nosocomial infections with multi-drug resistant *E. coli*, including extended-spectrum beta-lactamase (ESBL)-producing strains, in an equine clinic. **Berliner Und Munchener Tierärztliche Wochenschrift**, v.127, p.421-427, 2014.
78. WALTHER, B.; TEDIN, K.; LÜBKE-BECKER, A. Multidrug-resistant opportunistic pathogens challenging veterinary infection control. **Veterinary Microbiology**, v.200, p.71-78, 2017. DOI: 10.1016/j.vetmic.2016.05.017.
79. WEESE, J.S. A review of multidrug resistant surgical site infections. **Veterinary and Comparative Orthopaedics and Traumatology**, v.21, p.1-7, 2008. DOI: 10.3415/VCOT-07-11-0106.
80. WEESE, J.S. Antimicrobial therapy for multi-drug resistant pathogens. **Equine Veterinary Education**, v.21, p.328-334, 2009. DOI: <https://doi.org/10.2746/095777308X334293>.
81. WEESE, J.S. Staphylococcal control in the veterinary hospital. **Veterinary Dermatology**, v.23, p.292-298, e57-58, 2012. DOI: 10.1111/j.1365-3164.2012.01048.x.
82. WEESE, J.S.; DICK, H.; WILLEY, B.M.; MCGEER, A.; KREISWIRTH, B.N.; INNIS, B.; LOW, D.E. Suspected transmission of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* between domestic pets and humans in veterinary clinics and in the household. **Veterinary Microbiology**, v.115, p.148-155, 2006. DOI: 10.1016/j.vetmic.2006.01.004.
83. WEESE, J.S.; FAIRES, M.C.; FRANK, L.A.; REYNOLDS, L.M.; BATTISTI, A. Factors associated with methicillin-resistant versus methicillin-susceptible *Staphylococcus pseudintermedius* infection in dogs. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v.240, p.1450-1455, 2012. DOI: 10.2460/javma.240.12.1450.
84. WHO - WHO/CDS/CSR/EPH/2002.12. Disponível em: <https://www.who.int/csr/resources/publications/WHO_CDS_CSR_EPH_2002_12/en/#>. Acesso em: 13 abr. 2020.
85. WHO - Evidence for Hand Hygiene Guidelines, 2009. Disponível em: <https://www.who.int/gpsc/tools/faqs/evidence_hand_hygiene/en/>. Acesso em: 12 abr. 2021.
86. WHO - Critically important antimicrobials for human medicine, 6th revision, 2018. Disponível em: <<https://www.who.int/foodsafety/publications/antimicrobials-sixth/en/>>. Acesso em: 12 abr. 2021.
87. WILLEMSSEN, A.; COBBOLD, R.; GIBSON, J.; WILKS, K.; LAWLER, S.; REID, S. Infection control practices employed within small animal veterinary practices—A systematic review. **Zoonoses and Public Health**, v.66, p.439-457, 2019. DOI: 10.1111/zph.12589.
88. WILLIAMS, C.J.; SCHEFTEL, J.M.; ELCHOS, B.L.; HOPKINS, S.G.; LEVINE, J.F. Compendium of Veterinary Standard Precautions for Zoonotic Disease Prevention in Veterinary Personnel: National Association of State Public Health Veterinarians: Veterinary Infection Control Committee 2015. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v.247, p.1252-1277, 2015. DOI: 10.2460/javma.247.11.1252.
89. VIEGAS FM, SANTANA JA, SILVA BA, XAVIER RGC, BONISSON CT, et al. (2022) Occurrence and characterization of methicillin-resistant *Staphylococcus* spp. in diseased dogs in Brazil. PLOS ONE 17(6): e0269422. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0269422>
90. WINDAHL, U.; BENGTSSON, B.; NYMAN, A.-K.; HOLST, B.S. The distribution of pathogens and their antimicrobial susceptibility patterns among canine surgical wound infections in Sweden in relation to different risk factors. **Acta Veterinaria Scandinavica**, v.57, 2015. DOI: 10.1186/s13028-015-0102-6.



CERTIFICADO

Certificamos que o trabalho intitulado

**DISTRIBUTION AND PREVALENCE OF MULTI-DRUG-RESISTANT Staphylococcus IN
INFECTED DOGS AT UFMG VETERINARY HOSPITAL**

Autoria de

**Júlia Lara S. Câmara, Jordana A. Santana, Cláudia T. Bonisson, Flávia M. Viegas e
Rodrigo Otávio S. Silva**

Foi aprovado e selecionado entre os melhores, sendo apresentado na modalidade de Comunicação Oral Online curta e publicado nos Anais do II Congresso Ibero Americano de Saúde Pública Veterinária - II CISP VET ocorrido de 10 a 14 de Agosto de 2020 com carga horária de 20 horas.

Selene Daniela Babboni
Organizadora do CISP VET

CERTIFICADO

Certificamos que o trabalho intitulado Perfil de resistência aos antimicrobianos de estirpes de *Staphylococcus pseudintermedius* isoladas de quadros infecciosos de cães, foi apresentado na XXIX Semana de Iniciação Científica, promovida pela Pró-Reitoria de Pesquisa, no período de 05/10/2020 a 23/10/2020.

De autoria de: JULIA LARA SETTE CAMARA, JORDANA ALMEIDA SANTANA, FLAVIA MELLO VIEGAS, BRENDA ALMEIDA SILVA, FRANCISCO CARLOS FARIA LOBATO

Orientador(a): RODRIGO OTAVIO SILVEIRA SILVA

Ana Maria Hermeto
Diretora de Fomento à Pesquisa

Mario Fernando Montenegro Campos
Pró-Reitor de Pesquisa



Código de autenticidade: 8505785391a374b0d4f3b0e05b8f42c2188588ef93cebb16ab2421ec29798f32a31ff

Este documento dispensa carimbo e assinatura. Verifique sua autenticidade com o QRCode.

CERTIFICADO

Certificamos que o trabalho intitulado Perfil de resistência aos antimicrobianos de estirpes de *Staphylococcus pseudintermedius* isoladas de quadros infecciosos de cães, foi apresentado na XXIX Semana de Iniciação Científica, promovida pela Pró-Reitoria de Pesquisa, no período de 05/10/2020 a 23/10/2020.

De autoria de: JULIA LARA SETTE CAMARA, JORDANA ALMEIDA SANTANA, FLAVIA MELLO VIEGAS, BRENDA ALMEIDA SILVA, FRANCISCO CARLOS FARIA LOBATO

Orientador(a): RODRIGO OTAVIO SILVEIRA SILVA

Sendo premiado como Relevância Acadêmica

Ana Maria Hermeto
Diretora de Fomento à Pesquisa

Mario Fernando Montenegro Campos
Pró-Reitor de Pesquisa



Este documento dispensa carimbo e assinatura. Verifique sua autenticidade com o QRCode.

CERTIFICADO DE RELEVÂNCIA ACADÊMICA

A Comissão Organizadora do Colóquio tem a grande satisfação de conferir este certificado de Relevância Acadêmica pelo brilhante resumo científico, apresentado no IX Colóquio Técnico Científico de Saúde Única, Ciências Agrárias e Meio Ambiente:

DISTRIBUIÇÃO E RESISTÊNCIA ANTIMICROBIANA DE ESTAFILOCOCOS ISOLADOS DE QUATIS DE VIDA LIVRE EM MINAS GERAIS, BRASIL

De autoria de

Isabela Pádua Zanon, Clara Alcântara Lara de Mesquita, Giulia Said Oliveira, Isadora Maria Soares de Melo, Jordana Almeida Santana, Rafael Gariglio Clark Xavier, Rodrigo Otávio Silveira Silva



PRHISCYLLA SADANÃ PIRES

Gestora acadêmica de Ciências Agrárias e
Meio Ambiente do Ecossistema Ânima



GABRIEL ALMEIDA DUTRA

Coordenador Regional MG/GO de Ciências Agrárias
e Meio Ambiente do Ecossistema Ânima

CERTIFICADO DE MENÇÃO HONROSA

A Comissão Organizadora do Colóquio tem a grande satisfação de conferir este certificado de Menção Honrosa pelo brilhante resumo científico, apresentado no IX Colóquio Técnico Científico de Saúde Única, Ciências Agrárias e Meio Ambiente:

DISTRIBUIÇÃO E RESISTÊNCIA ANTIMICROBIANA DE ESTAFILOCOCOS ISOLADOS DE QUATIS DE VIDA LIVRE EM MINAS GERAIS, BRASIL

De autoria de

Isabela Pádua Zanon, Clara Alcântara Lara de Mesquita, Giulia Said Oliveira, Isadora Maria Soares de Melo, Jordana Almeida Santana, Rafael Gariglio Clark Xavier, Rodrigo Otávio Silveira Silva



PRHISCYLLA SADANÃ PIRES

Gestora acadêmica de Ciências Agrárias e Meio Ambiente do Ecossistema Ânima



GABRIEL ALMEIDA DUTRA

Coordenador Regional MG/GO de Ciências Agrárias e Meio Ambiente do Ecossistema Ânima