

UFRRJ
INSTITUTO DE VETERINÁRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS

DISSERTAÇÃO

**ANÁLISE DO PERFIL DE RESISTÊNCIA EM BACTÉRIAS
ISOLADAS DE ANIMAIS NECROPSIADOS NA
UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO**

Letícia Baptista Pinto

2022



UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE VETERINÁRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS

ANÁLISE DO PERFIL DE RESISTÊNCIA EM BACTÉRIAS
ISOLADAS DE ANIMAIS NECROPSIADOS NA
UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO

LETÍCIA BAPTISTA PINTO

Sob a Orientação da Professora
Miliane Moreira Soares de Souza

e Coorientação das Professoras
Dayanne Araújo de Melo
Marilene de Farias Brito

Dissertação submetida como
requisito parcial para obtenção do
grau de **Mestre em Ciências**, no
Curso de Pós-Graduação em Ciências
Veterinárias

Seropédica, RJ
Março de 2022

Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro
Biblioteca Central / Seção de Processamento Técnico

Ficha catalográfica elaborada
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

P659a Pinto, Letícia Baptista , 1986-
Análise do Perfil de Resistência em Bactérias
Isoladas de Animais Necropsiados na Universidade
Federal Rural do Rio de Janeiro / Letícia Baptista
Pinto. - Rio de Janeiro, 2022.
100 f.: il.

Orientadora: Miliane Moreira Soares de Souza.
Coorientadora: Dayanne Araújo de Melo .
Coorientadora: Marilene de Farias Brito.
Dissertação(Mestrado). -- Universidade Federal
Rural do Rio de Janeiro, Programa de Pós-Graduação em
Ciências Veterinárias, 2022.

1. Resistência Antimicrobiana. 2. Necropsia. 3.
Saúde Única. I. Souza, Miliane Moreira Soares de ,
1970-, orient. II. Melo , Dayanne Araújo de , 1987-,
coorient. III. Brito, Marilene de Farias , 1960-,
coorient. IV Universidade Federal Rural do Rio de
Janeiro. Programa de Pós-Graduação em Ciências
Veterinárias. V. Título.



ATA Nº 796 / 2022 - PPGCV (12.28.01.00.00.00.50)

Nº do Protocolo: 23083.017196/2022-18

Seropédica-RJ, 17 de março de 2022.

UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE VETERINÁRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS
LETÍCIA BAPTISTA PINTO

Dissertação submetida como requisito parcial para a obtenção do grau de **Mestra em Ciências**, no Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias.

DISSERTAÇÃO APROVADA EM 18/03/2021

Conforme deliberação número 001/2020 da PROPPG, de 30/06/2020, tendo em vista a implementação de trabalho remoto e durante a vigência do período de suspensão das atividades acadêmicas presenciais, em virtude das medidas adotadas para reduzir a propagação da pandemia de Covid-19, nas versões finais das teses e dissertações as assinaturas originais dos membros da banca examinadora poderão ser substituídas por documento(s) com assinaturas eletrônicas. Estas devem ser feitas na própria folha de assinaturas, através do SIPAC, ou do Sistema Eletrônico de Informações (SEI) e neste caso a folha com a assinatura deve constar como anexo ao final da dissertação.

(Assinado digitalmente em 18/03/2022 23:05)
MILIANE MOREIRA SOARES DE SOUZA
PRO-REITOR(A)
PROGEP (12.28.01.09)
Matrícula: 1212438

(Assinado digitalmente em 18/03/2022 17:16)
SHANA DE MATTOS DE OLIVEIRA COELHO
CHEFE DE DEPARTAMENTO - TITULAR
DMIV (12.28.01.00.00.00.54)
Matrícula: 1722406

(Assinado digitalmente em 18/03/2022 18:01)
ELEINE KUROKI ANZAI
ASSINANTE EXTERNO
CPF: 294.872.878-92

Para verificar a autenticidade deste documento entre em
<https://sipac.ufrrj.br/public/documentos/index.jsp> informando seu número: **796**, ano:
2022, tipo: **ATA**, data de emissão: **17/03/2022** e o código de verificação: **ea8e5ad9f6**

**“A gente só encanta quando se encanta.
Se eu não estiver encantado com o meu objeto de
conhecimento, eu não posso encantar o outro.”**

Mário Sérgio Cortella.

AGRADECIMENTOS

À minha mãe, Roselee Ribeiro da Rocha Baptista, pelo apoio, dedicação e amor incondicionais ao longo da vida, mesmo com todas as suas limitações de saúde. Expresso a minha profunda gratidão por me mostrar que a maior herança que se deixa a um filho é a educação e por todo incentivo e suporte aos meus estudos, desde sempre.

Ao Wanderson, meu amor, amigo e grande companheiro. Pela infinita paciência e ajuda, desde a inscrição no processo seletivo do mestrado. Por ter sido o meu porto seguro nessa jornada, a todo momento, a todo custo, sempre a me incentivar e fortalecer. Por acreditar no meu potencial e me ensinar tanto sobre a vida e sobre os nossos processos internos. Te amo!

À Prof^a Marilene de Farias Brito, que recebeu com muito respeito o meu desejo de ingressar no curso de mestrado e prontamente fez o contato para que uma orientação na minha área de interesse fosse construída. Saiba que aquele telefonema, na porta do antigo Museu Tokarnia, mudou os rumos da minha vida. Muito obrigada!

À Prof^a Miliane Moreira Soares de Souza, que me acolheu para a orientação neste trabalho e me mostrou ser possível alçar novos voos, mesmo em tempos difíceis. Obrigada pela oportunidade, pelos conselhos e pelas orações!

À minha coorientadora Prof^a Dayanne Araújo de Melo pelas sugestões no trabalho, pelo auxílio nos momentos de dúvidas, pelas revisões e correções em todos os textos que produzi no decorrer do curso, pelos cafés com carolina ao final de longos dias no laboratório e pela sua amizade.

À doutoranda do Laboratório de Bacteriologia Veterinária, Thérèse Holmström, pela parceria e companheirismo que transcenderam a pós-graduação, e também por me auxiliar em todas as análises, principalmente de biologia molecular. Você fez os dias melhores e mais leves, mesmo em meio ao cenário de medo e incertezas gerado pela pandemia. Muito obrigada, amiga!

Ao doutorando, Mario Makita, e às estagiárias, Luria Adib e Soraya Frias, do Laboratório de Bacteriologia Veterinária, pelo apoio, parceria e auxílio no desenvolvimento deste trabalho.

Aos residentes do Laboratório de Diagnóstico Microbiológico Veterinário, Marcela Barlette e Paulo Azevedo, pelo auxílio com os meios de cultura e coletas de sangue, e por toda ajuda com as leituras dos testes fenotípicos, principalmente aos finais de semana.

Aos residentes do Setor de Anatomia Patológica, Gabriela Oliveira, Karla Nascimento e Luis Antônio Tondo, pelo auxílio nas coletas de amostras.

Ao meu querido amigo Bartolomeu Neves, pelo enorme incentivo ao meu ingresso no curso de mestrado, me fazendo entender que era um movimento possível e enriquecedor. Por todos os cafés, vinhos e momentos de troca ao longo desses anos de UFRRJ. Por me acolher e me dar abrigo em Seropédica, na tentativa de minimizar o cansaço das longas horas diárias de deslocamento entre casa e trabalho. Muito obrigada, meu amigo, você é uma pessoa incrível!

Aos meus tios Gisela Baptista e Marco Antunes, por compreenderem minha ausência ao longo desses dois anos de intenso trabalho e por toda preocupação com a minha saúde física e mental. Eu amo muito vocês!

Às minhas queridas amigas Dayana Leite, Raquel Bodart e Rowena Coelho, pelas muitas conversas e conselhos, por todo apoio e incentivo. Dizem que amigos são irmãos que temos a possibilidade de escolher ao longo da vida e, pensando em vocês, tenho a certeza que fiz ótimas escolhas.

À Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, pela incrível oportunidade de ingressar neste curso de Pós-Graduação que me trouxe, além de muito conhecimento, novas perspectivas profissionais.

Aos docentes e demais funcionários associados ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias da UFRRJ, por toda dedicação, auxílio para a construção de novos conhecimentos e por toda a ajuda.

À Fundação Carlos Chagas Filho de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro (FAPERJ) pelo suporte financeiro que possibilitou o desenvolvimento desse trabalho.

O presente trabalho foi realizado com o apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001, agradeço o financiamento desta pesquisa.

A todos que contribuíram para a conclusão desta etapa, meus sinceros agradecimentos.

BIOGRAFIA

Letícia Baptista Pinto ingressou no curso de Ciências Biológicas da Universidade Gama Filho (UGF) no ano de 2006, diplomando-se em agosto de 2010. Durante a graduação, realizou estágio no Serviço de Imunoquímica e Histoquímica Professor Gerson Cotta-Pereira na 3ª Enfermaria da Santa Casa de Misericórdia do Rio de Janeiro, no período de abril a dezembro de 2006. Foi estagiária no Laboratório de Fisiologia Bacteriana do Instituto Oswaldo Cruz da Fiocruz, no período de 2008 a 2010, onde trabalhou com isolados ambientais do gênero *Bacillus* spp., sob a orientação do professor Dr. Leon Rabinovitch.

No ano de 2011, mudou-se para a cidade de Blumenau/SC e foi contratada para realização de exames de rotina em hematologia pelo Laboratório de Pesquisas Clínicas e Biológicas Santo Antônio. Em 2012, de volta ao Rio de Janeiro/RJ, realizou uma pós-graduação *latu sensu* em Microbiologia Clínica na FIJ, curso este sob coordenação do professor PhD. Robson de Souza Leão, com o qual adquiriu o grau de especialista após a defesa do projeto intitulado “Análise comparativa dos perfis bioquímico, fisiológico e de resistência a antimicrobianos de bactérias esporuladas aeróbias Gram-positivas isoladas a partir de amostras clínicas e de materiais coletados de praias localizadas na cidade do Rio de Janeiro.”, sob a orientação da professora PhD. Rachel Leite Ribeiro.

Em 2012, trabalhou com análises bioquímicas, imunológicas e microbiológicas em amostras de líquido cefalorraquidiano na Neurolife Laboratórios e foi contratada pela Fundação Saúde do Estado do Rio de Janeiro, onde trabalhou com análises clínicas de material biológico no Hospital Estadual Getúlio Vargas (HEGV) e no Hospital Estadual Eduardo Rabello (HEER) até maio de 2015. Também em 2012, tomou posse em cargo técnico na área de Biologia na Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (UFRRJ), onde encontra-se lotada, atualmente, no Laboratório de Bacteriologia Veterinária do Departamento de Microbiologia e Imunologia Veterinária.

Em 2014, tomou posse como docente em Ciências Biológicas na Secretaria de Educação do Estado do Rio de Janeiro (SEEDUC), na qual lecionou a referida disciplina para turmas do Ensino Fundamental II até 2016, quando solicitou exoneração para assumir o cargo de professor I de Ciências na Secretaria Municipal de Educação de Duque de Caxias, onde encontra-se atuante até o momento, trabalhando com a Educação de Jovens e Adultos.

Em 2020, foi aprovada no processo seletivo do Programa de Pós Graduação em Ciências Veterinárias, nível Mestrado, sob a orientação da professora PhD. Miliane Moreira Soares de Souza.

RESUMO

PINTO, Leticia Baptista. **Análise do Perfil de Resistência Antimicrobiana em Bactérias Isoladas de Animais Necropsiados na Universidade Federal Rural do Rio De Janeiro.** 100p. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias). Instituto de Veterinária, Departamento de Parasitologia Animal, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2022.

O surgimento e a disseminação da resistência aos antimicrobianos é uma das três principais ameaças à Saúde Pública no século XXI, e deve ser analisado em uma abordagem integrada de Saúde Única, por se tratar de um risco à saúde compartilhado por pessoas, animais e meio ambiente. Apesar da compreensão a respeito da origem multifatorial da resistência antimicrobiana, pouco se sabe sobre a contribuição dos ambientes voltados a produção, manutenção e cuidados de animais na disseminação desse fenômeno. Dentre estes, o espaço de necropsia representa um ponto de coesão, sendo um local de extrema relevância para pesquisa e compreensão da circulação da microbiota bacteriana e seus genes de resistência. O presente estudo avaliou a ocorrência de superbactérias em amostras de animais necropsiados na Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, considerando os critérios de prioridade estabelecidos pela Organização Mundial de Saúde (OMS). Das 198 amostras coletadas de 45 animais, sendo 20 animais de companhia, 20 de produção e 3 selvagens, foram isoladas 325 cepas, das quais 51,38% (167/325) foram Enterobacterales, 31,69% (103/325) *Staphylococcus* spp., 12,62% (41/325) *Enterococcus* spp., 2,46% (8/325) *Streptococcus* spp. e 1,85% (6/325) BGNNF. O MALDI-TOF mostrou-se uma ferramenta eficiente para identificação bacteriana, principalmente em *Enterococcus* spp. e Enterobacterales. A concordância entre as técnicas bioquímica, proteômica e genotípica na identificação de *Staphylococcus* spp. foi de 80,58%, o que confirma a importância da associação entre diferentes métodos diagnósticos para a caracterização nesse gênero, levando ao direcionamento correto da análise de resistência. 8,74% (9/103) dos *Staphylococcus* spp. apresentaram resistência fenotípica indicativa de produção de PBP2a, com detecção do gene *mecA* em todas as cepas. Em 29,13% (30/103) dos *Staphylococcus* spp. houve detecção do gene *blaZ*. Foi evidenciada resistência fenotípica à vancomicina em *E. faecalis*, com detecção do gene *vanB*. 11,98% (20/167) das enterobactérias apresentaram resistência aos beta-lactâmicos, mediada pela produção de ESBL, no antibiograma de triagem e 80% (16/20) delas foi positiva no teste confirmatório. A pesquisa dos genes que codificam ESBL revelou a presença de *bla_{SHV}* em 10,18% (17/167), *bla_{TEM}* em 6,59% (11/167) e *bla_{CTX-M-1}* em 4,19% (7/167). Não houve detecção de cepas produtoras de carbapenemases. Não foram detectados genes *mcr*. Esses resultados revelam a ocorrência de espécies caracterizadas como superbactérias críticas pela OMS em ambiente de necropsia e reforçam a necessidade de monitoramento dessas cepas no ambiente veterinário não apenas para a adoção de medidas de controle e tratamento adequados dos animais, mas também para a implementação de protocolos seguros para o descarte de suas carcaças.

Palavras-chave: resistência antimicrobiana, necropsia, Saúde Única.

ABSTRACT

PINTO, Leticia Baptista. **Analysis of the Antimicrobial Resistance Profile in Bacteria Isolated from Necropsied Animals at the Federal Rural University of Rio de Janeiro.** 100p. Dissertation (Masters in Veterinary Science). Veterinary Institute, Department of Animal Parasitology, Federal Rural University of Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2022.

The emergence and spread of antimicrobial resistance is one of the three main threats to Public Health in the 21st century and must be analyzed in an integrated One Health approach, as it is a health risk shared by people, animals and the environment. Despite understanding the multifactorial origin of antimicrobial resistance, little is known about the contribution of environments aimed at the production, maintenance and care of animals in disseminating this phenomenon. Among these, the necropsy space represents a point of cohesion, being a place of extreme relevance for research and understanding of the circulation of bacterial microbiota and its resistance genes. The present study evaluated the occurrence of superbugs in samples of animals necropsied at the Federal Rural University of Rio de Janeiro, considering the priority criteria established by the World Health Organization (WHO). Of the 198 samples collected from 45 animals, being 20 companion animals, 20 production animals, and three wild ones, 325 strains were isolated, of which 51,38% (167/325) were Enterobacterales, 31,69% (103/325) *Staphylococcus* spp., 12,62% (41/325) *Enterococcus* spp., 2,46% (8/325) *Streptococcus* spp. and 1,85% (6/325) BGNNF. MALDI-TOF proved to be an efficient tool for bacterial identification, especially in *Enterococcus* spp. and Enterobacterales. The agreement between biochemical, proteomic and genotypic techniques in identifying *Staphylococcus* spp. was 80,58%, which confirms the importance of the association between different diagnostic methods for the characterization of this genus, leading to the correct direction of the resistance analysis. 8,74% (9/103) of *Staphylococcus* spp. showed phenotypic resistance indicative of PBP2a production, with detection of the *mecA* gene in all strains. Phenotypic resistance to vancomycin was evidenced in *E. faecalis*, with detection of the *vanB* gene. In 29,13% (30/103) of *Staphylococcus* spp. there was detection of the *blaZ* gene. 11,98% (20/167) of enterobacteria showed resistance to beta-lactams, mediated by the ESBL production, in the screening antibiogram and 80% (16/20) of them were positive in the confirmatory test. The search for genes encoding ESBL revealed the presence of *bla_{SHV}* in 10,18% (17/167), *bla_{TEM}* in 6,59% (11/167) and *bla_{CTX-M-1}* in 4,19% (7/167). There was no detection of carbapenemase-producing strains. No *mcr* genes were detected. These results reveal species characterized as critical superbugs in the necropsy environment and reinforce the need to monitor these strains in the veterinary environment, not only for the adoption of adequate control and treatment measures for the animals but also for the implementation of safe protocols for the disposal of their carcasses.

Keywords: antimicrobial resistance, necropsy, One Health.

LISTA DE ABREVIACÕES

A.BHI	Ágar Infuso Cérebro Coração
A.MC	Ágar MacConkey
A.MH	Ágar Müeller-Hinton
AMR	Resistência antimicrobiana
A.MVF	Ágar Manitol Vermelho de Fenol
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
A.SIM	Meio Ágar Sulfeto Indol Motilidade
A.SS	Ágar Salmonella Shigella
A.TSI	Ágar Três-Açúcar-Ferro
BGN	Bastonetes Gram-negativos
BGNMF	Bastonetes Gram-negativos Não Fermentadores
C.BHI	Caldo Infuso Cérebro Coração
CIM	Concentração Inibitória Mínima
CDC	Centros de Controle e Prevenção de Doenças dos Estados Unidos
CLSI	<i>Clinical and Laboratory Standards Institute</i>
C.MR-VP	Caldo Vermelho de Metila - Voges-Proskauer
CONAMA	Conselho Nacional do Meio Ambiente
SCN	<i>Staphylococcus</i> spp. Coagulase-Negativo
SCNRM	<i>Staphylococcus</i> spp. Coagulase-Negativo resistente à meticilina
SCP	<i>Staphylococcus</i> spp. Coagulase-Positivo
ESBL	Beta-lactamase de Espectro Estendido
EUA	Estados Unidos da América
FAO	Organização das Nações Unidas para Alimentação e Agricultura
LabacVet	Laboratório de Bacteriologia Veterinária
µg	Microgramas
mL	Mililitros
µL	Microlitros
MRSA	<i>Staphylococcus aureus</i> Resistente à Meticilina
NAM	Ácido N-Acilmurâmico
OIE	Organização Mundial da Saúde Animal
OMS	Organização Mundial de Saúde

PBP	Proteína ligante de penicilina
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase
RAM	Resistência Antimicrobiana
SAP	Setor de Anatomia Patológica
UI	Unidades internacionais
UFRJ	Universidade Federal do Rio de Janeiro
UFRRJ	Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro
UNEP	Programa das Nações Unidas para o Meio Ambiente
UNIFESP	Universidade Federal de São Paulo
VM	Vermelho de Metila
VP	Voges-Proskauer
VRSA	<i>Staphylococcus aureus</i> Resistente à Vancomicina
°C	graus Celsius

ÍNDICE DE FIGURAS

	Pág.
Figura 1. Lista de prioridades com relação às bactérias patogênicas resistentes a antimicrobianos (WHO, 2017c).	8
Figura 2. Animais cujas amostras foram coletadas durante o exame de necropsia. Coleta de conduto nasal direito de bovino com auxílio de swab estéril (A). Feto de bovino de seis meses de idade gestacional (B). Cão da raça Chow-chow com lesão na região do focinho (C). Vista dorsal de <i>Lithobates catesbeianus</i> – rã touro (D1). Vista ventral de rã touro com incisão abdominal e exposição de vísceras no momento do exame de necropsia (D2). <i>Puma concolor</i> – onça parda – vítima de atropelamento no município de Paracambi/RJ em exame macroscópico de carcaça que antecede o procedimento de necropsia (E). Sala de necropsia: equino com incisão abdominal ao chão e análise de material em mesa cirúrgica por alunos do curso de Medicina Veterinária da UFRRJ em aula de Anatomia Patológica Especial ministrada pela professora Dra. Marilene de Farias Brito (F).	17
Figura 3. Fluxograma com a definição dos sítios de coleta de amostras por espécie animal.	18
Figura 4. Fluxograma de identificação fenotípica de cepas do gênero <i>Staphylococcus</i> spp.	22
Figura 5. Fluxograma de identificação fenotípica de cepas dos gêneros <i>Streptococcus</i> spp. e <i>Enterococcus</i> spp.	23
Figura 6. Provas de identificação fenotípica de bastonetes Gram-negativos da ordem Enterobacterales.	24
Figura 7. Preparo de suspensão de colônias bacterianas em solução salina com turbidez equivalente a 0,5 da escala McFarland (A). Semeadura dos isolados e inclusão dos discos impregnados com os antimicrobianos (B). Anotações da leitura de halos de inibição de crescimento bacteriano ao redor dos discos realizadas com o auxílio de uma régua (C). Fonte: Arquivo pessoal.	27

	Pág.
Figura 8. Interpretação de teste de difusão em disco para avaliação da resistência à penicilina através da produção de beta-lactamases. Teste de <i>zona edge</i> positivo – margem delimitada do halo de inibição indica a produção de beta-lactamase (A). Teste de <i>zona edge</i> negativo – margem difusa indica que não há produção de beta-lactamase (B). Fonte: CLSI (2021).	28
Figura 9. Percentual de isolados bacterianos definido a partir da identificação fenotípica.	37
Figura 10. Frequência de isolados de cada grupo bacteriano a partir de amostras de animais de produção, companhia e s definidos após identificação fenotípica.	38
Figura 11. Gráfico apresentando percentual de resistência detectado nas cepas da Ordem Enterobacterales frente as diferentes classes de beta-lactâmicos testados.	60
Figura 12. Resultado de teste de triagem para avaliação da resistência aos beta-lactâmicos mediada pela expressão de ESBL: evidenciação de halos de resistência aos antimicrobianos CAZ, CPM e ATM em <i>E. cloacae</i> (A). Resultado positivo de teste confirmatório para avaliação da resistência aos beta-lactâmicos mediada por ESBL devido ao aumento do halo de sensibilidade aos antimicrobianos na presença de ácido clavulânico tanto em CAZ quanto em CTX (B). Abreviações: AMC, amoxicilina + ácido clavulânico; AMP, ampicilina; ATM, aztreonam; CAZ, ceftazidima; CCA, ceftazidima + ácido clavulânico; CCT, cefotaxima + ácido clavulânico; CPM, cefepima; CTX, cefotaxima; IMP, imipenem. CLSI VET08 (2020); CLSI (2021). Fonte: Arquivo pessoal.	62

ÍNDICE DE QUADROS

	Pág.
Quadro 1. Critério interpretativo adotado para identificação fenotípica de BGNs da Ordem Enterobacterales	25
Quadro 2. Critério interpretativo para avaliação dos halos de sensibilidade aos beta-lactâmicos testados em <i>Staphylococcus</i> spp.	28
Quadro 3. Critério interpretativo para avaliação dos halos de sensibilidade aos antimicrobianos testados em <i>Enterococcus</i> spp. e <i>Streptococcus</i> spp.	29
Quadro 4. Critério interpretativo para avaliação dos halos de sensibilidade aos antimicrobianos testados em bastonetes Gram-negativos	30
Quadro 5. Iniciadores e ciclos empregados para amplificação dos genes de identificação do gênero <i>Staphylococcus</i> spp. e de espécies de SCP	32
Quadro 6. Iniciadores e ciclos empregados para amplificação dos genes de resistência aos beta-lactâmicos em <i>Staphylococcus</i> spp.	32
Quadro 7. Iniciadores e ciclos empregados para amplificação dos genes de resistência à vancomicina em <i>Staphylococcus</i> spp.	33
Quadro 8. Iniciadores e ciclos empregados para amplificação dos genes de identificação de <i>Enterococcus</i> spp.	33
Quadro 9. Iniciadores e ciclos empregados para amplificação dos genes de resistência à vancomicina em <i>Enterococcus</i> spp.	34
Quadro 10. Iniciadores e ciclo empregado para amplificação dos genes 16S <i>rDNA</i> bacteriano para isolados da Ordem Enterobacterales	34
Quadro 11. Iniciadores e ciclos empregados para amplificação dos genes de resistência aos beta-lactâmicos que codificam enzimas do tipo ESBL	35

	Pág.
Quadro 12. Iniciadores e ciclo empregado para amplificação dos genes de resistência aos beta-lactâmicos que codificam enzimas do tipo carbapenemase	35
Quadro 13. Iniciadores e ciclos empregados para amplificação dos genes de resistência à colistina	36

ÍNDICE DE TABELAS

	Pág.
Tabela 1. Relação do grupo animal, das espécies animais necropsiadas e das amostras coletadas por cada sítio	18
Tabela 2. Relação dos isolados bacterianos por grupo animal após análise dos resultados de identificação por bioquimismo, proteômica e genotípica	39
Tabela 3. Comparativo dos resultados das identificações fenotípica, proteômica e genotípica das 30 cepas de <i>Staphylococcus</i> spp. coagulase-positivas em pelo menos uma das técnicas de identificação	43
Tabela 4. Resultados da identificação proteômica das cepas de <i>Streptococcus</i> spp.	45
Tabela 5. Resultados da identificação proteômica e genotípica das cepas de <i>Enterococcus</i> spp.	46
Tabela 6. Perfil da identificação fenotípica e proteômica dos isolados da Ordem Enterobacterales	49
Tabela 7. Perfil da identificação fenotípica e proteômica dos isolados de BGNNF	51
Tabela 8. Perfil da análise fenogenotípica da resistência antimicrobiana	57
Tabela 9. Perfil da análise fenogenotípica da resistência à penicilina e vancomicina	59
Tabela 10. Análise da resistência fenogenotípica aos beta-lactâmicos por produção de ESBL em cepas da Ordem Enterobacterales	66

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	1
2 REVISÃO DE LITERATURA	3
2.1 Saúde Única: Ações unificadas para promoção de saúde.....	3
2.2 Resistência antimicrobiana: origem, evolução e perspectivas.....	4
2.3 Cenários da resistência antimicrobiana em animais	9
2.4 A importância do estudo da Resistência Antimicrobiana (RAM) no ambiente de necropsia	12
3 OBJETIVOS.....	15
3.1 Objetivo Geral.....	15
3.2 Objetivos Específicos	15
4 MATERIAIS E MÉTODOS.....	16
4.1 Amostragem.....	16
4.2 Isolamento e Identificação Fenotípica dos Isolados Bacterianos	20
4.2.1 <i>Staphylococcus</i> spp.	21
4.2.2 <i>Streptococcus</i> spp. e <i>Enterococcus</i> spp.....	23
4.2.3 Bastonetes Gram-negativos (BGN).....	24
4.3 Identificação por Espectrometria de Massa com Ionização por Dessorção a Laser Assistida por Matriz e analisador de Tempo de Voo (MALDI-TOF MS)	26
4.4 Análises Fenotípicas de Resistência a Antimicrobianos.....	26
4.4.1 Preparo do inóculo e execução do teste de difusão em disco.....	26
4.4.2 Avaliação da resistência aos beta-lactâmicos por alteração de PBPs e por produção de beta-lactamases em <i>Staphylococcus</i> spp.	27
4.4.3 Avaliação da resistência à penicilina em <i>Streptococcus</i> spp. e à vancomicina em <i>Enterococcus</i> spp.....	28
4.4.4 Pesquisa de beta-lactamases de espectro estendido (ESBL) e de carbapenemases em bastonetes Gram-negativos (BGN)	29
4.5 Análises genotípicas de identificação e resistência a antimicrobianos.....	30
4.5.1 Extração de DNA	30
4.5.2 Preparo de reação para detecção dos genes por PCR (Reação em Cadeia da Polimerase).....	31
4.5.3 <i>Staphylococcus</i> spp.	31
4.5.3.1 Identificação genotípica de <i>Staphylococcus</i> spp.	31
4.5.3.2 Caracterização da resistência genotípica de <i>Staphylococcus</i> spp. aos beta-lactâmicos	32
4.5.4 <i>Enterococcus</i> spp.....	33
4.5.4.1 Identificação genotípica de <i>Enterococcus</i> spp.....	33

4.5.4.2	Caracterização da resistência genotípica de <i>Enterococcus</i> spp. à vancomicina	33
4.5.5	Bastonetes Gram-negativos (BGN)	34
4.5.5.1	Caracterização da resistência genotípica aos beta-lactâmicos	34
4.5.5.1.1	Pesquisa de beta-lactamase de espectro estendido (ESBL)	34
4.5.5.1.2	Pesquisa de beta-lactamase do tipo carbapenemase	35
4.5.5.2	Caracterização da resistência genotípica à colistina	36
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	37
5.1	Isolamento e identificação fenogenotípica de espécimes bacterianos	37
5.1.1	<i>Staphylococcus</i> spp.	40
5.1.2	<i>Streptococcus</i> spp. e <i>Enterococcus</i> spp.	44
5.1.3	Bastonetes Gram-negativos	47
5.1.3.1	Ordem Enterobacterales	47
5.1.3.2	BGNMF	50
5.2	Caracterização da resistência fenogenotípica em <i>Staphylococcus</i> spp.	52
5.2.1	Resistência aos beta-lactâmicos em <i>Staphylococcus</i> spp.	52
5.2.2	Resistência de <i>Staphylococcus</i> spp. à vancomicina	56
5.3	Caracterização da resistência fenotípica à penicilina em <i>Streptococcus</i> spp.	58
5.4	Caracterização da resistência fenogenotípica à vancomicina em <i>Enterococcus</i> spp.	58
5.5	Caracterização da resistência fenogenotípica aos beta-lactâmicos em BGNs	60
5.6	Pesquisa de genes de resistência à colistina em BGNs	67
6	CONCLUSÃO	68
7	PERSPECTIVAS FUTURAS	70
8	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	71

1 INTRODUÇÃO

A resistência bacteriana aos agentes antimicrobianos representa um grave problema à saúde coletiva, dificultando o tratamento de infecções causadas por bactérias multirresistentes com os antimicrobianos atualmente disponíveis, o que ameaça os protocolos de manejo de doenças infecciosas já estabelecidos.

Apesar da compreensão geral a respeito da origem multifatorial do atual cenário de resistência antimicrobiana, pouco se sabe sobre a contribuição dos ambientes voltados a produção, manutenção e cuidados hospitalares de animais para a circulação dos genes e consequente disseminação da resistência. Embora estudos apontem o ambiente hospitalar como o principal reservatório dos genes de resistência de bactérias que colonizam e infectam humanos, é sabido que o ambiente comunitário contribui para o estabelecimento e manutenção de um conjunto importante e diversificado de genes de resistência, e neste a interação com animais de diferentes espécies é uma realidade cada vez mais presente.

Ao longo dos anos, a mudança ocorrida na relação entre os seres humanos e seus animais de companhia também alterou a percepção a respeito dos cuidados a serem adotados para garantir seu bem-estar físico, com crescente utilização de fármacos incluindo agentes antimicrobianos, na prática clínica veterinária. Muitos desses antimicrobianos também são de uso terapêutico humano. Associado a este aspecto, o uso de antimicrobianos em níveis terapêuticos, para cuidados de saúde, ou sub-terapêuticos, como promotores de crescimento na produção animal, também influenciam o aumento da resistência antimicrobiana devido ao exercício de uma pressão de seleção que pode favorecer a sobrevivência de cepas resistentes sobre cepas suscetíveis. Dessa forma, o estudo da contribuição dos diversos ambientes relacionados a animais para a aceleração da evolução da resistência antimicrobiana é uma área emergente e crítica, necessária para a compreensão do seu desenvolvimento e como modelo de disseminação dos genes de resistência entre as bactérias ali circulantes.

Análises *post mortem* permitem monitorar a diversidade bacteriana e o perfil de resistência em diferentes espécies animais, não apenas para fins de diagnóstico, mas sobretudo para a compreensão da circulação da microbiota bacteriana e seus genes de resistência. Além disso, pesquisas no ambiente de necropsia contribuem para a compreensão a respeito do impacto ambiental, uma vez que existe a necessidade cada vez maior de adoção de medidas seguras para o descarte das carcaças. É possível considerar a conexão entre pessoas, animais e ambiente na disseminação da resistência antimicrobiana dentro do conceito "Saúde Única", e

buscar subsídios para o estabelecimento de abordagens integradas focadas na redução da pressão de seleção e interrupção dos ciclos de transmissão de microrganismos resistentes.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Saúde Única: Ações unificadas para promoção de saúde

Saúde Única é um conceito cientificamente estabelecido e validado, de grande importância social, que emergiu do estudo integrado de zoonoses pelas Medicinas Humana e Veterinária (BRESALIER *et al.*, 2015). Entretanto, a colaboração entre essas duas esferas ainda não tem ocorrido de forma efetiva ao longo dos anos, por uma série de razões políticas e institucionais (KINGSLEY & TAYLOR, 2017).

Atlas (2012) destaca a relevância do Simpósio “One World, One Health”, realizado em setembro de 2004 na cidade de Nova York, como um marco para a retomada e ascensão do conceito de Saúde Única. Este evento discutiu episódios potenciais de doenças entre as populações humanas e de animais à época de sua realização. Os especialistas concluíram, a partir de estudos de casos sobre Ebola, Influenza Aviária, dentre outras doenças infecciosas, que apenas quebrando as barreiras entre agências, indivíduos, especialidades e setores seria possível promover as ações inovadoras necessárias para o enfrentamento aos inúmeros desafios que colocam em risco a saúde humana, de animais domésticos e selvagens, bem como a integridade dos ecossistemas (ATLAS, 2012).

A Organização Mundial de Saúde (OMS) define Saúde Única como uma abordagem para elaboração e implementação de programas, políticas, legislações e pesquisas com comunicação entre múltiplas áreas e setores que trabalham de forma integrada a fim de alcançar melhores resultados na saúde pública. Esta abordagem está fundamentada em princípios como interdisciplinaridade, colaboração e comunicação (WHO, 2017a).

O Painel de Especialistas de Alto Nível em Saúde Única – formado por profissionais da OMS, Organização Mundial da Saúde Animal (OIE), Organização das Nações Unidas para Alimentação e Agricultura (FAO) e do Programa das Nações Unidas para o Meio Ambiente (UNEP) – afirma que Saúde Única consiste em uma abordagem integrada e unificadora que visa equilibrar e otimizar de forma sustentável a saúde de pessoas, animais e ecossistemas. Ele reconhece que a saúde de seres humanos, animais domésticos e selvagens, plantas e o ambiente, em um sentido mais amplo que inclui ecossistemas, são intimamente ligados e interdependentes (WHO, 2021).

O Departamento de Saúde e Serviços Humanos dos EUA, através de seus Centros de Controle e Prevenção de Doenças (CDC), estabelece uma visão similar acerca do conceito de Saúde Única, incorporando ainda uma perspectiva de diferentes níveis de escala em sua

abordagem. Para o presente trabalho, este é o conceito mais pertinente e que será adotado como referência:

“Saúde Única é uma abordagem colaborativa, multissetorial e transdisciplinar – trabalhando nos níveis local, regional, nacional e global – com o objetivo de alcançar resultados positivos de saúde, reconhecendo a interconexão entre pessoas, animais, plantas e seu ambiente compartilhado.” (CDC, 2018)

No contexto de um mundo globalizado, que resulta em maior integração entre diferentes sociedades, promovida pelo advento dos meios de transportes e comunicação modernos, a Saúde Única ganha importância ainda maior no tratamento de questões relacionadas à saúde pública, que transitam entre as escalas local e global. Ao abordar o conceito de Saúde Única, à luz dos desafios atuais relacionados à saúde pública, a OIE destaca que a pandemia de COVID-19 – uma crise de saúde pública humana, potencialmente resultante de um vírus de origem animal – reforça a legitimidade de ações integradas, reconhecendo a interconexão entre pessoas, animais, plantas e o ambiente que compartilham, para o enfrentamento aos riscos à saúde global. (OIE, 2021).

Muitas são as temáticas que devem ser trabalhadas numa abordagem integrada de Saúde Única, envolvendo a colaboração de múltiplas áreas, por se tratar de ameaças à Saúde compartilhada por pessoas e animais, além de representarem risco em potencial ao meio ambiente. O CDC (2018) lista oito temas principais, dos quais quatro encontram-se intimamente relacionados à Medicina Veterinária, são eles: doenças zoonóticas, doenças transmitidas por vetores, segurança alimentar e, por fim, o tema tratado neste estudo: resistência antimicrobiana.

2.2 Resistência antimicrobiana: origem, evolução e perspectivas

A resistência bacteriana aos agentes antimicrobianos representa um grave problema à saúde coletiva, dificultando o tratamento de infecções causadas por bactérias multirresistentes com os antimicrobianos disponíveis atualmente, o que ameaça os protocolos de manejo de doenças infecciosas já estabelecidos (NESME *et al.*, 2014).

Segundo ALÓS (2015), observa-se maior morbidade, mortalidade e custo no tratamento de infecções causadas por bactérias resistentes aos antibióticos do que por bactérias sensíveis de uma mesma espécie. Desta forma, o surgimento e a disseminação de bactérias resistentes aos antimicrobianos foram classificados pelos principais órgãos reguladores, econômicos e políticos mundiais, incluindo a OMS, o CDC, o Fundo Monetário Internacional (FMI), o Banco

Mundial e o G-8, como um dos maiores desafios para a saúde global do século XXI (ALÓS, 2015; HERNANDO-AMADO *et al.*, 2019).

A resistência antimicrobiana é um fenômeno que acontece quando a bactéria possui, ou desenvolve, a capacidade de evadir os mecanismos de ação de compostos antimicrobianos, mantendo-se viável, ainda que na presença dos mesmos (CHRISTAKI *et al.*, 2020). Para compreender a origem dessa resistência é preciso considerar que o seu surgimento ocorre naturalmente, como uma resposta evolutiva da exposição bacteriana aos agentes antimicrobianos (MEDINA *et al.*, 2020).

A constante interação entre os microrganismos, como bactérias e fungos, nos mais diversos ambientes e no decorrer de milhares de anos, levou ao desenvolvimento de mecanismos que possibilitassem sua sobrevivência em meio a compostos tóxicos, por eles produzidos como uma estratégia de competição interespecífica. Esses agentes tóxicos foram descobertos pelo homem e utilizados no desenvolvimento da maioria dos antimicrobianos disponíveis atualmente. Entre outros fatores, o uso indiscriminado destes fármacos pelas Medicinas Humana e Veterinária levou ao aumento da pressão de seleção de bactérias resistentes, acelerando o surgimento e a disseminação da resistência antimicrobiana (COURVALIN, 2008).

Bhullar *et al.* (2012) relataram o isolamento de bactérias multirresistentes a partir de amostras de uma caverna, localizada no Novo México, isolada há mais de quatro milhões de anos. Nesse estudo foi detectada resistência a diversas classes de antibióticos, incluindo a daptomicina, um antimicrobiano lipopeptídico indicado para o tratamento de infecções causadas por patógenos Gram-positivos resistentes (ANVISA, 2007). Também foram isoladas cepas bacterianas que apresentaram resistência a quatorze antimicrobianos diferentes, todos disponíveis comercialmente nos dias de hoje. Tais achados apoiam o crescente entendimento de que a resistência antimicrobiana é um fenômeno antigo, natural e que faz parte do processo de evolução dos microrganismos em geral.

Fatores complexos e interligados estão aumentando a prevalência de microrganismos resistentes a antimicrobianos, decorrentes principalmente do uso em seres humanos, na agropecuária e da poluição do meio ambiente (HOLMES *et al.*, 2015). Além da prescrição, dispensação e utilização indiscriminadas de antimicrobianos em populações humanas e animais, a liberação de resíduos contendo compostos ativos de antibióticos pela indústria farmacêutica e o escoamento de fazendas e dejetos comunitários humanos em cursos d'água

proporcionam um ambiente com elevada pressão de seleção para bactérias resistentes (RUTGERSSON *et al.*, 2014; LARSSON *et al.*, 2007; FICK *et al.*, 2009).

Em estudo de solos realizado em território holandês com amostras abrangendo o período de 1940 à 2008, Knapp *et al.* (2010) relataram um aumento significativo na presença de genes de resistência aos beta-lactâmicos, macrolídeos e, principalmente, à tetraciclina, que se apresentou 15 vezes mais abundante à época (2008) do que entre 1940 e 1970, período em que os antimicrobianos começaram a ser utilizados tanto na prática clínica quanto na agricultura. De modo geral, a utilização desses fármacos de maneira desregrada ao longo dos anos favoreceu a proliferação e manutenção de microrganismos resistentes nos solos. Somado a isso, a capacidade de troca horizontal de material genético acaba por acelerar o aparecimento de bactérias resistentes a antimicrobianos também em patógenos humanos (SMITH *et al.*, 2002), demonstrando total integração entre os ambientes humano, animal e os ecossistemas nos quais estão inseridos.

A transmissão de genes de resistência pode ocorrer de forma vertical, quando a bactéria sofre divisão celular, ou horizontal, quando o material genético é compartilhado através de conjugação, transformação ou transdução – fenômenos esses que podem ocorrer de forma intra ou interespecífica, incluindo a troca entre bactérias ambientais, comensais e patogênicas de humanos e de animais (AMÁBILE-CUEVAS, 2010).

A globalização e o conseqüente aumento na frequência e velocidade das viagens aumenta a preocupação com a dispersão de microrganismos resistentes, pois esses podem ser carregados por seres humano, animais ou até mesmo por produtos, comercializados de um lado a outro do globo em questão de horas. A resistência antimicrobiana é, portanto, um problema coletivo de Saúde Única, que requer atenção, cuidado e vigilância mundiais, onde quer que seja detectada pela primeira vez (SO *et al.*, 2010).

A dinâmica da resistência aos antimicrobianos pode ser compreendida com um breve relato que tem início em 1928, quando Alexander Fleming descobriu a penicilina (BENNETT & CHUNG, 2001). Esse antibiótico, um dos primeiros fármacos amplamente disponíveis, teve sua produção em larga escala logo no início da década de 1940 e tinha elevada eficácia no tratamento de infecções causadas por diversos patógenos bacterianos, inclusive *Staphylococcus aureus*. Em meados da década de 1940, foi descrito o primeiro relato de *S. aureus* produtor de penicilinase, uma enzima codificada pelo gene *blaZ* que confere a capacidade da bactéria hidrolisar o anel beta-lactâmico de modo a inativar a penicilina (OLSEN *et al.*, 2006), e uma pandemia por esse agente foi relatada no início dos anos 50. No final da década de 1950, foi

introduzida a meticilina – um beta-lactâmico semissintético, resistente às penicilinases – como alternativa terapêutica para infecções causadas por *S. aureus* resistente à penicilina. Entretanto, cepas de *S. aureus* resistentes à meticilina (MRSA) – por apresentarem o gene *mecA* que codifica uma proteína ligante de penicilina com baixa afinidade – foram isoladas dois anos após o início da utilização desse antimicrobiano na prática clínica e o primeiro surto por MRSA foi relatado, nos EUA, no final da década de 1960 (TAUBES *et al.*, 2008; MCGUINNESS *et al.*, 2017). Sendo assim, o tratamento de MRSA ficou restrito a outra classe de antimicrobianos, os glicopeptídeos, mas já existem relatos de *S. aureus* resistente à vancomicina (VRSA) desde 2002 (CHANG *et al.*, 2003).

Pesquisas demonstram que qualquer exposição bacteriana a antibióticos pode ocasionar uma seleção de resistência. Esta pressão seletiva e o desequilíbrio subsequente, devido a morte de microrganismos sensíveis, permitem que bactérias com resistência intrínseca ou recém adquirida, sobrevivam e proliferem (HOLMES *et al.*, 2015). Desta forma, o monitoramento da suscetibilidade antimicrobiana desempenha papel importante no auxílio a escolha da antibioticoterapia adequada, tanto em Medicina Humana quanto em Veterinária, garantindo assim a eficácia a longo prazo dos agentes antimicrobianos disponíveis no mercado (MOYAERT *et al.*, 2019).

O'Neill (2016) estimou um aumento no índice de 700.000 mortes anuais por processos infecciosos intratáveis, para 10 milhões, em 2050. Esse aumento se refletirá não apenas em questões sanitárias, mas também acarretará perdas financeiras elevadas ao longo desse período. T tamanha relevância do tema levou a OMS a publicar, em 2017, uma lista de 12 patógenos prioritários com resistência a antimicrobianos, de modo a separar em três categorias dependendo do nível de urgência em pesquisas e desenvolvimento de novos fármacos para a sua contenção. O grupo mais crítico inclui *Acinetobacter baumannii* e *Pseudomonas aeruginosa* resistentes aos carbapenemas e bactérias da Ordem Enterobacterales produtoras de ESBL e de carbapenemases. Tais bactérias tornaram-se resistentes a vários antimicrobianos, incluindo os carbapenêmicos e cefalosporinas de terceira geração, melhores opções terapêuticas disponíveis para o tratamento de bactérias multirresistentes (WHO, 2017b; WHO, 2017c). Os demais representantes dessa lista encontram-se na Figura 1.

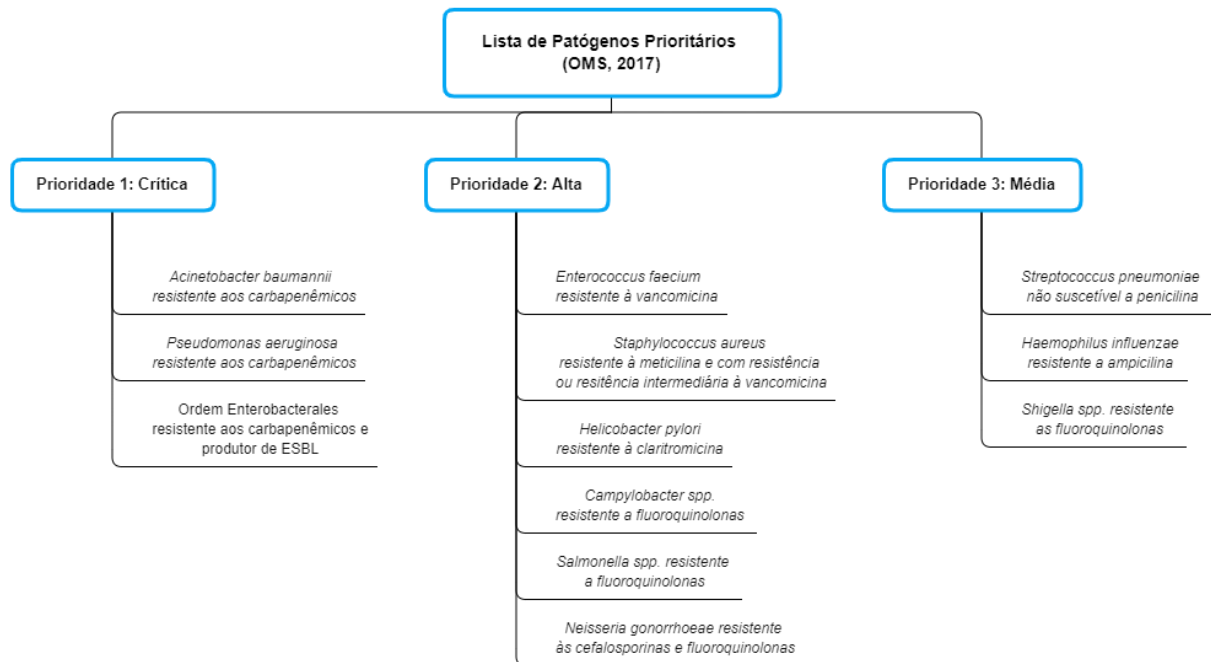


Figura 1: Lista de prioridades com relação às bactérias patogênicas resistentes a antimicrobianos (WHO, 2017c)

Desde a descoberta e utilização dos antibióticos em larga escala, tem-se observado que bactérias patogênicas para seres humanos e animais evoluíram para a resistência e, em muitos casos, para a multirresistência, quando se mostram resistentes a três ou mais classes de antimicrobianos (COURVALIN, 2008; MAGIORAKOS *et al.*, 2012). Em contraste com essa contínua evolução da resistência bacteriana, o número de novos antimicrobianos desenvolvidos nos últimos anos, principalmente aqueles com ação contra bactérias Gram-negativas, foi muito limitado, levando a uma diminuição considerável das opções terapêuticas para o tratamento de infecções mais graves (ALVARADO *et al.*, 2020).

A situação é tão preocupante que, em 2019, a OMS desenvolveu um sistema que classifica os fármacos antibacterianos em três grupos, são eles: ‘Acesso’, ‘Vigilância’ e ‘Reserva’, especificando quais devem ser utilizados no caso de infecções mais comuns (grupo acesso) e aqueles que devem ser administrados apenas como último recurso terapêutico (grupo reserva). A iniciativa teve como objetivo reduzir o uso global dos antimicrobianos das categorias Vigilância e Reserva, que contemplam fármacos com amplo espectro de ação e que, portanto, possuem maior risco de desenvolvimento de resistência, além de serem representantes importantes para o tratamento de algumas infecções ocasionadas por bactérias multirresistentes (WHO, 2019). No cenário atual, a utilização responsável dos antimicrobianos de última geração é a opção mais assertiva para garantir a possibilidade de tratamento de infecções graves.

Tamanha relevância do tema, em 2018, foi desenvolvido um Plano de Ação Nacional para Prevenção e Controle da Resistência aos Antimicrobianos no Âmbito da Saúde Única (PAN-BR). Este documento foi elaborado em convergência com os objetivos definidos pela aliança tripartite entre a Organização Mundial de Saúde (OMS), a Organização das Nações Unidas para a Alimentação e a Agricultura (FAO) e a Organização Mundial de Saúde Animal (OIE) e apresentado no Plano de Ação Global sobre Resistência aos Antimicrobianos. O objetivo geral dos planos de ação é garantir que se mantenha a capacidade de tratar e prevenir doenças infecciosas com medicamentos seguros e eficazes, de qualidade assegurada e que sejam utilizados de forma responsável e acessível para todos os que necessitem. O PAN-BR tem vigência de cinco anos, de 2018 a 2022, e contém 14 objetivos principais, 33 intervenções estratégicas e 75 atividades, alinhados aos 5 objetivos estratégicos do Plano de Ação Global (PAN-BR, 2019).

2.3 Cenários da resistência antimicrobiana em animais

Ao longo dos anos, a mudança ocorrida na relação entre os seres humanos e seus animais de companhia também alterou a percepção a respeito dos cuidados a serem adotados para garantir seu bem-estar físico, com crescente utilização de fármacos incluindo agentes antimicrobianos, na prática clínica veterinária. Muitos desses antimicrobianos também são de uso terapêutico humano. Associado a este aspecto, o uso de antimicrobianos em níveis terapêuticos, para cuidados de saúde, ou sub-terapêuticos, como promotores de crescimento na produção animal, também influenciam o aumento da resistência antimicrobiana devido ao exercício de uma pressão de seleção que pode favorecer a sobrevivência de cepas resistentes sobre cepas suscetíveis (GUARDABASSI *et al.*, 2004).

As classes de antimicrobianos mais utilizadas em Medicina Veterinária para o tratamento de infecções em animais de companhia são as penicilinas, cefalosporinas, macrolídeos, lincosamidas, tetraciclina, cloranfenicol, sulfonamidas, aminoglicosídeos e fluoroquinolonas (SYKES, 2013). Os antibacterianos de escolha para uso em animais de companhia vão desde a enrofloxacina, uma fluoroquinolona de uso veterinário, até fármacos de extrema relevância para o tratamento de infecções complicadas em seres humanos, tais como vancomicina e imipenema (PRESCOTT *et al.*, 2002).

A atual proximidade entre tutores e seus animais oferece condições favoráveis para a transmissão bacteriana entre eles, seja por via direta, durante carícias, lambidas e acidentes envolvendo feridas, ou indireta, através do ambiente que compartilham. Esse cenário possibilita

a transferência horizontal de genes de resistência. Sendo assim, bactérias humanas transmitidas aos animais podem adquirir genes de resistência da microbiota desses animais e, além disso, podem ser selecionadas através de antibioticoterapia prescrita pelo médico veterinário. É importante perceber que, mesmo no caso de transmissão de humano para animal, os animais contribuem para a propagação de bactérias com resistência adquirida através da eliminação fecal, aumentando sua disseminação tanto na população humana quanto no meio ambiente (GUARDABASSI *et al.*, 2004).

A dinâmica de utilização de antimicrobianos na atividade agropecuária também é algo preocupante. O Brasil é um dos principais exportadores de proteína animal do mundo, e esse patamar exige a adoção de medidas profiláticas e de controle de doenças infecciosas. O uso de antimicrobianos em níveis terapêuticos, para cuidados de saúde, ou sub-terapêuticos, como promotores de crescimento na produção animal exerce uma maior pressão de seleção influenciando o aumento da resistência antimicrobiana. Tal fenômeno ocorre pelo favorecimento da sobrevivência de cepas resistentes sobre cepas suscetíveis e ampliação da disseminação de genes de resistência (SOUZA *et al.*, 2016).

Mecanismos de resistência a diferentes classes de antimicrobianos utilizados na produção animal têm sido estudados e relacionados à uma grande diversidade de genes (SILBERGELD *et al.*, 2008). Dentre esses antimicrobianos, a colistina (ou polimixina E) possui relevância clínica significativa na Medicina Humana por se tratar de um fármaco utilizado como última opção terapêutica nos casos de infecções por bactérias Gram-negativas multirresistentes (LING *et al.*, 2020). Em 2016, na China, a detecção de uma cepa de *Escherichia coli* de origem suína fenotipicamente resistente a colistina por um gene plasmidial, nominado gene *mcr-1* (mobile colistin resistance), gerou um alerta em toda comunidade científica, devido a elevada capacidade de transferência horizontal desse gene presente em um elemento genético móvel (LIU *et al.*, 2016). Desde então, nove outros genes da família *mcr* foram descritos (*mcr-2* ao *mcr-10*) e sua dispersão global tem levado ao isolamento de várias espécies bacterianas com aumento de tolerância à colistina, tanto de humanos quanto de animais, em diversos países do mundo (LING *et al.*, 2020; LUO *et al.*, 2020; WANG *et al.*, 2020).

Estudos desenvolvidos na China e em Portugal demonstraram que houve uma redução significativa em cepas de *E. coli* resistentes à colistina e carreadoras do gene *mcr-1* tanto em animais de produção (como suínos e frangos) quanto em seres humanos após a proibição do uso desse antimicrobiano como aditivo zootécnico (FOURNIER *et al.*, 2020; SHEN *et al.*, 2020). Embora seja notória a contribuição do ambiente de produção animal para a emergência

e disseminação global da resistência à colistina, a utilização desse antimicrobiano como promotor de crescimento ainda é permitida em muitos países (OLAITAN *et al.*, 2021). Sabendo que os ambientes humano e animal se integram, seja pelo contato direto com os animais ou através do consumo de alimentos, entende-se que medidas com o objetivo de prolongar a possibilidade de utilização da colistina no tratamento de pacientes com infecções bacterianas graves estão intimamente relacionadas a ações no campo agropecuário, que para maior eficácia devem ser realizadas em escala global.

Com relação aos animais selvagens, não existe uma fonte direta, a qual estejam expostos, que exerça pressão de seleção para bactérias resistentes aos antimicrobianos. No entanto, esses animais podem adquirir bactérias com determinantes genéticos que confirmam resistência a antimicrobianos importantes através do contato com seres humanos, animais de companhia e animais de produção, bem como no próprio ambiente, onde cursos d'água contaminados com fezes representam as maiores causas dessa transmissão (RADHOUANI *et al.*, 2014).

A literatura relata casos de isolamento de bactérias resistentes as mais diversas classes de antimicrobianos, desde *Escherichia coli* com fenótipos de resistência a beta-lactâmicos, aminoglicosídeos, fluoroquinolonas, tetraciclinas e sulfonamidas isoladas de aves selvagens (GUENTHER *et al.*, 2009), até a detecção dos genes *bla_{CTX-M}* e *bla_{CMY}* – que conferem resistência aos beta-lactâmicos – e do gene *qnrS1/S3* – determinante genético de resistência às quinolonas – em cepas de *E. coli* isoladas de mamíferos silvestres, tais como veados, bisões e javalis (WASYL *et al.*, 2017). Além disso, a resistência aos glicopeptídeos foi detectada em seis cepas de *Enterococcus* spp. isoladas de amostras fecais de gaivotas da Reserva Natural de Berlengas, em Portugal, sendo quatro *E. faecium* e dois *E. durans*. Todas as cepas apresentaram resistência fenotípica a vancomicina com detecção do gene *vanA*, além de se mostrarem resistentes a antimicrobianos de outras classes, como eritromicina, ampicilina e ciprofloxacina (RADHOUANI *et al.*, 2010).

Em estudo que buscou avaliar a prevalência da resistência a antimicrobianos em *E. coli* isoladas de aves e mamíferos selvagens, Carroll *et al.* (2014) relataram que os fenótipos resistentes a tetraciclina, ampicilina e estreptomicina foram os mais abundantes, com ocorrência de genes plasmidiais em todas as cepas multirresistentes. Tais achados indicam que esses animais podem funcionar como vetores para a disseminação de genes de resistência, uma vez que a transferência horizontal desses genes é facilitada.

Pinto *et al.* (2010) detectaram a ocorrência de genes que codificam beta-lactamases de espectro estendido (ESBL) em bactérias da ordem Enterobacterales isoladas de aves de rapina saudáveis. Outros estudos sobre a detecção de bactérias produtoras de ESBL em animais selvagens revelaram que cepas multirresistentes encontram-se difundidas em algumas populações específicas, como de aves marinhas, aves de rapina e roedores, embora esses animais nunca tenham sido expostos continuamente a antimicrobianos (GUENTHER *et al.*, 2011).

Desta forma, a ocorrência comum de resistência antimicrobiana na vida selvagens revela o potencial desses animais atuarem como reservatórios de espécies bacterianas e de genes de resistência de importância clínica em humanos, além de servirem como agentes de ampla dispersão desses genes na natureza. Outra implicação está relacionada aos problemas potenciais para o tratamento dos próprios animais selvagens, quando tal ação se faz necessária, limitando as possibilidades terapêuticas no caso de infecções por bactérias multirresistentes.

2.4 A importância do estudo da Resistência Antimicrobiana (RAM) no ambiente de necropsia

O exame de necropsia representa uma prática de suma importância na Medicina Veterinária devido a sua capacidade de confirmar, refutar, esclarecer, modificar ou estabelecer o diagnóstico clínico. Por vezes, a necropsia é a única forma possível de se chegar ao diagnóstico correto. Isso ocorre porque o exame *post mortem* constitui o melhor meio de comparação dos sinais clínicos do animal enfermo com lesões que não eram visíveis ou aparentes durante a sua vida (PEIXOTO & BARROS, 1998). Além de reconhecer ou confirmar a *causa mortis* do animal, a prática da necropsia possibilita o desenvolvimento de ações de controle e erradicação de doenças infecciosas (BABIŃSKA *et al.*, 2019), seja no caso de animais provenientes de ambiente hospitalar ou comunitário, da produção animal ou até mesmo de animais selvagens.

Por ser um procedimento invasivo ao cadáver do animal, durante sua execução, o patologista corre um risco particular de desenvolver infecções ocupacionais devido ao manuseio direto de órgãos que podem estar contaminados pelos mais diversos microrganismos. Posthaus e colaboradores (2011) relataram casos de infecções acidentais por *Mycobacterium tuberculosis* em três patologistas que realizaram a necropsia de cão diagnosticado com micobacteriose sistêmica. Desta forma, é notório que o ambiente de necropsia representa um

local altamente contaminado onde circulam patógenos envolvidos no acometimento tanto de animais quanto de profissionais que ali atuam.

Peixoto & Barros (1998) destacam a importância da necropsia como instrumento elementar de investigação de doenças, capaz de permitir o isolamento de bactérias encontradas em indivíduos com quadros infecciosos e a consequente identificação de seus perfis de resistência. Estudo desenvolvido por Sharma *et al.* (2017) em aves de produção necropsiadas detectaram altas taxas de multirresistência em diversos gêneros bacterianos. Estes resultados, obtidos a partir de isolamento *post mortem*, indicam a severidade do problema da multirresistência bacteriana, bem como a importância da adoção de medidas seguras para o descarte de resíduos de necropsia a fim de interromper os ciclos de transmissão de bactérias resistentes a antimicrobianos.

O descarte adequado das carcaças após o procedimento de necropsia é de extrema importância tanto para evitar a contaminação de outros seres humanos e animais quanto para eliminar possíveis genes que codifiquem fatores de resistência aos antimicrobianos, impedindo sua dispersão no ambiente. Segundo a RDC nº 306/2004 da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), todos os serviços relacionados com o atendimento à saúde humana e animal são geradores de resíduos de serviços de saúde (RSS) e devem respeitar as normas sanitárias e ambientais vigentes para o descarte dos mesmos (BRASIL, 2004). A resolução nº 358/2005 do Conselho Nacional do Meio Ambiente (CONAMA) afirma que o destino final adequado do resíduo é de total responsabilidade do seu gerador, que deve criar e implantar um Plano de Gerenciamento de Resíduos de Serviços de Saúde que abranja desde a geração até a disposição final dos resíduos (BRASIL, 2005).

De acordo com as resoluções nº 306/2004 da ANVISA e nº 358/2005 do CONAMA, carcaças de animais se encontram no grupo A, classificado como o de ‘Resíduo Biológico Infectante’, e que abrange resíduos com a possível presença de agentes biológicos que, por suas características de maior virulência ou concentração, possam apresentar risco potencial à saúde pública e ao meio ambiente. O grupo A se divide em cinco subgrupos, dos quais as carcaças de animais se enquadram nas categorias A2 e A4, discriminadas a seguir.

“A2. carcaças, peças anatômicas, vísceras e outros resíduos provenientes de animais submetidos a processos de experimentação com inoculação de microrganismos, bem como suas forrações, e os cadáveres de animais suspeitos de serem portadores de microrganismos de relevância epidemiológica e com

risco de disseminação, que foram submetidos ou não a estudo anatomopatológicos ou confirmação diagnóstica.

A4. carcaças, peças anatômicas, vísceras e outros resíduos provenientes de animais não submetidos a processos de experimentação com inoculação de microrganismos, bem como suas forrações.” (BRASIL, 2005)

Após a realização do exame de necropsia, as carcaças de animais devem ser direcionadas para o descarte o mais rápido possível, de modo a minimizar o risco de contaminação do ambiente por meio dos fluidos e secreções excretados pelos cadáveres, que se transformam em excelentes meios de cultura microbiana. Quanto ao destino das carcaças, existem três possibilidades distintas: aterro sanitário, autoclavação e incineração. A incineração é considerada o melhor método para eliminação total de possíveis genes de resistência a antimicrobianos carregados por bactérias tanto da microbiota dos animais quanto patogênicas (CARDOSO, 2002).

Dessa forma, o ambiente de necropsia representa um espaço importante para o monitoramento da diversidade bacteriana e dos respectivos perfis de resistência, não apenas para fins de diagnóstico, mas sobretudo para a compreensão da circulação da microbiota bacteriana e genes de resistência. Outro ponto a ser destacado, é o impacto ambiental, uma vez que existe a necessidade cada vez maior de adoção de medidas seguras para o descarte das carcaças. É possível considerar a conexão entre pessoas, animais e ambiente na disseminação da resistência antimicrobiana dentro do conceito "Saúde Única", e buscar subsídios para o estabelecimento de abordagens integradas focadas na redução da pressão de seleção e interrupção dos ciclos de transmissão de microrganismos resistentes.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Avaliar a ocorrência, diversidade genética e resistência de patógenos bacterianos, em especial aqueles considerados como superbactérias pela Organização Mundial de Saúde, a partir de amostras coletadas de animais em necropsias como subsídio à implementação de monitoramento no descarte de carcaças.

3.2 Objetivos Específicos

- Avaliar a diversidade bacteriana em amostras provenientes de animais necropsiados na Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro por métodos fenotípico, proteômico e genotípico, com ênfase em cocos Gram-positivos e bastonetes Gram-negativos de acordo com a espécie animal em análise;
- Detectar a ocorrência dos patógenos bacterianos considerados como prioritários pela Organização Mundial de Saúde;
- Buscar ativamente cepas de *Acinetobacter baumannii* resistente aos carbapenêmicos, *Pseudomonas aeruginosa* resistente aos carbapenêmicos e Enterobacteriaceae resistente aos carbapenêmicos e produtora de ESBL;
- Buscar ativamente cepas de *Enterococcus faecium* resistente à vancomicina, *Staphylococcus aureus* resistente à meticilina e com resistência ou resistência intermediária à vancomicina e cepas de *Salmonella* spp. resistentes a fluoroquinolonas;
- Monitorar a ocorrência de resistência genotípica à colistina em cepas de *Escherichia coli* e outros bastonetes Gram-negativos da ordem Enterobacterales.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Amostragem

Foram realizadas coletas de amostras de 45 animais, sendo 40 animais necropsiados no Setor de Anatomia Patológica (SAP) da UFRRJ e 5 necropsiados no Setor de Avicultura da mesma universidade. Do total de 40 animais necropsiados no SAP, 20 foram animais de companhia, sendo 16 cães, 3 gatos e 1 coelho (*Oryctolagus cuniculus*); 17 foram animais de produção, sendo 10 rãs touro (*Lithobates catesbeianus*), 4 bovinos, 2 aves e 1 equino; e 3 foram animais silvestres, sendo 1 onça parda (*Puma concolor*), 1 gambá de orelha preta (*Didelphis aurita*) e 1 rã de vida livre (Figura 2). Os 5 animais necropsiados no Setor de Avicultura foram frangos da espécie *Gallus gallus*, abatidos e necropsiados no local. Os animais possuíam suspeitas clínicas diversas, não apenas relacionadas a infecções bacterianas, e encontravam-se frescos, em bom estado de conservação.

As coletas de amostras contemplaram sítios previamente determinados para cada espécie e foram realizadas de duas formas: com o auxílio de *swabs* estéreis acondicionados em meio de cultura para transporte e através de fragmento de órgão acondicionado em solução salina a 0,9% estéril. Foi realizada a coleta de 198 amostras dos 45 animais necropsiados na UFRRJ, sendo 155 *swabs* de diferentes sítios, 31 amostras de fragmentos de órgãos (fígado, rim e pulmão) e 2 amostras de material biológico (líquido do ceco e conteúdo do intestino delgado de equino), detalhados na Tabela 1.

No caso de canídeos e felinos, foram coletadas amostras de *swabs* de condutos auditivo e nasal, secreção pulmonar e *swab* retal. Do coelho, foram coletadas amostras dos condutos nasais, secreção pulmonar e *swab* retal. Já em bovinos, foram realizadas coletas de amostras de condutos e seios nasais. Das aves, foram coletadas amostras de traqueia e cloaca, com auxílio de *swab*. Do único exemplar de equino, foram coletadas amostras dos condutos nasais, traqueia, seios nasais, conteúdo do intestino delgado e líquido do ceco. Das rãs, animais oriundos de uma mesma produção com suspeita clínica e posterior confirmação de tuberculose, foram realizadas coletas de fragmentos de fígado, rim e pulmão. As amostras coletadas da onça parda e do gambá de orelha preta incluíram *swabs* de condutos auditivo e nasal, secreção pulmonar e *swab* retal. Da rã de vida livre, animal encontrado morto no município de Seropédica, foram realizadas coletas de fragmentos de fígado, rim e pulmão. Os sítios de coleta encontram-se descritos na Figura 3.

De acordo com a causa do óbito, foram incluídos outros sítios para coleta de amostras e todos os animais que, no momento da necropsia, apresentaram lesões, aparentes ou internas, tiveram amostras coletadas dos sítios lesionados.

Os animais dos quais as amostras foram coletadas eram machos e fêmeas de diferentes espécies, raças e com idade variando entre feto (6 meses) e 15 anos. Totalizou-se 198 amostras coletadas dos 45 animais tomados para estudo.

As amostras foram coletadas durante 3 meses no segundo semestre letivo de 2020 e em cada um dos semestres letivos de 2021. O número total de animais necropsiados foi abaixo do esperado por motivos de pandemia da Covid-19.



Figura 2: Animais cujas amostras foram coletadas durante o exame de necropsia. Coleta de conduto nasal direito de bovino com auxílio de swab estéril (A). Feto de bovino de seis meses de idade gestacional (B). Cão da raça Chow-chow com lesão na região do focinho (C). Vista dorsal de *Lithobates catesbeianus* – rã touro (D1). Vista ventral de rã touro com incisão abdominal e exposição de vísceras no momento do exame de necropsia (D2). *Puma concolor* – onça parda – vítima de atropelamento no município de Paracambi/RJ em exame macroscópico de carcaça que antecede o procedimento de necropsia (E). Sala de necropsia: equino com incisão abdominal ao chão e análise de material em mesa cirúrgica por alunos do curso de Medicina Veterinária da UFRRJ em aula de Anatomia Patológica Especial ministrada pela professora Dra. Marilene de Farias Brito (F).

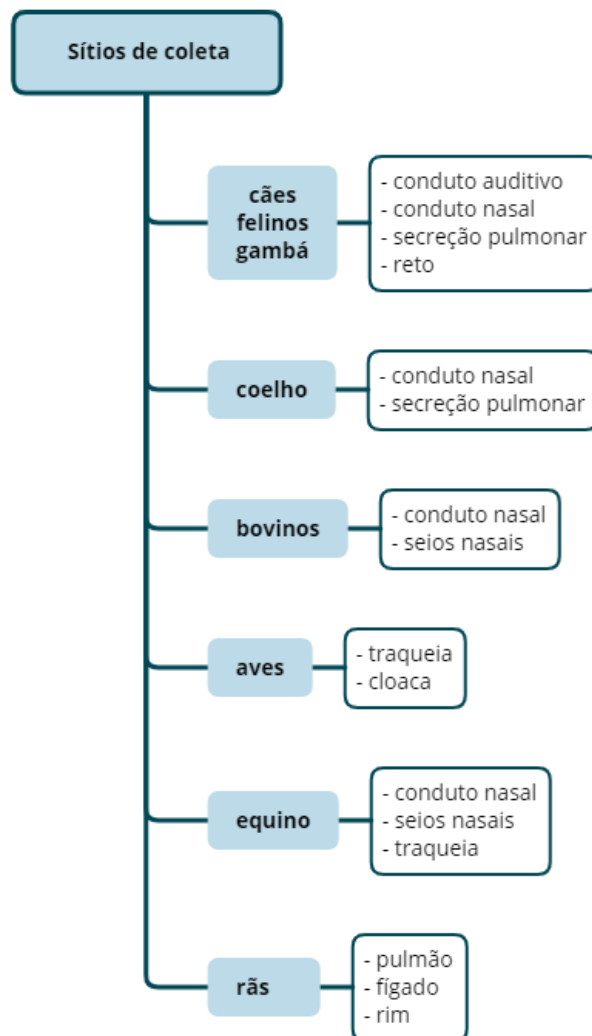


Figura 3: Fluxograma com a definição dos sítios de coleta de amostras por espécie animal.

Tabela 1. Relação do grupo animal, das espécies animais necropsiadas e das amostras coletadas por cada sítio (continua)

Grupo animal (n animais)	Espécie (n animais)	Sítio de coleta (n amostras)
Animais selvagens (3)	<i>Puma concolor</i> – onça parda (1)	Conduto auditivo (2) Conduto nasal (2) Pulmão (1) Reto (1)
	<i>Didelphis aurita</i> – gambá de orelha preta (1)	Conduto auditivo (2) Conduto nasal (2) Pulmão (1) Reto (1)
	Anuro - rã (1)	Fígado (1) Pulmão (1) Rim (1)

Tabela 1. Relação do grupo animal, das espécies animais necropsiadas e das amostras coletadas por cada sítio

Grupo animal (n animais)	Espécie (n animais)	Sítio de coleta (n amostras)	
Animais de companhia (20)	Canina (16)	Conduto auditivo (32)	
		Conduto nasal (32)	
		Pulmão (16)	
		Reto (16)	
		Lesão focinho (1)	
	Felina (3)	Conduto auditivo (6)	
		Conduto nasal (6)	
		Pulmão (3)	
		Reto (3)	
	Leporina (1)	Conduto nasal (2)	
		Pulmão (1)	
		Reto (1)	
Animais de produção (22)	<i>Lithobates catesbeianus</i> – rã touro (10)	Fígado (10)	
		Pulmão (8)	
		Rim (10)	
	Bovina (4)	Conduto nasal (8)	
		Seios nasais (4)	
		Pulmão (2)	
			Abscesso (1)
	<i>Gallus gallus</i> – frango de corte (6)		Cloaca (6)
			Traqueia (6)
			Fígado (1)
<i>Anser cygnoides</i> – ganso-africano (1)		Cloaca (1)	
		Traqueia (1)	
Equina (1)		Conduto nasal (2)	
		Seios nasais (1)	
		Traqueia (1)	
		Ceco (1)	
		Intestino delgado (1)	

Legenda: (n) – número de.

4.2 Isolamento e Identificação Fenotípica dos Isolados Bacterianos

As amostras foram coletadas durante a realização do exame de necropsia e seguiram o protocolo de isolamento e identificação descrito a seguir: as amostras coletadas através de fricção de *swabs* estéreis no tecido de escolha tiveram os mesmos acondicionados em meio Stuart (Absorve®) imediatamente após a sua coleta, enquanto que as amostras de fragmentos de órgãos foram coletadas com o auxílio de bisturi e pinça estéreis e acondicionadas em solução salina, também estéril, a uma concentração de 0,9%. Em ambos os casos, as amostras foram imediatamente transportadas ao Laboratório de Bacteriologia Veterinária (LabacVet) da UFRRJ dentro de caixas isotérmicas contendo gelo reciclável.

Já no LabacVet, os *swabs* foram estriados em meios seletivos a fim de reduzir a contaminação e facilitar a detecção das bactérias de interesse. No caso das amostras coletadas sob a forma de fragmentos, o tecido foi macerado com o auxílio de *swabs* estéreis e foram transferidos 200µL do conteúdo da amostra para caldo BHI (Absorve®), que, após a incubação de 4 horas em temperatura de 35°C, foi utilizado para realização de estrias também em meios seletivos.

Para os *swabs* nasais e fragmentos do trato respiratório foi utilizado o ágar Manitol Vermelho de Fenol (A.MVF - Biokar®) visando o isolamento de *Staphylococcus* spp. e o ágar Base Azida Sangue (A.Azida - Himedia®) enriquecido com sangue de carneiro a uma concentração de 5%, objetivando-se o isolamento de cocos Gram-positivos catalase negativos pertencentes aos gêneros *Enterococcus* spp. e *Streptococcus* spp.

Amostras de *swabs* de conduto auditivo foram estriadas em ágar Manitol Vermelho de Fenol (A.MVF - Biokar®) e em ágar Base Azida Sangue (A.Azida - Himedia®) enriquecido com 5% de sangue de carneiro visando o isolamento dos grupos bacterianos supracitados. Além desses meios, foi utilizado o ágar MacConkey (A.MC - Biokar®) com o objetivo de isolar bastonetes Gram-negativos pertencentes a Ordem Enterobacterales, bem como bastonetes Gram-negativos não fermentadores de glicose (BGNNF).

Para os *swabs* retais e material de trato intestinal utilizou-se tanto o ágar MacConkey (A.MC - Biokar®) com o objetivo de isolar bastonetes Gram-negativos pertencentes a Ordem Enterobacterales, bem como bastonetes Gram-negativos não fermentadores de glicose (BGNNF), quanto o ágar Salmonella Shigella (A.SS - Kasvi®) – cujas estrias foram realizadas após o enriquecimento da amostra em caldo Tetrionato (Acumedia®) incubado por 12 horas a 35°C – de modo a direcionar o isolamento de estirpes dos gêneros *Salmonella* spp. e *Shigella* spp.

Para fragmentos de tecido, tais como pulmão, fígado e rim, bem como para *swabs* de secreção pulmonar ou de coleta de lesão foi utilizado, além dos meios seletivos já mencionados anteriormente, o ágar Sangue (A.SC5% - Biokar®) acrescido de 5% de sangue de carneiro, um meio de enriquecimento, visando o isolamento de bactérias fastidiosas.

Todos os meios foram incubados a 35°C por 24 horas, e as colônias com características compatíveis com o que se buscava foram selecionadas e analisadas de forma presuntiva, onde foram realizados o método de coloração de Gram e a prova do hidróxido de potássio (KOH) a 3% para confirmação de suas características morfotintoriais (KONEMAN *et al.*, 2018). Após análise presuntiva, as cepas de interesse seguiram para identificação fenotípica das espécies e foram estocadas em caldo BHI acrescido de 45% de glicerol com acondicionamento em freezer (temperatura de $\cong -5^{\circ}\text{C}$) para análises complementares posteriores.

4.2.1 *Staphylococcus* spp.

Os cocos Gram-positivos provenientes de crescimento colonial em A.MVF foram selecionados e submetidos aos testes de rotina, incluindo a produção de catalase, resistência à bacitracina 0,04 UI e produção de coagulase. As cepas catalase-positivas foram testadas quanto a sua resistência à bacitracina 0,04 UI, diferenciando *Staphylococcus* spp. de *Micrococcus* spp., gênero esse sensível ao referido antimicrobiano. As estirpes que apresentaram resistência à bacitracina 0,04 UI foram, então, avaliadas quanto a produção de coagulase. As cepas que não produziram coagulase foram identificadas como *Staphylococcus* spp. coagulase-negativos (SCNs), enquanto que as produtoras de coagulase foram testadas quanto à fermentação de maltose e manose, produção de acetoína, através da prova de Voges-Proskauer (VP), e suscetibilidade à polimixina B (Figura 4). As cepas de *Staphylococcus aureus* foram caracterizadas pela fermentação de maltose e manose, produção de acetoína e resistência à polimixina B – halo de inibição de crescimento com diâmetro menor ou igual a 10mm (CLSI, 2021). Já a caracterização das cepas de *Staphylococcus pseudintermedius* se deu através da fermentação da maltose, não produção de acetoína e sensibilidade à polimixina B, de acordo com metodologia proposta por Markey *et al.* (2013).

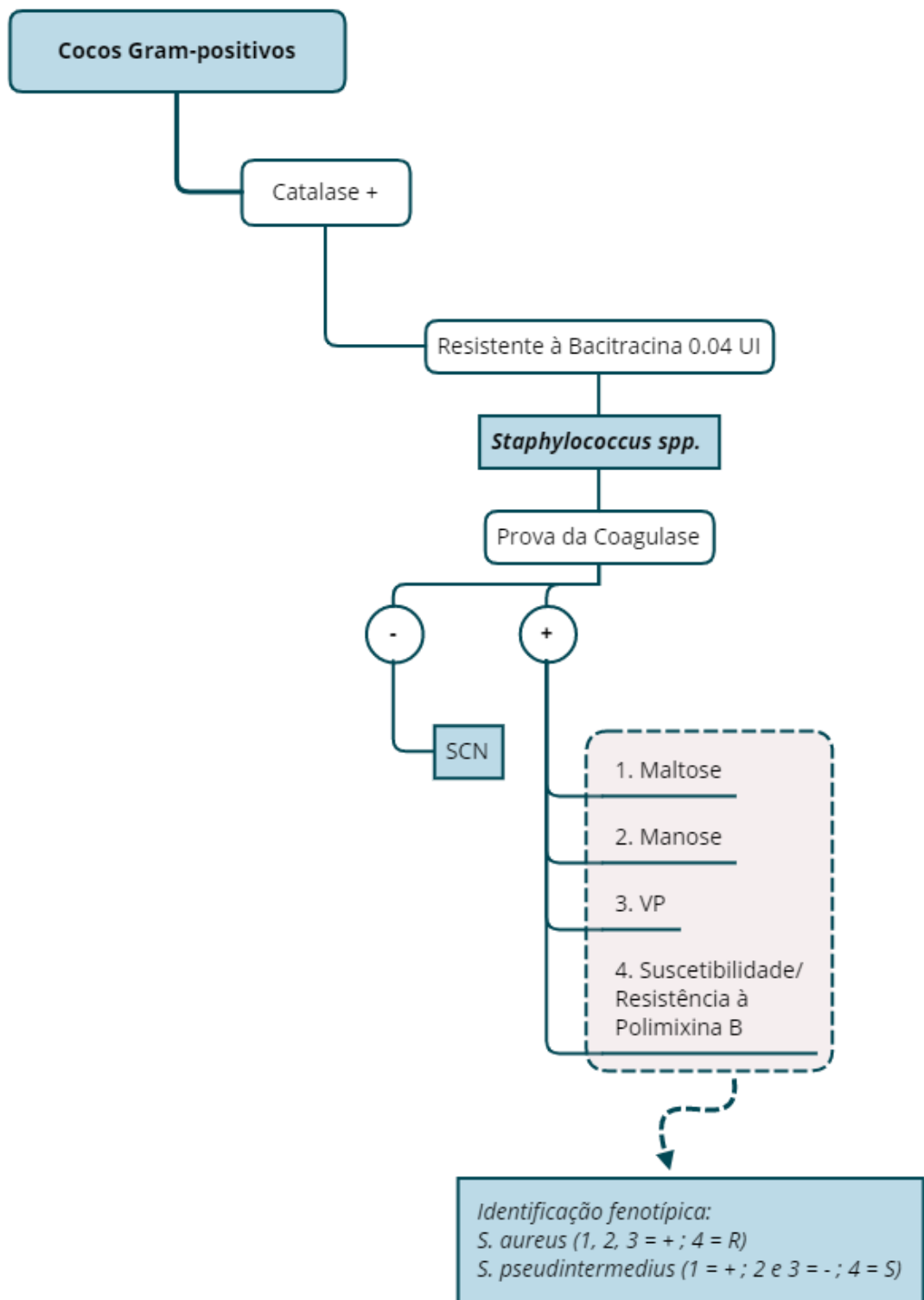


Figura 4. Fluxograma de identificação fenotípica de cepas do gênero *Staphylococcus* spp.

4.2.2 *Streptococcus* spp. e *Enterococcus* spp.

Os cocos Gram-positivos provenientes de crescimento em A.Azida acrescido de sangue de carneiro a 5% em ambiente de anaerobiose foram selecionados e submetidos aos testes de rotina, incluindo a prova do KOH a 3%, a produção de catalase, o crescimento em C.BHI + 6,5% de NaCl e o teste da bile-esculina, no qual espécies pertencentes ao gênero *Enterococcus* são positivas por serem capazes de crescer na presença de 40% de bile e de hidrolisar a esculina, de modo a escurecer o meio de cultura. *Enterococcus* spp. mostra-se negativo nas provas de KOH e catalase, sendo positivo para o teste bioquímico de crescimento na presença de elevada concentração de NaCl (Figura 5). *Streptococcus* spp. também apresenta-se negativo nas provas de KOH e catalase, entretanto, a maioria das espécies desse gênero não é capaz de crescer em elevadas concentrações de NaCl, tampouco na presença de 40% de bile, possibilitando sua diferenciação do gênero *Enterococcus* spp. (MARKEY *et al.*, 2013; KONEMAN *et al.*, 2018).

Os testes fenotípicos supracitados possibilitaram uma triagem inicial para identificação em nível de gênero. A confirmação para tal se deu através de análises proteômica e genotípica que se encontram descritas mais à frente (itens 4.3 e 4.5.4.1).

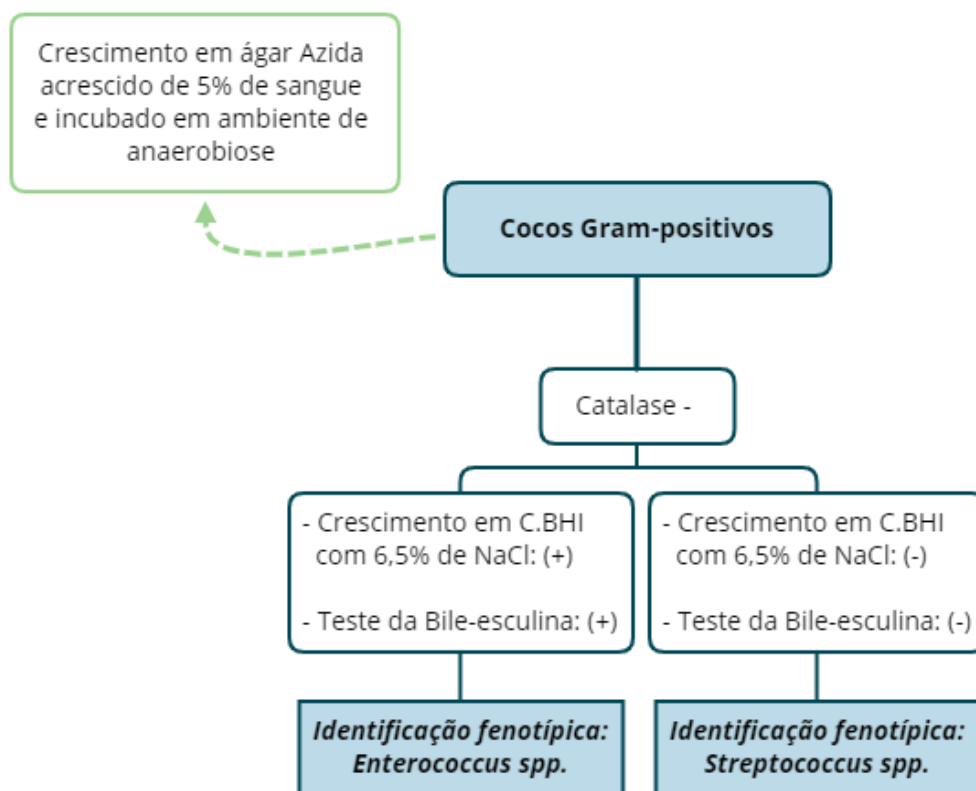


Figura 5: Fluxograma de identificação fenotípica de cepas dos gêneros *Streptococcus* spp. e *Enterococcus* spp.

4.2.3 Bastonetes Gram-negativos (BGN)

Os bastonetes Gram-negativos provenientes de A.MC foram selecionados e submetidos a diferentes testes, incluindo a prova do Hidróxido de Potássio 3% e análises bioquímicas utilizando o ágar Três-Açúcar-Ferro (A.TSI- Himedia®), caldo MR-VP (VETEC®), ágar Citrato de Simmon (MicroMed®) e ágar Sulfeto Indol Motilidade (A.SIM-MicroMed®), além de provas alternativas, como a avaliação da capacidade de hidrólise da ureia através da utilização do Caldo Ureia (Himedia®) (Figura 6).

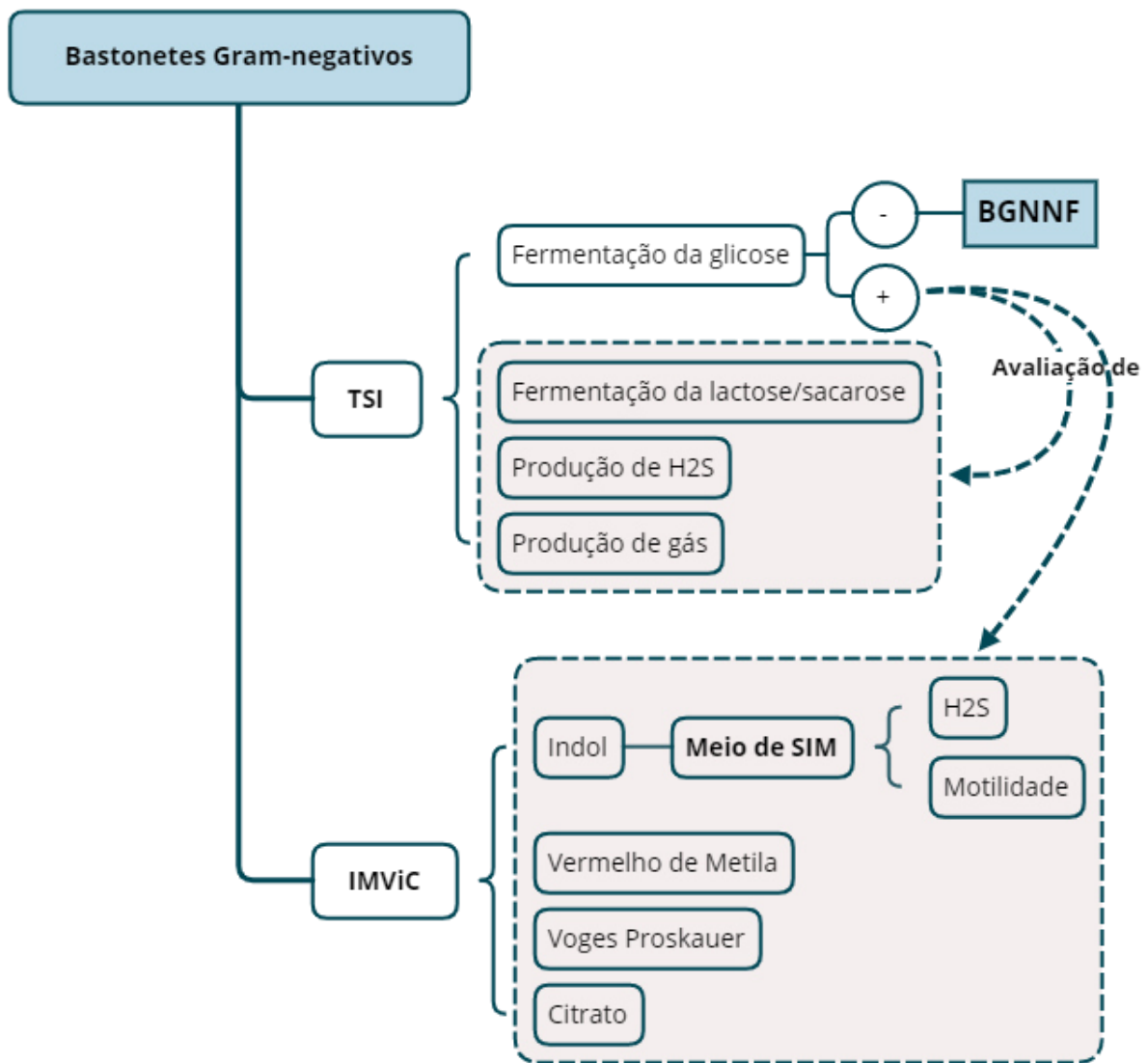


Figura 6: Provas de identificação fenotípica de bastonetes Gram-negativos da ordem Enterobacterales.

Os isolados da ordem Enterobacterales foram caracterizados e identificados fenotipicamente de acordo com Markey *et al.* (2013) e Koneman *et al.* (2018). Os critérios de leitura utilizados para tal identificação encontram-se descritos na Quadro 1, na qual foram listadas apenas as espécies bacterianas isoladas neste trabalho.

Quadro 1. Critério interpretativo adotado para identificação fenotípica de BGNs da Ordem Enterobacterales

Espécie	Lac	Sac	H ₂ S	Gás	Indol	Mot	Citrato	VM	VP	Urease
<i>Citrobacter amalonaticus</i>	(-)	-	-	+	+	+	+	+	-	(+)
<i>Citrobacter koseri</i>	((+))	(-)	-	+	+	+	+	+	-	(+)
<i>Citrobacter freundii</i>	((+))	((-))	(+)	+	((-))	-	(+)	+	-	(-)
<i>Edwardsiella tarda</i>	-	-	+	+	+	+	+	+	-	-
<i>Enterobacter aerogenes</i>	+	+	-	+	-	+	+	-	+	-
<i>Enterobacter cloacae</i>	+	+	-	+	-	+	+	-	+	(+)
<i>Escherichia coli</i>	+	((+))	-	+	+	+	-	+	-	-
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	+	+	-	+	-	-	+	-	+	+
<i>Morganella morganii</i>	-	-	(-)	+	+	+	+	+	-	+
<i>Proteus mirabilis</i>	-	-	+	+	-	+	((+))	+	-	+
<i>Providencia stuartii</i>	-	((+))	-	-	+	(+)	+	+	-	-
<i>Serratia marcescens</i>	-	+	-	((+))	-	+	+	(-)	+	(-)
<i>Shigella spp.</i>	-	-	-	-	V	-	-	+	-	-

Legenda: Lac, lactose; Sac, sacarose; Mot, motilidade; +: 90% ou mais Positivos; (+): 75% a 89% Positivos; ((+)): 50% a 74% Positivos; ((-)): 50% a 74% Negativos; (-): 75 a 89% Negativos; -: 90% ou mais Negativos; V: Variável. (MARKEY *et al.*, 2013; KONEMAN *et al.*, 2018).

4.3 Identificação por Espectrometria de Massa com Ionização por Dessorção a Laser Assistida por Matriz e analisador de Tempo de Voo (MALDI-TOF MS)

Após a identificação fenotípica foi realizada a avaliação complementar de todas as cepas isoladas através da análise proteômica no aparelho MALDI-TOF, etapa essa desenvolvida no Laboratório de Investigação em Microbiologia Médica (LIMM) do Instituto de Microbiologia Paulo Góes da UFRJ. Para o preparo das amostras, as cepas foram cultivadas em A.BHI a 35°C por 24 horas. Posteriormente, selecionou-se uma colônia de cada isolado e, pelo método de transferência direta, as amostras foram aplicadas sobre cada *spot* da microplaca (96 MSP, Bruker - Billerica®, EUA). Após a secagem, foi adicionado ao sedimento bacteriano 1 µL de ácido fórmico a 70% (Sigma-Aldrich®), a fim de otimizar a lise celular. Após a secagem da solução de lise, adicionou-se 1 µL de solução da matriz (ácido alfa-ciano-4-hidroxi-cinâmico diluído em acetonitrila 50% e ácido trifluoracético 2,5%, Sigma-Aldrich®) e as microplacas foram deixadas a temperatura ambiente até a secagem por completo. Uma a uma, as microplacas foram colocadas no aparelho e os espectros de cada amostra foram gerados em um espectrômetro de massa (MALDI-TOF LT Microflex Bruker, Bruker®) equipado com laser de 337 nm de nitrogênio no modo linear controlado pelo programa FlexControl 3.3 (Bruker®). Os espectros foram coletados na faixa de massas entre 2.000-20.000 m/s e, posteriormente, analisados pelo programa MALDI Biotyper 2.0 (Bruker®), com as configurações padronizadas para identificação bacteriana. O programa confronta os espectros da amostra desconhecida com amostras de referência presente em um banco de dados. Os resultados obtidos variam em uma escala que vai de zero a três, sendo que quanto maior o valor, mais precisa e confiável é a identificação. Neste trabalho, foram considerados como uma identificação aceitável ao nível de gênero os resultados com valores iguais ou superiores a 1.700 e ao nível de espécie os valores iguais ou superiores a 2.000.

4.4 Análises Fenotípicas de Resistência a Antimicrobianos

4.4.1 Preparo do inóculo e execução do teste de difusão em disco

A detecção fenotípica da resistência foi realizada através de testes de difusão em disco conforme recomendações do CLSI VET (2020) e do CLSI (2021). O preparo do inóculo deu-se após a incubação dos isolados por 18 a 24 horas a temperatura de 35°C em meio de cultura A.BHI (Absorve®). Após esse tempo, as colônias foram suspensas em solução salina 0,9% estéril com turbidez equivalente a escala 0,5 de McFarland (Figura 7A). Posteriormente, foi

realizada a semeadura dos isolados, provenientes dessas suspensões diretas padronizadas, sobre a superfície de placas contendo ágar Müller-Hinton (A.MH - Kasvi®), seguida da deposição dos discos de antimicrobianos selecionados e utilizados para predição e análise da resistência em cada grupo bacteriano estudado (Figura 7B). Após a incubação a $35^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ por 18 horas, os diâmetros formados ao redor dos discos foram medidos (Figura 7C), com o auxílio de uma régua, e interpretados de acordo com os documentos CLSI VET (2020) e CLSI (2021).



Figura 7: Preparo de suspensão de colônias bacterianas em solução salina com turbidez equivalente a 0,5 da escala McFarland (A). Semeadura dos isolados e inclusão dos discos impregnados com os antimicrobianos (B). Anotações da leitura de halos de inibição de crescimento bacteriano ao redor dos discos realizadas com o auxílio de régua milimetrada (C). Fonte: Arquivo pessoal.

4.4.2 Avaliação da resistência aos beta-lactâmicos por alteração de PBPs e por produção de beta-lactamases em *Staphylococcus* spp.

Os isolados de *Staphylococcus* spp. foram submetidos ao teste de difusão em disco no qual foram utilizados os antimicrobianos cefoxitina (30 μg) e oxacilina (10 μg) para predição da resistência à meticilina mediada pelo gene *mecA*. O disco de penicilina (10 UI) foi empregado a fim de avaliar a resistência através da produção de beta-lactamases, evidenciada pela análise da *zona edge*. Este teste fenotípico é o recomendado para a detecção da produção de beta-lactamases em *S. aureus* e, neste estudo, também foi adotado para as demais espécies de *Staphylococcus* spp. coagulase-positivos (SCPs) e para os SCNs isolados. A interpretação desse teste é realizada através da avaliação da margem do halo de inibição de crescimento bacteriano que, quando bem delimitada, indica a produção de beta-lactamase (Figura 8A) e, já quando se apresenta de maneira difusa, é indicativo de bactéria não produtora da enzima (Figura 8B). Após incubação a 35°C por 18h, os diâmetros formados ao redor dos discos foram observados, medidos e interpretados de acordo com a Quadro 2 (CLSI VET, 2020; CLSI, 2021). O objetivo dessa avaliação foi, a partir de uma leitura interpretativa dos resultados obtidos, detectar a resistência e predizer o possível mecanismo envolvido nesse processo.

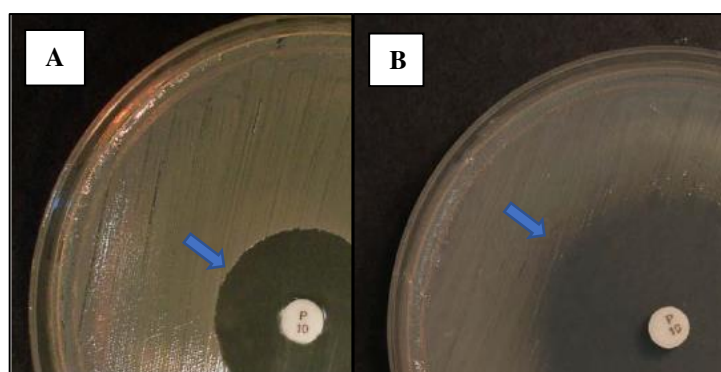


Figura 8: Interpretação de teste de difusão em disco para avaliação da resistência à penicilina através da produção de beta-lactamases. Teste de *zona edge* positivo – margem delimitada do halo de inibição indica a produção de beta-lactamase (A). Teste de *zona edge* negativo – margem difusa indica que não há produção de beta-lactamase (B). Fonte: CLSI (2021).

Quadro 2. Critério interpretativo para avaliação dos halos de sensibilidade aos beta-lactâmicos testados em *Staphylococcus* spp.

Espécie	Disco de Antimicrobiano	Halos de Inibição (mm)		
		S	I	R
<i>S. aureus</i>	CFO (30µg)	≥ 22	-	≤ 21
<i>S. pseudintermedius</i>	OXA (30µg)	≥ 18	-	≤ 17
SCN	CFO (30µg)	≥ 25	-	≤ 24
<i>Staphylococcus</i> spp.	PEN (10 UI)	≥ 29	-	≤ 28

Legenda: S - Sensível; I - Intermediário; R - Resistente; SCN - *Staphylococcus* spp. Coagulase Negativos. Fonte: CLSI (2021).

4.4.3 Avaliação da resistência à penicilina em *Streptococcus* spp. e à vancomicina em *Enterococcus* spp.

Os isolados de *Streptococcus* spp. foram submetidos ao teste difusão em disco com penicilina (10 UI) e com os *Enterococcus* spp. foi realizado o teste difusão em disco com vancomicina (30µg), de acordo com metodologia previamente citada no item 4.4.1, com halos de inibição descritos no Quadro 3. Posteriormente, foi realizado o ágar *screen* para as cepas de *Enterococcus* spp. que se mostraram resistentes ou com resistência intermediária à vancomicina, no qual bactérias provenientes de suspensões diretas equivalentes à escala 0,5 de McFarland foram inoculadas sobre a superfície de A.BHI acrescido com vancomicina em concentração de 6 µg/mL. As placas foram incubadas a 35°C por 24 horas e, após este período, as mesmas foram analisadas a fim de verificar a presença de pequenas colônias bacterianas ou crescimento em filme, resultado este que confirma a resistência do isolado à referida base testada (CLSI VET, 2020; CLSI, 2021).

Quadro 3. Critério interpretativo para avaliação dos halos de sensibilidade aos antimicrobianos testados em *Enterococcus* spp. e *Streptococcus* spp.

Espécie	Disco de Antimicrobiano	Halos de Inibição (mm)		
		S	I	R
<i>Enterococcus</i> spp.	VAN (30µg)	≥ 17	15 - 16	≤ 14
<i>Streptococcus</i> spp. do grupo beta-hemolítico	PEN (10 UI)	≥ 24	-	-

Legenda: S - Sensível; I - Intermediário; R - Resistente. Fonte: CLSI (2021).

4.4.4 Pesquisa de beta-lactamases de espectro estendido (ESBL) e de carbapenemases em bastonetes Gram-negativos (BGN)

Para os isolados de bastonetes Gram-negativos, foram realizadas pesquisas fenotípicas de resistência aos beta-lactâmicos com o objetivo de aferir a expressão de ESBL e de carbapenemases. Os ensaios foram realizados por meio da técnica de difusão em disco, seguindo metodologia previamente citada no item 4.4.1 e de acordo com recomendações do CLSI (2021), e, após incubação a 35°C por 18 h, os diâmetros ao redor dos discos foram observados, medidos em milímetros e interpretados conforme a Quadro 4. O teste de triagem para ESBL foi realizado com os antimicrobianos: amoxicilina + ácido clavulânico (30µg), ampicilina (10µg), aztreonam (30µg), cefotaxima (30µg), ceftazidima (30µg) e cefepima (30µg). Os isolados que apresentaram sensibilidade reduzida ou resistência à uma ou mais cefalosporinas e, ou, ao monobactâmico e que foram sensíveis ao clavulanato, foram submetidos ao teste confirmatório para ESBL. Neste teste foram utilizados os seguintes antimicrobianos: cefotaxima (30µg), ceftazidima (30µg), cefotaxima + ácido clavulânico (30/10µg) e ceftazidima + ácido clavulânico (30/10µg) e o resultado foi considerado positivo para a produção de ESBL quando observado um aumento de, no mínimo, 5 mm no diâmetro do halo de inibição para qualquer um dos antimicrobianos combinados com clavulanato em comparação ao diâmetro do halo de inibição do mesmo agente quando testado sozinho. O teste de triagem para evidenciação de resistência mediada por expressão de carbapenemase foi realizado com o antimicrobiano imipenem (10µg) e, para isolados que não se mostraram sensíveis, foi realizado o ensaio com meropenem (10µg), por ser um antimicrobiano com maior sensibilidade para o teste.

Quadro 4. Critério interpretativo para avaliação dos halos de sensibilidade aos antimicrobianos testados em bastonetes Gram-negativos

Disco de Antimicrobiano	Concentração	Halos de Inibição (mm)			
		S	SDD	I	R
Amoxicilina + Ác. clavulânico (AMC)	30µg	≥ 18	-	14 - 17	≤ 13
Ampicilina (AMP)	10µg	≥ 17	-	14 - 16	≤ 13
Aztreonam (ATM)	30µg	≥ 21	-	18 - 20	≤ 17
Cefotaxima (CTX)	30µg	≥ 26	-	23 - 25	≤ 22
Ceftazidima (CAZ)	30µg	≥ 21	-	18 - 20	≤ 17
Cefepima (CPM)	30µg	≥ 25	19 - 24	-	≤ 18
Imipenem (IMP)	10µg	≥ 23	-	20 - 22	≤ 19
Meropenem (MER)	10µg	≥ 23	-	20 - 22	≤ 19
Cefotaxima + Ác. clavulânico (CCT)	30/10µg	Necessária a comparação com os agentes sem adição de Ácido Clavulânico (CTX e CAZ) para interpretação do resultado. Halo de CCT e CCA com diferença de 5mm ou mais indica positividade.			
Ceftazidima + Ác. clavulânico (CCA)	30/10µg				

Legenda: S - Sensível; SDD - Sensível Dependente de Dose; I - Intermediário; R - Resistente. Fonte: CLSI (2021).

4.5 Análises genotípicas de identificação e resistência a antimicrobianos

4.5.1 Extração de DNA

Para a identificação genotípica foi realizada a extração do DNA de cada isolado bacteriano através do método de lise térmica descrito por Dashti *et al.* (2009), modificado e estabelecido pelo LabacVet da UFRRJ. A partir das cepas preservadas em caldo BHI acrescido de glicerol, foram transferidos 200µL de amostra para novos caldos BHI, incubados a 35°C por 24 horas para recuperação das mesmas. Após esse período, os isolados foram semeados em ágar BHI (Kasvi®) e incubados a 35°C por 24 horas. Posteriormente, uma colônia de cada isolado foi selecionada e transferida, com o auxílio de uma alça de platina previamente flambada, para microtubos de 1,5mL contendo 500µL de água Milli-Q estéril. As colônias ressuspendidas foram agitadas em vortex e incubadas, em banho-maria, à temperatura de 100°C

por 10 minutos. Após o tempo estipulado, as suspensões bacterianas foram esfriadas em temperatura ambiente e submetidas ao procedimento de centrifugação por 2 minutos a 8.000 x g em micro centrífuga (Eppendorf® Minispin®). O sobrenadante, contendo o DNA extraído, foi transferido para um microtubo de 0,6mL e armazenado em freezer à temperatura aproximada de -20°C para realização dos testes moleculares.

4.5.2 Preparo de reação para detecção dos genes por PCR (Reação em Cadeia da Polimerase)

Para a detecção dos genes tanto de identificação quanto de resistência a antimicrobianos, foram realizadas reações de PCR utilizando 25 µL de volume total, cujas concentrações dos reagentes foram: 1X de tampão (10 mM Tris-HCl, pH 9,0; 50 mM KCl; 0,1% Triton X-100), 3 mM de MgCl₂ (Invitrogen®), 0,4 µM de cada oligoiniciador, 0,2 mM de dNTP (Invitrogen®), 1 U de *Taq* polimerase (Invitrogen®), água ultrapura para completar o volume total da reação e 20 ng do DNA total extraído da cepa a ser testada. Para a amplificação foi utilizado o termociclador TC-9639 (Loccus Biotecnologia®) e as condições de ciclagem para cada gene trabalhado encontram-se descritas ao longo desta dissertação nos quadros de exposição de cada iniciador utilizado, com sua devida referência. Os amplicons foram avaliados por eletroforese em gel de agarose 1,5% revelado com SYBR Green (Invitrogen®) e visualizados através do sistema de captura de imagem em Transiluminador L-PIX EX (Loccus Biotecnologia®).

4.5.3 *Staphylococcus* spp.

4.5.3.1 Identificação genotípica de *Staphylococcus* spp.

A confirmação do gênero *Staphylococcus* spp. foi realizada por reação em cadeia da polimerase (PCR) para o gene 16S *r*RNA descrita por Zhang *et al.* (2004), modificada e padronizada pelo LabacVet da UFRRJ com a concentração de 0,8µM de *primers*. A PCR dos genes *coa* (HOOKEY *et al.*, 1998) e *nuc* (CIFTCI *et al.*, 2009) foi realizada para caracterizar a espécie *S. aureus*, enquanto a PCR do gene *nuc* (SASAKI *et al.*, 2010) foi realizada para identificação *S. pseudintermedius* (Quadro 5). As cepas *S. aureus* ATCC® 25923 e *S. pseudintermedius* CD93 foram utilizadas como controles positivos.

Quadro 5. Iniciadores e ciclos empregados para amplificação dos genes de identificação do gênero *Staphylococcus* spp. e de espécies de SCP

Gene (fragmento)	Espécie	Sequência dos iniciadores (5'-3')	Ciclos *	Referência
16S rRNA (756 pb)	<i>Staphylococcus</i> spp.	AACTCTGTTATTAGGGAAGAACA CCACCTTCCTCCGGTTTGTACC	1	ZHANG <i>et al.</i> , 2004
<i>coa</i> (variável)	<i>S. aureus</i>	ATAGAGATGCTGGTACAGG GCTTCCGATTGTTCGATGC	2	HOOKEY <i>et al.</i> , 1998
<i>nuc</i> (279 pb)	<i>S. aureus</i>	GCGATTGATGGTGATACGGTT AGCCAAGCCTTGACGAACTAAAGC	3	CIFTCI <i>et al.</i> , 2009
<i>nuc</i> (926 pb)	<i>S. pseudintermedius</i>	TRGGCAGTAGGATTCGTTAA CTTTTGTGCTYCMTTTTGG	4	SASAKI <i>et al.</i> , 2010

*1. 94°C 5min (94°C 1 min, 55°C 1 min, 72°C 1 min) x 30 e 72°C 10 min; 2. 94°C 4 min (94°C 1 min, 60°C 1 min, 72°C 1 min) x 30 e 72°C 5 min; 3. 94°C 5 min (94°C 45 seg, 68°C 45 seg e 72°C 90 seg) x 30 e 72°C 10 min; 4. 95°C 2min (95°C 30 seg, 56°C 35 seg, 72°C 60 seg) x 30 e 72°C 2 min.

4.5.3.2 Caracterização da resistência genotípica de *Staphylococcus* spp. aos beta-lactâmicos

A pesquisa genotípica da resistência à metilina foi realizada para todos os isolados de *Staphylococcus* spp., inclusive para aqueles que se mostraram fenotipicamente sensíveis aos beta-lactâmicos. Tal pesquisa se deu através da PCR para detecção do gene *mecA* utilizando primers descritos por Murakami *et al.* (1991). Também foi realizada PCR para detecção do gene *blaZ*, que codifica a produção de beta-lactamases no gênero bacteriano em estudo (ROSATO *et al.*, 2003), conforme Quadro 6. Para detecção destes genes foram realizadas reações de PCR seguindo metodologia citada anteriormente no item 4.5.2. Foram utilizados como controle-positivos das reações: *S. aureus* ATCC® 43300 para o gene *mecA*, e *S. aureus* ATCC® 29213 para o gene *blaZ*.

Quadro 6. Iniciadores e ciclos empregados para amplificação dos genes de resistência aos beta-lactâmicos em *Staphylococcus* spp.

Gene (fragmento)	Sequência dos iniciadores (5'-3')	Ciclos *	Referência
<i>mecA</i> (533 pb)	AAAATCGATGGTAAAGGTTGGC AGTTCTGCAGTACCGGATTTGC	1	MURAKAMI <i>et al.</i> , 1991
<i>blaZ</i> (861 pb)	TACAACTGTAATATCGGAGG CATTACACTCTTGGCGGTTT	2	ROSATO <i>et al.</i> , 2003

*1. 94°C 4 min (94°C 30 s, 53°C 30 s, 72°C 1 min) x 30 e 72°C 4 min; 2. 94°C 5min. (94°C 30s, 58°C 30s, 72°C 30s) x 35 e 72°C 5min.

4.5.3.3 Caracterização da resistência genotípica de *Staphylococcus* spp. à vancomicina

A pesquisa genotípica da resistência à vancomicina foi realizada para todos os isolados de *Staphylococcus* spp. Tal pesquisa se deu através da PCR para detecção do gene *vanA* utilizando *primers* descritos por Kariyama *et al.* (2000), conforme Quadro 7. Foram utilizadas como controle-positivos das reações cepas padrão cedidas pelo Laboratório de Pesquisa em Infecção Hospitalar do Instituto Oswaldo Cruz (LAPIH/IOC/Fiocruz).

Quadro 7. Iniciadores e ciclos empregados para amplificação dos genes de resistência à vancomicina em *Staphylococcus* spp.

Gene (fragmento)	Sequência dos iniciadores (5'-3')	Ciclo *	Referência
<i>vanA</i> (649pb)	CATGAATAGAATAAAAAGTTGCAATA CCCCTTTAACGCTAATACGATCAA	1	KARIYAMA <i>et al.</i> , 2000

*1. 94°C 5 min (94°C 1 min, 54°C 1 min, 72°C 1 min) x 30 e 72°C 5 min.

4.5.4 *Enterococcus* spp.

4.5.4.1 Identificação genotípica de *Enterococcus* spp.

A confirmação da identificação de *Enterococcus* spp. foi realizada através de PCR com a utilização de *primers* gênero-específicos que amplificam o gene *tuf* (KE *et al.*, 1999) (Quadro 8). Foi utilizada como controle-positivo das reações uma cepa padrão cedida pelo Laboratório de Pesquisa em Infecção Hospitalar do Instituto Oswaldo Cruz (LAPIH/IOC/Fiocruz).

Quadro 8. Iniciadores e ciclos empregados para amplificação dos genes de identificação de *Enterococcus* spp.

Gene (fragmento)	Gênero	Sequência dos iniciadores (5'-3')	Ciclo *	Referência
<i>tuf</i> Ent (112 pb)	<i>Enterococcus</i> spp.	TACTGACAAACCATTTCATGATG AACTTCGTCACCAACGCGAAC	1	KE <i>et al.</i> , 1999

*1. 95°C 3min (95°C 30 seg, 55°C 30 seg, 72°C 1 min) x 35 e 72°C 7 min.

4.5.4.2 Caracterização da resistência genotípica de *Enterococcus* spp. à vancomicina

A pesquisa genotípica da resistência à vancomicina foi realizada para todos os isolados de *Enterococcus* spp. Tal pesquisa se deu através da PCR para detecção dos genes *vanA* e *vanB* utilizando *primers* descritos por Kariyama *et al.* (2000), conforme Quadro 9. Foram utilizadas como controle-positivos das reações cepas padrão cedidas pelo Laboratório de Pesquisa em Infecção Hospitalar do Instituto Oswaldo Cruz (LAPIH/IOC/Fiocruz).

Quadro 9. Iniciadores e ciclos empregados para amplificação dos genes de resistência à vancomicina em *Enterococcus* spp.

Gene (fragmento)	Sequência dos iniciadores (5'-3')	Ciclo *	Referência
<i>vanA</i> (649pb)	CATGAATAGAATAAAAAGTTGCAATA CCCCTTTAACGCTAATACGATCAA	1	KARIYAMA <i>et al.</i> , 2000
<i>vanB</i> (432pb)	GTGACAAACCGGAGGCGAGGA CCGCCATCCTCCTGCAAAAAA		

*1. 94°C 5 min (94°C 1 min, 54°C 1 min, 72°C 1 min) x 30 e 72°C 5 min.

4.5.5 Bastonetes Gram-negativos (BGN)

Foi realizada a PCR para o gene 16S *rDNA* (SUZUI & GIOVANNONI, 1996) a fim de caracterizar qualitativamente o DNA de origem bacteriana (Quadro 10). Foi utilizada como controle a cepa padrão *E. coli* ATCC® 25922.

Quadro 10. Iniciadores e ciclo empregado para amplificação dos genes 16S *rDNA* bacteriano para isolados da Ordem Enterobacterales

Gene (fragmento)	Espécie	Sequência dos iniciadores (5'-3')	Ciclos *	Referência
16S <i>rDNA</i> (1500 pb)	DNA ribossomal bacteriano	AGAGTTTGATCCTGGCTCAG ACGGCTACCTTGTTACGACT	1	SUZUI & GIOVANNONI, 1996

*1. 94°C 5min (94°C 1 min, 65°C 1 min, 72°C 1 min) x 30 e 72°C 5 min.

4.5.5.1 Caracterização da resistência genotípica aos beta-lactâmicos

4.5.5.1.1 Pesquisa de beta-lactamase de espectro estendido (ESBL)

A pesquisa por genes que conferem resistência aos beta-lactâmicos mediada pela produção de enzimas do tipo ESBL foi realizada para todos os isolados caracterizados como bastonetes Gram-negativos. Tal pesquisa se deu através da técnica de PCR para detecção dos genes *bla*_{CTX-M-1}, *bla*_{SHV} e *bla*_{TEM}, utilizando *primers* descritos por Geser *et al.* (2012), Shahid (2010) e Minarini *et al.* (2007), respectivamente, conforme descrito no Quadro 11. Foi utilizada como controle-positivo das reações para os genes *bla*_{CTX-M-1}, *bla*_{SHV} e *bla*_{TEM} a cepa *Klebsiella pneumoniae* CCBH 6556.

Quadro 11. Iniciadores e ciclos empregados para amplificação dos genes de resistência aos beta-lactâmicos que codificam enzimas do tipo ESBL

Gene (fragmento)	Sequência dos iniciadores (5'-3')	Ciclos *	Referência
<i>bla</i> _{CTX-M-1} (862 pb)	AAAAATCACTGCGCCAGTTC CCGTCGGTGACGATTTTAGCC	1	GESER <i>et al.</i> , 2012
<i>bla</i> _{SHV} (930 pb)	TTTATCGGCCCTCACTCAAGG GCTGCGGGCCGGATAACG	2	SHAHID, 2010
<i>bla</i> _{TEM} (831 pb)	ATGAGTATTCAACATTTCCGTG TTACCAATGCTTAATCAGTGAG	3	MINARINI <i>et al.</i> , 2007

***1.** 94°C 5 min (94°C 1 min, 55°C 1 min, 72°C 1 min) x 40 e 72°C 5 min; **2.** 94°C 3 min (94°C 30 s, 56°C 30 s, 72°C 1 min) x 32 e 72°C 10 min; **3.** 94°C 5 min (94°C 1 min, 55°C 1 min, 72°C 1 min) x 40 e 72°C 5 min.

4.5.5.1.2 Pesquisa de beta-lactamase do tipo carbapenemase

Foi realizada a pesquisa por genes de resistência aos beta-lactâmicos através da expressão de enzimas do tipo carbapenemase para todos os isolados caracterizados como bastonetes Gram-negativos. Essa pesquisa ocorreu através da utilização da técnica de PCR multiplex para detecção dos genes *bla*_{KPC}, *bla*_{NDM} e *bla*_{OXA-48}, utilizando *primers* e ciclo de amplificação descritos por Monteiro *et al.* (2012), conforme Quadro 12. Foram utilizadas como controle-positivos das reações as seguintes cepas: *Klebsiella pneumoniae* CCBH 6556 para o gene *bla*_{KPC}, *Klebsiella pneumoniae* CCBH 16302 para o gene *bla*_{NDM} e *Klebsiella pneumoniae* CCBH 10079 para o gene *bla*_{OXA-48}.

Quadro 12. Iniciadores e ciclo empregado para amplificação dos genes de resistência aos beta-lactâmicos que codificam enzimas do tipo carbapenemase

PCR multiplex	Gene (fragmento)	Sequência dos iniciadores (5'-3')	Ciclos *	Referência
<i>bla</i> _{KNO}	<i>bla</i> _{KPC} (785 pb)	TCGCTAACTCGAAACAGG TTACTGCCCGTTGACGCCAATCC	1	MONTEIRO <i>et al.</i> , 2012
	<i>bla</i> _{NDM} (345 pb)	CGAAGCTGAGCACCGCATTA ATCTTGCCCTGATGCGCGTG		
	<i>bla</i> _{OXA-48} (177 pb)	TGTTTTTGGTGGCATCGAT GTAAMRATGCTTGGTTCGC		

***1.** 94°C 5 min (94°C 45 s, 60°C 45 s, 72°C 45 s) x 30 e 72°C 5 min.

4.5.5.2 Caracterização da resistência genotípica à colistina

A busca por genes que conferem potencial resistência à colistina foi realizada para todos os isolados bacterianos caracterizados como bastonetes Gram-negativos. Tal pesquisa se deu através da técnica de PCR Multiplex para detecção dos genes *mcr-1-5*, utilizando *primers* e ciclo descritos por Rebelo *et al.* (2018), e *mcr-6-9*, utilizando sequências iniciadoras e ciclo descritos por Borowiak *et al.* (2020), conforme Quadro 13. Foram utilizadas como controle-positivos das reações cepas padrão cedidas pelo Laboratório de Pesquisa em Infecção Hospitalar do Instituto Oswaldo Cruz (LAPIH/IOC/Fiocruz).

Quadro 13. Iniciadores e ciclos empregados para amplificação dos genes de resistência a colistina

PCR multiplex	Gene (fragmento)	Sequência dos iniciadores (5'-3')	Ciclos *	Referência
<i>mcr-1-5</i>	<i>mcr-1</i> (320 pb)	AGTCCGTTTGTTCCTTGTGGC AGATCCTTGGTCTCGGCTTG	1	REBELO <i>et al.</i> , 2018
	<i>mcr-2</i> (715 pb)	CAAGTGTGTTGGTCGCAGTT TCTAGCCCGACAAGCATACC		
	<i>mcr-3</i> (929 pb)	AAATAAAAATTGTTCCGCTTATG AATGGAGATCCCCGTTTTT		
	<i>mcr-4</i> (1116 pb)	TCACTTTCATCACTGCGTTG TTGGTCCATGACTACCAATG		
	<i>mcr-5</i> (1644 pb)	ATGCGGTTGTCTGCATTTATC TCATTGTGGTTGTCCTTTTCTG		
<i>mcr-6-9</i>	<i>mcr-6</i> (252 pb)	GTCCGGTCAATCCCTATCTGT ATCACGGGATTGACATAGCTAC	2	BOROWIAK <i>et al.</i> , 2020
	<i>mcr-7</i> (551 pb)	TGCTCAAGCCCTTCTTTTCGT TTCATCTGCGCCACCTCGT		
	<i>mcr-8</i> (856 pb)	AACCGCCAGAGCACAGAATT TTCCCCAGCGATTCTCCAT		
	<i>mcr-9</i> (1011 pb)	GTATCCTTCCTGCCATCCTC CTTCCATAACAGCGAGACAC		

*1. 94°C 15 min (94°C 30 s, 58°C 90 s, 72°C 1 min) x 25 e 72°C 10 min; 2. 94°C 15 min (94°C 30 s, 58°C 90 s, 72°C 1 min) x 25 e 72°C 10 min.

4.6 Análise estatística

Os resultados referentes à frequência de isolamento bacteriano e aos perfis de suscetibilidade aos antimicrobianos testados foram expressos de modo percentual e analisados de forma descritiva. Foi utilizado o programa Excel (Microsoft®) para a confecção dos gráficos presentes neste trabalho.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Isolamento e identificação fenogenotípica de espécimes bacterianos

Foi realizada a coleta de 198 amostras dos 45 animais necropsiados na UFRRJ, sendo 155 *swabs* de diferentes sítios, 31 amostras de fragmentos de órgãos (fígado, rim e pulmão) e 2 amostras de material biológico (líquido do ceco e conteúdo do intestino delgado de equino). Do total de amostras coletadas, 60% (119/198) foram provenientes de animais de companhia, 32% (64/198) de animais de produção e 8% (15/198) foram amostras de animais selvagens. A pesquisa de bactérias gerou um total de 325 cepas, sendo 51,38% (167/325) fenotipicamente identificadas como pertencentes a Ordem Enterobacterales, distribuídas em 10 gêneros e 13 espécies distintas, 31,69% (103/325) como *Staphylococcus* spp., 12,62% (41/325) como *Enterococcus* spp., 2,46% (8/325) como *Streptococcus* spp. e 1,85% (6/325) como BGNNF (Figura 9).

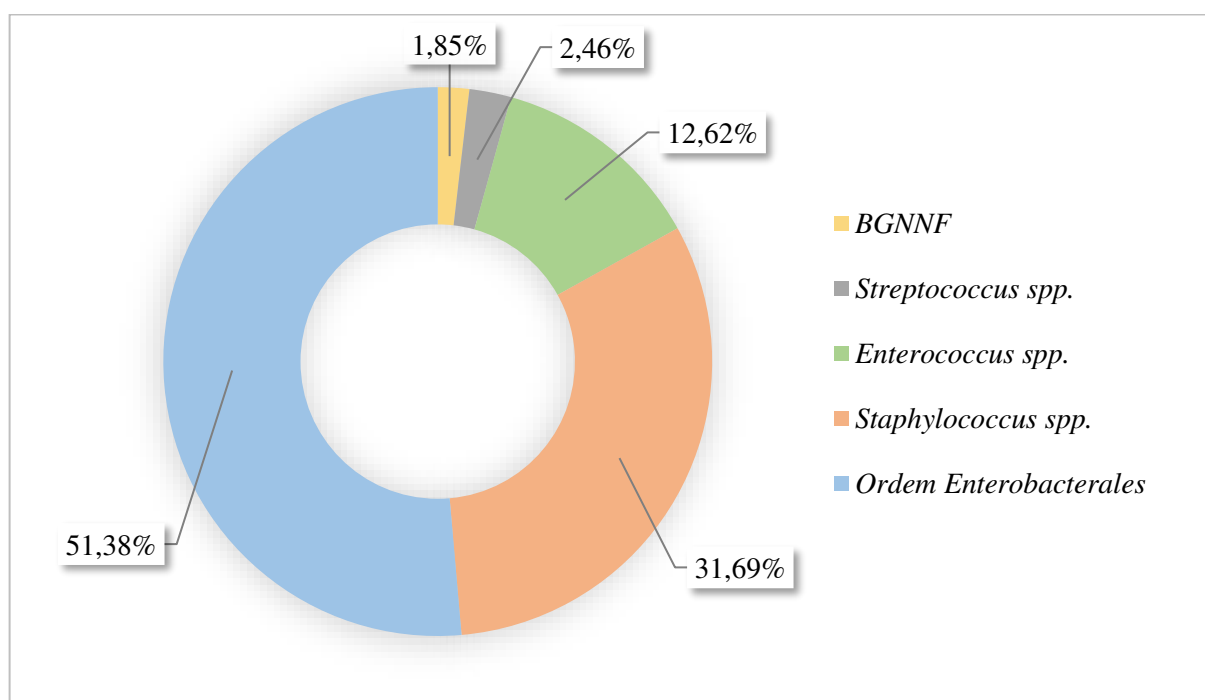


Figura 9. Percentual de isolados bacterianos definido a partir da identificação fenotípica.

A pesquisa de bactérias a partir das amostras coletadas dos animais de companhia gerou um total de 159 cepas (48,92% do total de isolados), sendo 48,43% (77/159) fenotipicamente identificadas como pertencentes a Ordem Enterobacterales, 34,59% (55/159) como *Staphylococcus* spp., 11,95% (19/159) como *Enterococcus* spp., 3,14% (5/159) como *Streptococcus* spp. e 1,89% (3/159) como BGNNF. Já a busca por espécimes bacterianas a partir das amostras coletadas dos animais de produção gerou um total de 140 cepas (43,08% do

total de isolados), sendo 56,43% (79/140) fenotipicamente identificadas como pertencentes a Ordem Enterobacterales, 27,14% (38/140) como *Staphylococcus* spp., 14,29% (20/140) como *Enterococcus* spp. e 2,14% (3/140) como BGNNF. Das amostras coletadas de animais selvagens foram isoladas 26 cepas (8% do total), sendo 42,31% (11/26) fenotipicamente identificadas como pertencentes a Ordem Enterobacterales, 38,46% (10/26) como *Staphylococcus* spp., 15,38% (4/26) como *Enterococcus* spp. e 3,85% (1/26) como *Streptococcus* spp. (Figura 10).

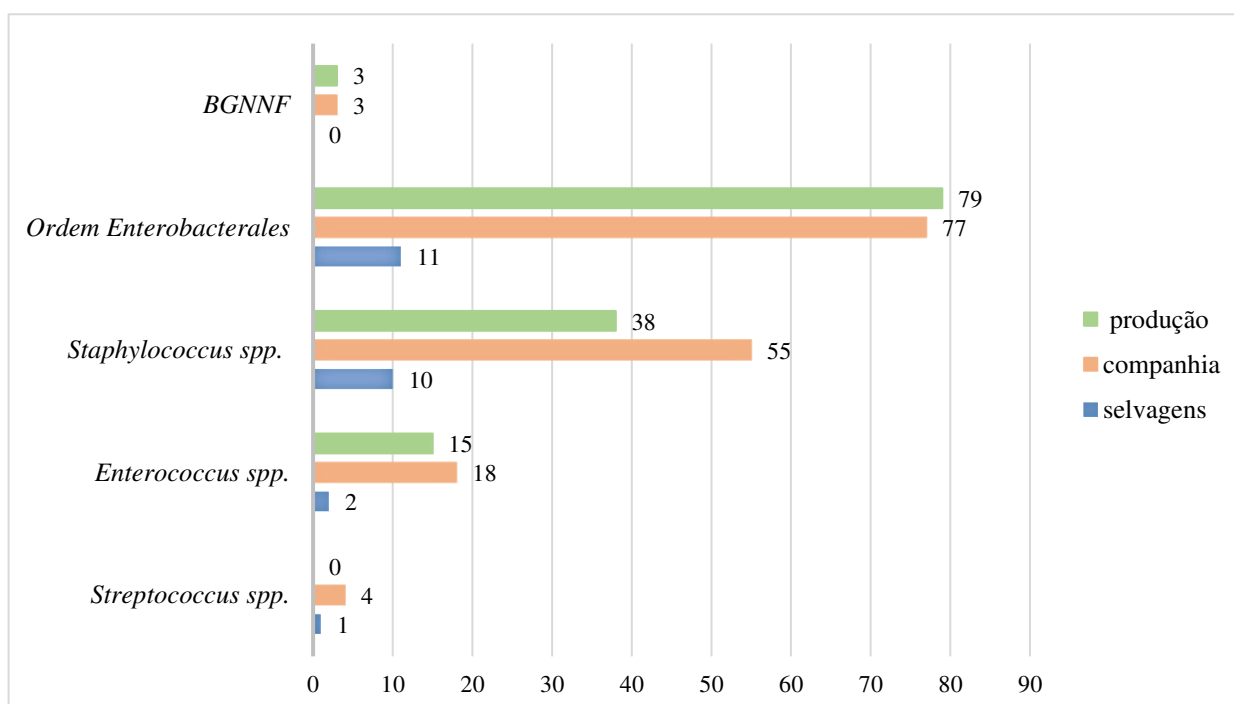


Figura 10. Frequência de isolados de cada grupo bacteriano a partir de amostras de animais de produção, companhia e selvagens definidos após identificação fenotípica.

As informações referentes à frequência de isolamento bacteriano por grupo animal (de companhia, de produção e selvagens) após as análises dos resultados de identificação fenotípica, proteômica e genotípica encontram-se descritas na Tabela 2.

Tabela 2. Relação dos isolados bacterianos por grupo animal após análise dos resultados de identificação por bioquímica, proteômica e genotípica

Grupo animal (n amostras)	Grupo bacteriano	Número de cepas
Animais de companhia (119)	SCNs	33
	SCPs	22
	<i>Streptococcus</i> spp.	4
	<i>Enterococcus</i> spp.	18
	Ordem Enterobacterales	77
	BGNNF	3
	Outros	2
Animais de produção (64)	SCNs	35
	SCPs	3
	<i>Streptococcus</i> spp.	-
	<i>Enterococcus</i> spp.	15
	Ordem Enterobacterales	79
	BGNNF	1
Animais selvagens (15)	SCNs	8
	SCPs	2
	<i>Streptococcus</i> spp.	1
	<i>Enterococcus</i> spp.	2
	Ordem Enterobacterales	11
	BGNNF	-
	Outros	2

Legenda: (n) – número de; (-) – não houve isolamento neste grupo bacteriano; BGNNF – Bastonetes Gram-negativos não fermentadores; SCNs – *Staphylococcus* spp. coagulase-negativos; SCPs – *Staphylococcus* spp. coagulase-positivos.

5.1.1 *Staphylococcus* spp.

Após a semeadura das 198 amostras coletadas dos animais de companhia, de produção e selvagens durante os exames de necropsia, foi obtido um total de 103 *Staphylococcus* spp. A maioria desses isolados foram negativos à prova da coagulase, sendo, portanto, identificados fenotipicamente como *Staphylococcus* coagulase-negativos (SCNs). Os SCNs representaram 86,41% (89/103) do total de *Staphylococcus* spp., o que atende às expectativas deste estudo por se tratarem de bactérias comensais encontradas de forma abundante na microbiota normal de animais. Apesar de serem componentes da microbiota, esses microrganismos são responsáveis por infecções ocasionais, a depender, entre outros fatores, do estado imunológico do animal que o alberga (KONEMAN *et al.*, 2018; MARKEY *et al.*, 2013).

Do total de isolados de *Staphylococcus* spp., 13,59% (14/103) foram positivos à prova da coagulase, sendo então fenotipicamente identificados como *Staphylococcus* coagulase-positivos (SCPs), dos quais 7,77% (8/103) foram identificados, através de provas bioquímicas, como *S. aureus* e 5,83% (6/103) como *S. pseudintermedius*.

A identificação proteômica dos SCNs, realizada através da técnica de MALDI-TOF MS, revelou que a espécie com maior frequência de isolamento foi *S. sciuri*, com 37,08% (33/89) do total de bactérias deste grupo. Também foram identificados, em menores quantidades, as seguintes espécies: *S. cohnii* como 8,99% (8/89) do total de ECNs isolados, *S. xylosus* como 7,87% (7/89), *S. haemolyticus* como 5,62% (5/89), *S. felis* e *S. gallinarum* como 3,37% (3/89), *S. kloosii* como 2,25% (2/89), *S. arlettae*, *S. epidermidis*, *S. lentus*, *S. saprophyticus*, *S. schleiferi*, *S. simulans* e *S. warneri* como 1,12% (1/89). 5,62% (5/89) dos ECNs não apresentaram espectro satisfatório no resultado da identificação proteômica e permaneceram apenas com a identificação fenotípica.

Além disso, 17,98% (16/89) dos isolados que foram negativos para a prova da coagulase tiveram resultados discordantes na identificação por MALDI-TOF MS; dos quais 13,48% (12/89) foram *S. pseudintermedius* e 4,49% (4/89) foram *S. aureus*. Relatos prévios de cepas atípicas de *S. aureus*, que se mostram negativas para a prova da coagulase, isoladas tanto de amostras clínicas humanas quanto de animais (MŁYNARCZYK *et al.*, 1998; WANGER *et al.*, 1992; FUNG *et al.*, 1984), corroboram com a ideia de que, neste caso, tratam-se de isolados atípicos de *S. aureus* coagulase-negativos. Não foi encontrado em literatura relato de *S. pseudintermedius* negativo para a prova da coagulase.

Os isolados fenotipicamente identificados como SCNs, mas que tiveram identificação proteômica divergente, direcionada para uma espécie de *Staphylococcus* spp. coagulase-

positiva, foram submetidos a reações de PCR para detecção de genes específicos de *S. aureus* (*coa* e *nuc*) e de *S. pseudintermedius* (*nuc*), assim como todos os SCPs (14/103) identificados no presente estudo. Dos 4 isolados de SCNs identificados por MALDI-TOF MS como sendo *S. aureus*, todos foram positivos para os genes *coa* (tamanho variável) e *nuc* (279 pb), confirmando, então, que são cepas atípicas de *S. aureus*. Com relação aos 12 isolados com identificação de SCNs por bioquimismo e de *S. pseudintermedius* por proteômica, 58,33% (7/12) foram positivos para o gene *nuc* (926 pb), confirmando a identificação de cepas atípicas de *S. pseudintermedius* coagulase-negativas, e 41,67% (5/12) foram negativos para todos os genes testados nas reações de PCR e permaneceram com a identificação fenotípica inicial de SCNs.

A evidenciação de cepas atípicas de *Staphylococcus* spp. levanta um questionamento sobre o impacto que esses achados podem gerar para uma identificação laboratorial que disponha apenas de técnicas fenotípicas, bioquímicas e fisiológicas, para fins de caracterização bacteriana. Nesses casos, a ausência dos recursos para identificação proteômica ou genotípica pode levar ao erro no diagnóstico do patógeno. Tratando-se de *Staphylococcus* spp., uma identificação correta é primordial para dar continuidade, de forma eficaz, às análises de resistência. Portanto, falhas na identificação bacteriana podem acarretar em desvio na análise da RAM, uma vez que impactam diretamente na seleção dos antimicrobianos a serem testados para a predição da resistência à metilina, por exemplo, bem como na leitura dos halos de inibição de crescimento bacteriano, que apresentam diferenças em seus pontos de corte a depender da espécie testada (CLSI VET08, 2020; CLSI, 2021). Dada a relevância da identificação bacteriana, haverá o desdobramento deste trabalho com o sequenciamento das cepas que apresentaram inconsistências entre as análises fenotípica, proteômica e molecular.

Dos 8 isolados identificados de forma fenotípica como *S. aureus*, todos apresentaram identificação proteômica e genotípica (*nuc* e *coa*) que confirmaram essa espécie. Com relação aos 6 isolados identificados, por bioquimismo, como *S. pseudintermedius*, 33,33% (2/6) apresentaram identificação por MALDI-TOF MS e genotípica (*nuc*) também positivas para essa espécie, confirmando a identificação inicial. Já os demais isolados, 66,67% (4/6), apresentaram *S. aureus* como resultado da identificação proteômica e também foram positivos na pesquisa dos genes *coa* e *nuc* específicos para *S. aureus*, sendo negativos na busca pelo gene *nuc* para *S. pseudintermedius*. Esses 4 isolados tiveram como identificação final a espécie de *S. aureus*.

Resultados fenotípicos e proteômicos conflitantes são passíveis de ocorrer, principalmente na Medicina Veterinária, onde há relatos de SCPs identificados erroneamente

uma vez que possuem muitas características fenotípicas em comum, dificultando o diagnóstico. Sasaki *et al.* (2010) afirmam que não existe um método fenotípico inteiramente confiável para distinguir as espécies coagulase-positivas em laboratórios de análises clínicas no ramo da Medicina Veterinária.

Na análise genotípica das cepas isoladas, 100% (103/103) apresentaram o gene 16S *r*RNA (756 pb), gene este utilizado como marcador molecular do gênero *Staphylococcus* spp. Além da confirmação de gênero, a presença desse gene foi importante por sinalizar a existência de material genético suficiente para as demais análises moleculares realizadas posteriormente. Com relação aos genes espécie-específicos, foram detectados os genes *coa* (tamanho variável) e *nuc* (279 pb) – marcadores de *S. aureus* – em 15,53% (16/103) dos isolados, enquanto que o gene *nuc* (926 pb) – marcador de *S. pseudintermedius* – foi detectado em 10,68% (11/103) dos isolados (Tabela 3).

A identificação final das espécies de *Staphylococcus* spp. se deu levando em consideração o resultado das provas bioquímicas, quando em concordância com a técnica proteômica com resultado de espectro entre 2.000 – 3.000, e a detecção dos genes espécie-específicos para SCPs.

Tabela 3. Comparativo dos resultados das identificações fenotípica, proteômica e genotípica das 30 cepas de *Staphylococcus* spp. coagulase-positivas em pelo menos uma das técnicas de identificação

Cepa isolada	Identificação fenotípica	PCR genes <i>coa</i> e <i>nuc</i>	MALDI-TOF (espectro)
18	<i>S. pseudintermedius</i>	<i>S. pseudintermedius</i>	<i>S. pseudintermedius</i> (2.019)
20	<i>S. pseudintermedius</i>	<i>S. pseudintermedius</i>	<i>S. pseudintermedius</i> (1.932)
57	<i>S. aureus</i>	<i>S. aureus</i>	<i>S. aureus</i> (2.187)
59	<i>S. aureus</i>	<i>S. aureus</i>	<i>S. aureus</i> (1.848)
116	SCN	-	<i>S. pseudintermedius</i> (1.938)
117	SCN	-	<i>S. pseudintermedius</i> (1.925)
118	SCN	<i>S. pseudintermedius</i>	<i>S. pseudintermedius</i> (1.998)
119	SCN	<i>S. pseudintermedius</i>	<i>S. pseudintermedius</i> (1.915)
177	SCN	-	<i>S. pseudintermedius</i> (2.354)
181	<i>S. aureus</i>	<i>S. aureus</i>	<i>S. aureus</i> (2.194)
182	<i>S. aureus</i>	<i>S. aureus</i>	<i>S. aureus</i> (2.143)
204	<i>S. pseudintermedius</i>	<i>S. aureus</i>	<i>S. aureus</i> (2.172)
232	SCN	-	<i>S. pseudintermedius</i> (1.841)
233	SCN	-	<i>S. pseudintermedius</i> (1.900)
249	<i>S. pseudintermedius</i>	<i>S. aureus</i>	<i>S. aureus</i> (2.175)
315	SCN	<i>S. pseudintermedius</i>	<i>S. pseudintermedius</i> (2.013)
335	SCN	<i>S. aureus</i>	<i>S. aureus</i> (2.271)
336	SCN	<i>S. aureus</i>	<i>S. aureus</i> (2.329)
337	SCN	<i>S. aureus</i>	<i>S. aureus</i> (2.433)
338	SCN	<i>S. pseudintermedius</i>	<i>S. pseudintermedius</i> (1.912)
339	<i>S. pseudintermedius</i>	<i>S. aureus</i>	<i>S. aureus</i> (2.216)
340	SCN	<i>S. pseudintermedius</i>	<i>S. pseudintermedius</i> (1.913)
350	SCN	<i>S. pseudintermedius</i>	<i>S. pseudintermedius</i> (2.112)
351	SCN	<i>S. pseudintermedius</i>	<i>S. pseudintermedius</i> (2.086)
370	SCN	<i>S. aureus</i>	<i>S. aureus</i> (2.124)
379	<i>S. aureus</i>	<i>S. aureus</i>	<i>S. aureus</i> (2.364)
382	<i>S. aureus</i>	<i>S. aureus</i>	<i>S. aureus</i> (2.088)
387	<i>S. aureus</i>	<i>S. aureus</i>	<i>S. aureus</i> (2.283)
389	<i>S. pseudintermedius</i>	<i>S. aureus</i>	<i>S. aureus</i> (2.269)
392	<i>S. aureus</i>	<i>S. aureus</i>	<i>S. aureus</i> (2.163)

Legenda: SCN – *Staphylococcus* spp. coagulase-negativo; (-) – resultado negativo para a pesquisa de todos os genes espécie-específicos.

5.1.2 *Streptococcus* spp. e *Enterococcus* spp.

A identificação presuntiva, realizada através de testes fenotípicos, revelou o isolamento de 8 cepas de *Streptococcus* spp. Desses isolados, 62,5% (5/8) tiveram o gênero confirmado por análise proteômica, dos quais apenas 40% (2/5) apresentaram espectro entre 2.000 e 3.000, possibilitando, então, a identificação em nível de espécie (Tabela 4), sendo duas cepas de *Streptococcus canis* isoladas de conduto nasal e pulmão de cão. Os demais isolados, 60% do total (3/5), tiveram sua identificação final limitada ao nível de gênero uma vez que seus espectros de massa foram inferiores a 2.000.

Seng e colaboradores (2010) relataram uma taxa de precisão de identificação espectrométrica de massa para o gênero *Streptococcus* spp. de 65,4% em um estudo comparando a técnica proteômica com o sequenciamento dos genes 16S *rRNA* e *rpoB*, indicando que a identificação de cepas deste gênero permanecia um desafio para a ferramenta MALDI-TOF MS, principalmente tratando-se de espécies com alto grau de parentesco evolutivo.

No entanto, pesquisas em áreas específicas da Medicina Veterinária demonstram o bom desempenho do MALDI-TOF MS para a identificação de cepas de *Streptococcus* spp., apresentando elevadas taxas de sensibilidade e especificidade; seja para espécimes clínicos isolados de suínos (PÉREZ-SANCHO *et al.*, 2017), para o diagnóstico de estreptococose em peixes (TORRES-CORRAL *et al.*, 2019) e até mesmo para a determinação de subespécies de *Streptococcus equi*, um importante patógeno tanto para animais quanto para seres humanos (KUDIRKIENE *et al.*, 2015).

Dois cepas isoladas de amostras de pulmão e de abscesso subcutâneo em região gradil costal do mesmo bovino foram identificadas fenotipicamente como *Streptococcus* spp. Entretanto, a análise proteômica revelou que, em ambos os casos, se tratava de *Trueperella pyogenes* (Tabela 8). Em laudo emitido pelo Setor de Anatomia Patológica da UFRRJ, referente aos exames de necropsia e histopatologia desse animal, foram relatados achados macroscópicos e histológicos compatíveis com tuberculose bovina. O exame complementar histoquímico de Ziehl-Neelsen revelou a presença de bacilos álcool-ácido resistentes apenas em seções histológicas de pulmão, sendo, de acordo com o laudo, *Mycobacterium bovis* o provável agente patogênico envolvido.

T. pyogenes, uma espécie bacteriana facilmente encontrada no ambiente, faz parte da microbiota de pele e mucosas dos tratos respiratório superior, gastrintestinal e urogenital de diversas espécies de animais domésticos e selvagens (RZEWUSKA *et al.*, 2019). No entanto,

um desequilíbrio no organismo do hospedeiro pode ocasionar uma variedade de infecções supurativas por *T. pyogenes*, tais como mastites e doenças uterinas em vacas leiteiras, abscessos hepáticos em bovinos confinados, pneumonia em suínos e abscessos em diversas espécies de animais domésticos de companhia e selvagens (KONEMAN *et al.*, 2018; MACHADO & BICALHO, 2014). Dessa forma, o isolamento de *T. pyogenes* a partir de amostra pulmonar de bovino que já apresentava acometimento por outro patógeno bacteriano pode ser explicado pelo caráter oportunista dessa espécie (RIBEIRO *et al.*, 2015), que se aproveitou de uma condição debilitante do animal para colonizar o seu trato respiratório inferior, além de ocasionar o processo infeccioso que resultou em abscesso subcutâneo na região da costela do mesmo.

Uma cepa isolada de amostra de conduto auditivo de felino e caracterizada fenotipicamente como *Streptococcus* spp., foi identificada pela técnica de MALDI-TOF como *Aerococcus viridans*, uma bactéria saprofítica encontrada em solo, plantas e diversos outros ambientes (SUKRU *et al.*, 2018). *A. viridans* raramente está associado a infecções em humanos, mas há relatos de casos de artrite, bacteremia, endocardite e meningite ocasionados por essa espécie, de caráter oportunista nos mesmos (EZECHUKWU *et al.*, 2019; KONEMAN *et al.*, 2018). Já em Medicina Veterinária, *A. viridans* tem sido descrito como o agente causador de artrite, pneumonia e meningite em bovinos e suínos, além de ocasionar infecções em frutos do mar (SUKRU *et al.*, 2018).

O gênero *Aerococcus* spp. apresenta características fenotípicas muito semelhantes aos gêneros *Streptococcus* spp. e *Enterococcus* spp., o que acaba facilmente confundindo sua identificação em laboratórios clínicos (KONEMAN *et al.*, 2018; SUKRU *et al.*, 2018), daí a importância de se realizar a técnica de MALDI-TOF para identificação correta do patógeno com o intuito de definir tratamentos assertivos para infecções ocasionadas por *Aerococcus* spp.

Tabela 4. Resultados da identificação proteômica das cepas de *Streptococcus* spp.

Espécie de origem	Identificação fenotípica (n)	MALDI-TOF (escore)
Canina	<i>Streptococcus</i> spp. (2)	<i>Streptococcus canis</i> (Vd1)
	<i>Streptococcus</i> spp. (1)	<i>Streptococcus canis</i> (A)
	<i>Streptococcus</i> spp. (1)	<i>Streptococcus anginosus</i> (A)
Felina	<i>Streptococcus</i> spp. (1)	<i>Aerococcus viridans</i> (Vd1)
Bovina	<i>Streptococcus</i> spp. (2)	<i>Trueperella pyogenes</i> (Vd1)
<i>Puma concolor</i>	<i>Streptococcus</i> spp. (1)	<i>Streptococcus dysgalactiae</i> (A)

Legenda: (n) – número de cepas; Vd1 – verde (valor entre 2.000 e 2.299); (A) – amarelo (valor entre 1.700 e 1.999).

Dos 41 isolados bacterianos classificados presuntivamente como *Enterococcus* spp., através de testes fenotípicos, 85,37% (35/41) apresentaram o gene *tuf* (112 pb), confirmando

sua identificação em nível de gênero. Das 35 cepas identificadas como *Enterococcus* spp. pela técnica de PCR, todas foram confirmadas e tiveram sua espécie caracterizada com excelente espectro, entre 2.000 e 3.000, pela técnica proteômica (Tabela 5). As cepas que não amplificaram o gene *tuf* tiveram sua identificação proteômica direcionada a gêneros bacterianos semelhantes a *Streptococcus* spp. e *Enterococcus* spp., tais como *Lactococcus lactis*, *Lactococcus garvieae* e *Aerococcus viridans*. Esses resultados indicam que a ferramenta MALDI-TOF MS apresenta elevada acurácia para a identificação de enterococos isolados de animais, como já relatado por outros pesquisadores na Medicina Veterinária (STĘPIEŃ-PYŚNIAK *et al.*, 2017; NOWAKIEWICZ *et al.*, 2015).

Dentre os isolados confirmados como *Enterococcus* spp., foram identificadas cinco espécies distintas, das quais *E. faecalis* foi predominante, representando 68,57% (24/35) das cepas, seguida por *E. hirae* com 14,29% (5/35), *E. faecium* com 8,57% (3/35), *E. casseliflavus* 5,71% (2/35) e *E. durans* 2,86% (1/35). Das cepas de *E. faecalis*, 66,67% (16/24) foram isoladas a partir de amostras de cães. Tais resultados corroboram com a literatura, que aponta *E. faecalis* como a espécie de enterococos mais comumente isolada de humanos e de animais de companhia (DAMBORG *et al.*, 2008; MARKEY *et al.*, 2013, KATAOKA *et al.*, 2014).

Tabela 5. Resultados da identificação proteômica e genotípica de *Enterococcus* spp.

Espécie de origem	Bioquimismo (n)	MALDI-TOF (escore)	PCR gene <i>tuf</i> (n)
Canina	<i>Enterococcus</i> spp. (16)	<i>Enterococcus faecalis</i> (Vd1)	+ (16)
	<i>Enterococcus</i> spp. (2)	<i>Enterococcus hirae</i> (Vd2)	+ (2)
	<i>Enterococcus</i> spp. (1)	<i>Lactococcus lactis</i> (Vd1)	- (1)
Bovina	<i>Enterococcus</i> spp. (2)	<i>Enterococcus hirae</i> (Vd2)	+ (2)
	<i>Enterococcus</i> spp. (1)	<i>Aerococcus viridans</i> (Vd1)	- (1)
<i>Lithobates catesbeianus</i> – rã touro	<i>Enterococcus</i> spp. (2)	<i>Enterococcus casseliflavus</i> (Vd1)	+ (2)
	<i>Enterococcus</i> spp. (1)	<i>Lactococcus garvieae</i> (Vd1)	- (1)
	<i>Enterococcus</i> spp. (1)	<i>Lactococcus lactis</i> (Vd1)	- (1)
Equina	<i>Enterococcus</i> spp. (2)	<i>Enterococcus faecalis</i> (Vd1)	+ (2)
	<i>Enterococcus</i> spp. (1)	<i>Enterococcus faecium</i> (Vd2)	+ (1)
<i>Gallus gallus</i>	<i>Enterococcus</i> spp. (5)	<i>Enterococcus faecalis</i> (Vd1)	+ (5)
	<i>Enterococcus</i> spp. (1)	<i>Enterococcus faecium</i> (Vd1)	+ (1)
<i>Anser cygnoides</i>	<i>Enterococcus</i> spp. (1)	<i>Enterococcus hirae</i> (Vd1)	+ (1)
	<i>Enterococcus</i> spp. (1)	<i>Enterococcus faecium</i> (Vd1)	+ (1)
<i>Didelphis aurita</i>	<i>Enterococcus</i> spp. (1)	<i>Enterococcus faecalis</i> (Vd1)	+ (1)
	<i>Enterococcus</i> spp. (1)	<i>Lactococcus garvieae</i> (Vd1)	- (1)
	<i>Enterococcus</i> spp. (1)	<i>Lactococcus lactis</i> (Vd1)	- (1)
Anuro – rã	<i>Enterococcus</i> spp. (1)	<i>Enterococcus durans</i> (Vd1)	+ (1)

Legenda: (n) – número de cepas; Vd1 – verde (valor entre 2.000 e 2.299); Vd2 – verde (valor entre 2.300 e 3.000); (+) – resultado positivo; (-) – resultado negativo.

5.1.3 Bastonetes Gram-negativos

5.1.3.1 Ordem Enterobacterales

A identificação de bastonetes Gram-negativos por testes bioquímicos revelou o isolamento de 167 cepas pertencentes a Ordem Enterobacterales, das quais *Escherichia coli* foi a espécie predominante totalizando 39,52% (66/167). *Klebsiella pneumoniae* foi a segunda espécie mais frequente, identificada em 13,17% (22/167) das cepas, seguida por *Proteus mirabilis*, que representou 11,38% (19/167), e *Enterobacter cloacae*, com 7,19% (12/167) do total de espécimes isolados. Outras nove espécies de enterobactérias foram identificadas fenotipicamente com frequência de isolamento igual ou inferior a 3,59% (6/167). Não foi possível caracterizar por bioquimismo 14,97% (25/167) das cepas isoladas.

Foram realizadas análises complementares através da técnica de MALDI-TOF MS a fim de identificar as 25 cepas não caracterizadas de forma fenotípica, bem como comparar os resultados obtidos neste teste com os do método clássico. Os perfis de identificação por bioquimismo e proteômica das cepas da Ordem Enterobacterales isoladas neste estudo encontram-se descritos na Tabela 6.

A análise comparativa entre os resultados de identificação obtidos através das técnicas fenotípica, por bioquimismo, e proteômica revelou que 92,96% (132/142) das cepas tiveram resultados compatíveis e 7,04% (10/142) apresentaram discordância nos resultados das duas técnicas de caracterização. Em estudo de identificação de 2.263 cepas bacterianas aeróbias Gram-negativas, Faron *et al.* (2015) relataram elevada correlação entre as técnicas fenotípica e proteômica, com 99,78% (2.258/2.263) de detecção correta em nível de gênero e 98,19% (2.222/2.263) em nível de espécie. Tais resultados demonstram que a técnica de MALDI-TOF é uma ferramenta rápida e confiável para identificação de bactérias Gram-negativas.

Dentre os resultados que apresentaram divergência entre os métodos de identificação fenotípico e proteômico destaca-se o perfil de número 10 (Tabela 6), no qual cinco cepas bioquimicamente caracterizadas como *Klebsiella pneumoniae* foram identificadas como *Klebsiella variicola* pela técnica de MALDI-TOF. *K. variicola* é uma bactéria que compõe o complexo *K. pneumoniae*, grupo esse formado por sete espécies cuja diferenciação através dos métodos tradicionais não é viável por conta das várias características bioquímicas e fenotípicas que compartilham. No entanto, a identificação precisa de *K. variicola* é de extrema importância por se tratar de um patógeno humano em emergência e com crescente detecção de genes de resistência a antimicrobianos e de virulência (RODRÍGUEZ-MEDINA *et al.*, 2019). Sendo

assim, a análise proteômica possibilita a identificação de forma correta das espécies pertencentes ao complexo *Klebsiella pneumoniae* de modo a contribuir para um melhor entendimento sobre a epidemiologia das infecções causadas por cada uma delas.

Conforme demonstrado no perfil 8 (Tabela 6), todas as cepas de *E. coli* foram identificadas com excelente espectro, entre 2.000 e 3.000, o que corrobora com Rodrigues *et al.* (2016), que comprovaram que o método de identificação por bioquimismo apresenta elevado grau de concordância com a ferramenta MALDI-TOF MS. No entanto, uma cepa caracterizada como *Shigella* spp. por bioquimismo foi identificada como *E. coli* pela técnica proteômica (perfil 17 – Tabela 6), análise essa, realizada duas vezes, em triplicata e apresentando espectro acima de 2.300.

E. coli e *Shigella* spp. são espécies que, apesar de pertencerem a grupos taxonômicos distintos, possuem sequências gênicas e expressão proteica muito semelhantes, dificultando a sua classificação e diferenciação por MALDI-TOF MS (LAN *et al.*, 2004). Com relação a tipagem de *E. coli* e *Shigella*, Feng *et al.* (2020) apontam que os resultados do MALDI-TOF MS têm maior acurácia e confiabilidade quando seus dados são combinados com os provenientes da técnica de Espectroscopia no Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR). Dessa forma, os resultados obtidos a partir das técnicas bioquímica e proteômica não forneceram subsídios para confirmar a identificação da cepa isolada neste estudo (perfil 17), uma vez que a mesma apresentou características fenotípicas de *Shigella* spp. que já foram descritas em cepas de *E. coli*, ditas bioquimicamente inativas, isoladas de amostras clínicas de seres humanos, tais como a não fermentação de lactose e a ausência de motilidade (GAJDÁCS *et al.*, 2020).

Além disso, foram identificadas outras quatro cepas com divergência de resultado entre os métodos de caracterização fenotípica e proteômica, cepas essas descritas nos perfis de número 3, 11, 13 e 18 (Tabela 6).

Dentre as cepas cuja identificação ficou restrita a técnica de MALDI-TOF, 60% (15/25) foram identificadas como *Citrobacter freundii*, 12% (3/25) foram *Leclercia adecarboxylata*, 8% (2/25) foram *Enterobacter bugandensis* e 4% (1/25) foram identificadas como *Aeromonas jandaei*, *Aeromonas veronii*, *Citrobacter braakii*, *Klebsiella aerogenes* e *Mixta calida*.

Tabela 6. Perfil da identificação fenotípica e proteômica dos isolados da Ordem Enterobacterales

Perfil	Bioquimismo (n)	MALDI-TOF (escore)
1	<i>Citrobacter amalonaticus</i> (2)	<i>Citrobacter amalonaticus</i> (Vd1)
2	<i>Citrobacter koseri</i> (1)	<i>Citrobacter koseri</i> (Vd2)
3	<i>Citrobacter koseri</i> (1)	<i>Raoultella ornithinolytica</i> (Vd2)
4	<i>Citrobacter freundii</i> (2)	<i>Citrobacter freundii</i> (Vd2)
5	<i>Edwardsiella tarda</i> (6)	<i>Edwardsiella tarda</i> (Vd2)
6	<i>Enterobacter aerogenes</i> (2)	<i>Enterobacter aerogenes</i> (Vd1)
7	<i>Enterobacter cloacae</i> (12)	<i>Enterobacter cloacae</i> (Vd1)
8	<i>Escherichia coli</i> (66)	<i>Escherichia coli</i> (Vd1/Vd2)
9	<i>Klebsiella pneumoniae</i> (16)	<i>Klebsiella pneumoniae</i> (Vd1/Vd2)
10	<i>Klebsiella pneumoniae</i> (5)	<i>Klebsiella variicola</i> (Vd1/Vd2)
11	<i>Klebsiella pneumoniae</i> (1)	<i>Klebsiella oxytoca</i> (Vd2)
12	<i>Morganella morganii</i> (3)	<i>Morganella morganii</i> (Vd2)
13	<i>Morganella morganii</i> (1)	<i>Enterobacter bugandensis</i> (Vd1)
14	<i>Proteus mirabilis</i> (19)	<i>Proteus mirabilis</i> (Vd1/Vd2)
15	<i>Providencia stuartii</i> (2)	<i>Providencia stuartii</i> (Vd2)
16	<i>Serratia marcescens</i> (1)	<i>Serratia marcescens</i> (Vd1)
17	<i>Shigella</i> spp. (1)	<i>Escherichia coli</i> (Vd2)
18	<i>Shigella</i> spp. (1)	<i>Plesiomonas shigelloides</i> (Vd1)
19	NI (1)	<i>Aeromonas jandaei</i> (Vd1)
20	NI (1)	<i>Aeromonas veronii</i> (Vd1)
21	NI (1)	<i>Citrobacter braakii</i> (Vd1)
22	NI (15)	<i>Citrobacter freundii</i> (Vd1/Vd2)
23	NI (2)	<i>Enterobacter bugandensis</i> (Vd1)
24	NI (1)	<i>Klebsiella aerogenes</i> (Vd1)
25	NI (3)	<i>Leclercia adecarboxylata</i> (Vd2)
26	NI (1)	<i>Mixta calida</i> (Vd2)

Legenda: (n) – número de cepas; NI – não identificado; Vd1 – verde (valor entre 2.000 e 2.299); Vd2 – verde (valor entre 2.300 e 3.000).

5.1.3.2 BGNNF

Foram isoladas seis cepas de bastonetes Gram-negativos não fermentadores de glicose, sendo uma delas identificada por análises fenotípicas e comprovada pela técnica de MALDI-TOF como *Pseudomonas aeruginosa*, conforme descrito no perfil 1 (Tabela 7). Não foi possível realizar a caracterização por bioquimismo das outras cinco cepas, que tiveram sua identificação em nível de gênero ou de espécie a partir dos resultados provenientes da técnica proteômica.

A cepa de *Pseudomonas aeruginosa* foi isolada de amostra coletada de lesão em focinho de cão cujo laudo de necropsia, emitido pelo Setor de Anatomia Patológica da UFRRJ, relatou achados histopatológicos da pele compatíveis com distúrbios imunomediados, como lúpus. No histórico do animal foi relatada a realização de tratamento com amoxicilina, mas sem melhora do quadro clínico. Posteriormente, com prescrição de medicamento corticoide associado à cefalexina, o animal apresentou melhora clínica. Nesse caso, não foi obtido sucesso clínico no primeiro tratamento realizado no animal uma vez que *Pseudomonas aeruginosa* é uma espécie que possui resistência intrínseca à amoxicilina tanto quando utilizada de forma isolada quanto associada a inibidores de beta-lactamases, como, por exemplo, o ácido clavulânico (CLSI, 2021).

A realização de exame de cultura e antibiograma é de extrema importância para a prescrição de tratamento adequado ao animal acometido por uma infecção bacteriana, de modo a reduzir a pressão de seleção de bactérias multirresistentes. Além disso, a identificação correta do patógeno orienta a execução do antibiograma, já que é importante considerar a resistência intrínseca da espécie bacteriana em questão antes de definir as bases antimicrobianas que serão testadas.

Duas cepas isoladas de fragmentos de fígado de dois exemplares de rãs touro (*Lithobates catesbeianus*), identificadas fenotipicamente como BGNNF, tiveram identificação proteômica inconclusiva, apresentando dois resultados com espectro elevado: *Pseudomonas putida* e *Pseudomonas monteilii* (perfil 2 – Tabela 7). Nesses casos, foi considerada a identificação em nível de gênero, onde ambas as cepas foram *Pseudomonas* spp. O mesmo ocorreu com uma cepa isolada de swab de secreção pulmonar de cão, cuja identificação proteômica revelou duas espécies com alto espectro: *Acinetobacter courvalinii* e *Acinetobacter vivianii* (perfil 4 – Tabela 7). A identificação desse isolado ficou restrita ao gênero *Acinetobacter* spp.

A partir da análise pela técnica de MALDI-TOF foi identificada uma cepa de *Acinetobacter baumannii* isolada de amostra de conteúdo de ceco de potro cuja causa mortis foi associada ao parasitismo intestinal por *Strongyloides westeri* (perfil 3 – Tabela 7). A.

baumannii, uma das espécies bacterianas mais importantes em infecções humanas (VAN DER KOLK *et al.*, 2019), faz parte do complexo *Acinetobacter calcoaceticus*-*Acinetobacter baumannii* (Acb) juntamente com *A. calcoaceticus*, *A. pittii*, *A. nosocomialis*, *A. seifertii* e *A. dijkschoorniae*. Todas estão intimamente relacionadas e exibem características fenotípicas e bioquímicas muito semelhantes, o que torna difícil a distinção individual em nível de espécie (VIJAYAKUMAR *et al.*, 2019). A precisão na identificação desses agentes clinicamente importantes só é possível com métodos moleculares, e a detecção e sequenciamento do gene *rpoB* é considerada o padrão ouro (LaSCOLA *et al.*, 2006). É muito provável que *A. baumannii* também se torne um patógeno veterinário nosocomial grave, semelhante ao que aconteceu em hospitais humanos, visto que sua associação com infecções em animais é cada vez mais relatada (VAN DER KOLK *et al.*, 2019).

Além disso, uma cepa isolada de *swab* de conduto auditivo de cão teve como caracterização proteômica a espécie *Acinetobacter lactucae*. Entretanto, como apresentou escore abaixo do que é considerado satisfatório para nível de espécie, teve sua identificação limitada ao gênero (perfil 5 – Tabela 7).

Tabela 7. Perfil da identificação fenotípica e proteômica dos isolados de BGNNF

Perfil	Bioquimismo (n)	MALDI-TOF (escore)
1	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (1)	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (Vd2)
2	BGNNF (2)	<i>Pseudomonas putida</i> (Vd1) + <i>Pseudomonas monteilii</i> (Vd1)
3	BGNNF (1)	<i>Acinetobacter baumannii</i> (Vd2)
4	BGNNF (1)	<i>Acinetobacter courvalinii</i> (Vd1) + <i>Acinetobacter vivianii</i> (Vd1)
5	BGNNF (1)	<i>Acinetobacter lactucae</i> (A)

Legenda: (n) – número de cepas; (+) – resultado de MALDI-TOF divergente na duplicata; BGNNF – Bastonete Gram-negativo não fermentador; A – amarelo (valor entre 1.700 e 1.999); Vd1 – verde (valor entre 2.000 e 2.299); Vd2 – verde (valor entre 2.300 e 3.000).

5.2 Caracterização da resistência fenogenotípica em *Staphylococcus* spp.

Das 103 cepas de *Staphylococcus* spp., foram obtidos dezessete perfis distintos de acordo com as espécies isoladas e os resultados fenotípicos encontrados nas técnicas de difusão em disco com oxacilina ou cefoxitina, penicilina, ágar *screen* com vancomicina, além da amplificação dos genes de resistência *mecA*, para detecção da resistência à meticilina, *blaZ*, para a detecção da resistência pela produção de beta-lactamases, e *vanA*, para detecção da resistência à vancomicina, que se encontram descritos na Tabela 8. Os perfis de números 4 – que corresponde a cinco cepas de *S. aureus*, 7 – três cepas de *S. pseudintermedius*, 9 – uma cepa de *S. schleiferi*, e 17 – trinta e nove cepas de SCNs, não apresentaram resistência fenotípica a nenhum dos testes realizados, tampouco houve, nos perfis mencionados, detecção de quaisquer um dos genes de resistência pesquisados neste estudo.

5.2.1 Resistência aos beta-lactâmicos em *Staphylococcus* spp.

As 103 cepas isoladas e identificadas como pertencentes ao gênero *Staphylococcus* spp. foram submetidas ao teste de difusão em disco para detecção fenotípica de resistência aos beta-lactâmicos. A pesquisa da resistência por produção de beta-lactamases, enzimas codificadas pelo gene *blaZ*, foi realizada com o disco de penicilina (10 UI). Já para a detecção de resistência fenotípica à meticilina por produção de PBP alterada, codificada pelo gene *mecA*, foram utilizados os discos de oxacilina (30 µg) na avaliação de *S. pseudintermedius* e de cefoxitina (30 µg) na avaliação de *S. aureus* e demais *Staphylococcus* spp., incluindo os SCNs (CLSI VET08, 2020; CLSI, 2021).

Do total, 50,49% (52/103) das cepas de *Staphylococcus* spp. apresentaram resistência fenotípica à penicilina, enquanto 49,51% (51/103) foram sensíveis a esse antimicrobiano. Este teste fenotípico, preconizado pelo CLSI (2021) para a detecção da produção de beta-lactamases em *S. aureus*, é realizado através da interpretação do crescimento na borda do halo de suscetibilidade. Um crescimento bacteriano com a borda difusa (*zona edge* negativa), indica que a cepa não é produtora de beta-lactamases. Já no caso de cepa que apresente crescimento com uma borda uniforme e bem delimitada (*zona edge* positiva), considera-se resistente aos beta-lactâmicos pela produção de beta-lactamases (CLSI, 2021). Uma vez que a síntese de beta-lactamases em *Staphylococcus* spp. é codificada pelo gene cromossomal ou plasmidial *blaZ* (MENDONÇA *et al.*, 2012) e sua detecção é classificada como padrão-ouro pelo CLSI, também foi realizada a PCR para detecção do mesmo.

Das cepas isoladas e caracterizadas como *S. aureus*, 68,75% (11/16) apresentaram resistência fenotípica à penicilina, das quais 90,91% (10/11) foram positivas para o teste de *zona edge* e houve a detecção do gene *blaZ* (perfis 1 e 2 – Tabela 8), confirmando a resistência pela produção de beta-lactamases. Todas as cepas de *S. aureus* sensíveis à penicilina no teste de difusão em disco, 31,25% (5/16), foram negativas para o teste de *zona edge* bem como para a detecção do gene *blaZ*, o que confirmou sua suscetibilidade a esse antimicrobiano. Com relação as cepas de *S. pseudintermedius*, 72,73% (8/11) apresentaram resistência fenotípica à penicilina com *zona edge* positiva e detecção do gene *blaZ* (perfis 5 e 6 – Tabela 8), o que confirmou a produção de penicilinase. Todas as cepas dessa espécie que foram sensíveis à penicilina tiveram resultado negativo tanto para o teste de *zona edge* quanto para a detecção do gene *blaZ*.

Dentre as cepas de ECNs que apresentaram resistência fenotípica à penicilina, 66,67% (22/33) foram positivas para o teste da *zona edge*, das quais houve detecção do gene *blaZ* em apenas 45,45% (10/22) (perfis 10 a 13 – Tabela 8). Segundo Kaase *et al.* (2008), embora o teste da *zona edge* seja considerado o método fenotípico mais sensível para detecção dessa penicilinase, algumas espécies que não apresentam determinantes genéticos para esta beta-lactamase podem ter resultado positivo no teste, acarretando em falso-positivo. Sendo assim, as inconsistências entre os achados deste estudo evidenciam a necessidade de confirmar, através de métodos moleculares, se o gene *blaZ* está presente nos isolados positivos para o ensaio fenotípico que avalia a borda do crescimento bacteriano.

Das cepas de ECNs sensíveis à penicilina, 4,65% (2/43) foram positivas no teste de *zona edge*, havendo, em ambas, a detecção do gene *blaZ* (perfil 14 – Tabela 8). Tais achados indicam que a sensibilidade detectada no teste de difusão em disco não é considerada confiável, o que corrobora com CLSI VET08 (2018), onde é relatado que, tratando-se de isolados de animais, *Staphylococcus* spp. produtores de beta-lactamases podem mostrar-se fenotipicamente sensíveis à penicilina. Considerando o fato de que as penicilinas estafilocócicas são facilmente induzíveis quando expostas a um beta-lactâmico (CAVALIER *et al.*, 2005, apud ALQUEIDÃO, 2018), há um risco elevado de falha terapêutica no tratamento de infecções causadas por esses agentes. Dessa forma, recomenda-se que *Staphylococcus* spp. suscetíveis à penicilina sejam testados para a produção de beta-lactamases antes de terem sua sensibilidade reportada ao clínico veterinário.

A resistência estafilocócica à meticilina é decorrente da produção de uma proteína de ligação à penicilina (PBP) alterada, denominada PBP2a, que possui baixa afinidade aos beta-

lactâmicos e impede que o antimicrobiano iniba a síntese da parede celular. Tal proteína é codificada pelo gene *mecA*, cuja transferência horizontal é facilitada uma vez que o mesmo está contido em um elemento genético móvel denominado Cassete Cromossômico Estafilocócico *mec* (ITO *et al.*, 2004; ZONG *et al.*, 2009). A expressão do gene *mecA* implica em resistência bacteriana a todas as penicilinas e demais fármacos da classe dos beta-lactâmicos, com exceção, até o momento, das seguintes cefalosporinas de última geração: ceftarolina e ceftobiprole (AMÂNCIO *et al.*, 2021).

Um total de 8,74% (9/103) das cepas apresentaram resistência fenotípica indicativa de produção de PBP2a, sendo duas cepas de *S. pseudintermedius* resistentes à oxacilina (perfil 5 – Tabela 8), uma cepa de *S. aureus* e seis SCNs resistentes à cefoxitina (perfis 1 e 10, respectivamente – Tabela 8). Foi detectada a presença do gene *mecA* em todas as cepas que apresentaram o fenótipo resistente, confirmando que essa resistência ocorreu devido a alteração do sítio de ligação do antimicrobiano pela produção de uma PBP modificada.

Além disso, o gene *mecA* foi detectado em duas cepas de SCNs que apresentaram sensibilidade no teste fenotípico de difusão em ágar com disco de cefoxitina, sendo um *S. haemolyticus* isolado de cão e um *S. cohnii* isolado de frango. Alguns autores alertam sobre a necessidade de revisão nos pontos de corte para resistência à meticilina em espécies de SCNs (JOHNSON *et al.*, 2014). Frigatto *et al.* (2005) identificaram cinco cepas de *S. epidermidis* que, apesar de fenotipicamente sensíveis à cefoxitina, tiveram o gene *mecA* detectado através de técnicas moleculares. Os achados de Ferreira e colaboradores (2012) corroboram com esse estudo, uma vez que foram relatadas discrepâncias entre as análises moleculares de detecção do gene *mecA* e o teste de difusão em ágar com discos de cefoxitina e oxacilina em isolados de SCNs, além de demonstrarem baixa especificidade nos testes fenotípicos e revelarem que os pontos de corte sugeridos pelo CLSI, para o grupo coagulase negativo, não estão alinhados com a determinação da resistência mediada pelo gene *mecA*. Portanto, de acordo com os achados deste estudo e relatos encontrados em literatura, a detecção do gene *mecA* pode ser considerada a técnica padrão ouro para análise de resistência à meticilina, principalmente tratando-se de SCNs.

Dentre as cepas nas quais foi detectado o gene *mecA*, um *S. aureus*, dois *S. pseudintermedius* e seis SCNs – sendo quatro *S. haemolyticus* e dois *S. sciuri* – foram provenientes de amostras coletadas de cães; um *S. cohnii* foi isolado a partir de *swab* de traqueia de frango de corte e um *S. sciuri* foi oriundo de amostra de conduto nasal de equino. Embora a identificação de *Staphylococcus* spp. coagulase-negativos resistentes à meticilina (SCNRM),

isolados de amostras animais, tenha ocorrido pela primeira vez na produção avícola há quase duas décadas (KAWANO *et al.*, 1996), desde então, já foram relatados casos em muitas outras espécies de animais com infecções clínicas por SCNRM. Devido a sua elevada capacidade em causar infecções oportunistas em indivíduos que apresentem lesões ou façam uso de dispositivos médicos invasivos, os SCNs são considerados bactérias de importância tanto para a Medicina Humana quanto em Veterinária. (TUNON *et al.*, 2008; ROGERS *et al.*, 2009).

Foi observado que as espécies de SCNs com presença do gene *mecA* mais frequentes neste estudo foram *S. haemolyticus* (50% - 4/8) e *S. sciuri* (37,5% - 3/8). Em pesquisa por *Staphylococcus* spp. resistentes à meticilina em cepas isoladas de frangos, Kawano e colaboradores (1996) identificaram a ocorrência de *S. sciuri* em uma frequência muito elevada quando comparado a outras espécies de SCNs. *Staphylococcus sciuri* resistente à meticilina tornou-se alvo de interesse em pesquisas científicas após a descoberta de que algumas cepas dessa espécie possuem um elemento genético *mecA* intimamente relacionado ao gene *mecA* encontrado em cepas de MRSA (SEVERIN *et al.*, 2010). Em estudo de *Staphylococcus sciuri* isolados de aves marinhas não migratórias de uma ilha oceânica remota, Saraiva e colaboradores (2021) concluíram que o gene *mecA* de cepas de MRSA clinicamente relevantes para seres humanos e animais tem origem em ancestrais de *S. sciuri*, que parece ser um reservatório natural de genes de resistência à meticilina, mesmo em ambientes com pressão de seleção antimicrobiana muito baixa. Dessa forma, a maior quantidade de isolados de *S. sciuri* com detecção do gene *mecA* neste estudo, considerando apenas SCNs, pode ser explicada por se tratar de uma espécie naturalmente carreadora desse elemento genético.

Estudos demonstram que *S. haemolyticus* e *S. epidermidis* são as principais espécies de SCNs envolvidas em infecções que acometem tanto seres humanos quanto animais (VENUGOPAL *et al.*, 2019). Somado a isso, os achados deste trabalho geram um alerta, do ponto de vista clínico, acerca da importância da determinação da sensibilidade ou resistência de cepas de *S. haemolyticus*, SCN cuja detecção do gene *mecA* ocorreu em maior frequência. Isso porque a terapia antimicrobiana em animais representa um risco de seleção de cepas resistentes que podem ser disseminadas não apenas para outros animais, mas também para seus tutores ou profissionais responsáveis por seus cuidados, bem como para o meio ambiente, tendo, portanto, implicação direta em Saúde Única.

Foi observado que 66,67% (18/27) dos SCPs apresentaram a produção de beta-lactamases como o mecanismo que confere resistência à penicilina, enquanto apenas 11,11% (3/27) deles apresentou resistência aos beta-lactâmicos por alteração de PBPs. Tais achados

apresentam similaridades com os resultados encontrados em literatura, como nos estudos de Brito *et al.* (2001), Garino *et al.* (2009) e Waller *et al.* (2011), que demonstram que a produção de beta-lactamases é o mecanismo mais comumente associado a resistência em *Staphylococcus* spp.

5.2.2 Resistência de *Staphylococcus* spp. à vancomicina

Todas as 103 cepas de *Staphylococcus* spp. isoladas neste estudo foram submetidas ao ágar *screen* para detecção fenotípica de resistência à vancomicina, das quais, apenas uma cepa de *S. haemolyticus* apresentou crescimento, sendo resistente ao teste (perfil 12 – Tabela 8). Foi realizada pesquisa do gene *vanA* em todos os isolados, mas não houve detecção desse elemento genético em nenhuma das cepas de *Staphylococcus* spp.

Esse resultado é esperado, visto que, em literatura, pesquisadores relatam poucos ou nenhum caso de resistência à vancomicina em animais. Em estudo comparativo da resistência antimicrobiana fenogenotípica de 70 cepas de *S. aureus* isoladas de diferentes fontes, sendo 25 a partir de amostras de seres humanos, 25 de animais domésticos e 20 de leite, Pahlavanzadeh *et al.* (2021) relataram maior resistência fenotípica aos beta-lactâmicos (78,5%), menor à ciprofloxacina (12,8%) e nenhuma à vancomicina, além de detectarem a presença dos genes de resistência *ermB* e *tetM* em todos os isolados, ao passo que não houve detecção do gene *vanA* em nenhuma das cepas. Em pesquisa similar envolvendo a análise da resistência antimicrobiana em *S. aureus* isolados de ovinos, de amostras de leite e de cuidadores desses animais, Akgül *et al.* (2021) isolaram 78 cepas, das quais 15,38% (12/78) apresentaram resistência fenotípica à metilicina e foram positivas para a pesquisa do gene *mecA*, por outro lado, todas as cepas foram sensíveis à vancomicina, não havendo detecção do gene *vanA* em nenhum dos isolados.

A expressão do gene *vanA*, um dos mecanismos de resistência à vancomicina descritos em *Staphylococcus* spp., leva a síntese de pentapeptídeos com alteração no aminoácido localizado na porção final da cadeia, que, por ser o sítio de reconhecimento do antimicrobiano, acaba impossibilitando a ligação e consequente ação da vancomicina e, dessa forma, a sobrevivência da célula bacteriana é mantida (CONG *et al.*, 2020).

No entanto, o principal mecanismo estafilocócico de resistência à vancomicina é decorrente do espessamento da parede celular bacteriana. Sendo assim, as cepas não suscetíveis produzem uma camada de peptidoglicano mais espessa que dificulta a passagem do antimicrobiano pela sua parede celular, impedindo que o mesmo alcance a membrana citoplasmática e possa, então, atuar nas moléculas precursoras dos pentapeptídeos, importantes

constituintes da parede celular bacteriana (HANAKI *et al.*, 1998; CUI *et al.*, 2000). O espessamento da parede celular é um dos mecanismos associados às cepas de *Staphylococcus* spp. com resistência intermediária à vancomicina (CONG *et al.*, 2020).

Dessa forma, a resistência que possibilitou o crescimento da cepa de *S. haemolyticus* em ágar *screen* para vancomicina pode ter ocorrido devido a síntese de uma camada mais espessa de peptidoglicano. No entanto, análises para determinação da concentração inibitória mínima (CIM) de vancomicina devem ser realizadas a fim de elucidar este achado. Isso porque, a resistência intermediária à vancomicina é definida com CIM de 4-8µg/mL para *S. aureus* e de 8-16µg/mL para as demais espécies de *Staphylococcus* spp. (CLSI, 2021).

Tabela 8. Perfil da análise fenogenotípica da resistência antimicrobiana

Perfil	Espécies (n)	DD OXA	DD CFO	DD PEN	AS VAN	PCR <i>mecA</i>	PCR <i>blaZ</i>	PCR <i>vanA</i>
1	<i>S. aureus</i> (1)	NP	R	R	-	+	+	-
2	<i>S. aureus</i> (9)	NP	S	R	-	-	+	-
3	<i>S. aureus</i> (1)	NP	S	R	-	-	-	-
4	<i>S. aureus</i> (5)	NP	S	S	-	-	-	-
5	<i>S. pseudintermedius</i> (2)	R	NP	R	-	+	+	-
6	<i>S. pseudintermedius</i> (6)	S	NP	R	-	-	+	-
7	<i>S. pseudintermedius</i> (3)	S	NP	S	-	-	-	-
8	<i>S. epidermidis</i> (1)	R	S	R	-	-	-	-
9	<i>S. schleiferi</i> (1)	S	NP	S	-	-	-	-
10	SCN (6)	NP	R	R	-	+	+	-
11	<i>S. haemolyticus</i> (1)	NP	S	R	-	+	+	-
12	<i>S. haemolyticus</i> (1)	NP	S	R	+	-	+	-
13	<i>S. sciuri</i> (2)	NP	S	R	-	-	+	-
14	SCN (2)	NP	S	S	-	-	+	-
15	<i>S. cohnii</i> (1)	NP	S	S	-	+	-	-
16	SCN (22)	NP	S	R	-	-	-	-
17	SCN (39)	NP	S	S	-	-	-	-

Legenda: (n) – número de cepas; R – resistente; S – sensível; NR – teste não realizado; NP – teste não preconizado para a espécie; DD (OXA) – difusão em disco com oxacilina; DD (CFO) – difusão em disco com Cefoxitina; DD (PEN) – difusão em disco com Penicilina G; AS (VAN) – Ágar *Screen* com Vancomicina.

5.3 Caracterização da resistência fenotípica à penicilina em *Streptococcus* spp.

Do total, 75% (3/4) das cepas de *Streptococcus* spp. apresentaram sensibilidade diminuída à penicilina G (10 UI), sendo duas cepas de *S. canis* e uma cepa de *S. dysgalactiae*. Não foi realizado teste de difusão com disco de penicilina G em *S. anginosus*, visto que não há padronização para essa espécie nos documentos utilizados como referência neste estudo (CLSI VET08, 2020; CLSI, 2021).

A maior preocupação com relação aos *Streptococcus* spp., principalmente tratando-se de *S. pneumoniae*, está relacionada à emergência de resistência a agentes antimicrobianos, particularmente aos beta-lactâmicos, que representam uma ótima opção para o tratamento de infecções ocasionadas por bactérias desse gênero (KONEMAN *et al.*, 2018).

Em *Streptococcus* spp., a resistência aos beta-lactâmicos está associada a expressão de genes que codificam alterações nas proteínas ligantes de penicilina (PBPs), diminuindo a afinidade da ligação entre o antimicrobiano e a parede celular bacteriana (KONEMAN *et al.*, 2018). Os estreptococos apresentam codificação para seis PBPs diferentes, são elas: PBP1a, PBP1b, PBP2a – que reduz a afinidade pela penicilina, PBP2b, PBP2x – que diminui a afinidade pela cefotaxima – e PBP3 (FLUIT *et al.*, 2001).

5.4 Caracterização da resistência fenogenotípica à vancomicina em *Enterococcus* spp.

Dentre as cepas de *Enterococcus* spp. isoladas neste trabalho, 25,71% (9/35) não foram susceptíveis à vancomicina no teste de difusão em disco, sendo 77,78% (7/9) *E. faecalis* e 22,22% (2/9) *E. casseliflavus*. Dessas cepas, um *E. faecalis* isolado de amostra de cloaca coletada de frango pertencente ao Setor de Avicultura da UFRRJ, foi positiva para o ensaio de ágar *screen*, sendo a única cepa na qual houve detecção do gene *vanB* (perfil 4 – Tabela 9). O gene de resistência *vanA* não foi detectado em nenhuma das cepas isoladas.

Suspeita-se que a utilização de avoparcina como promotor de crescimento em animais de produção, como frangos, suínos e bovinos, tenha contribuído para o desenvolvimento da resistência cruzada a outros glicopeptídeos, tais como vancomicina e teicoplanina, em *Enterococcus* spp. (WOODFORD *et al.*, 1995). A elevada pressão de seleção no ambiente de produção animal levou a ampla disseminação dos genes de resistência à vancomicina, *vanA* e *vanB*, facilmente transferíveis por estarem localizados em elementos genéticos móveis (LAUDERDALE *et al.*, 2007). A proibição do uso de avoparcina na avicultura levou à diminuição da pressão seletiva nesse ambiente e, em poucos anos, pesquisas relataram o decréscimo da resistência à vancomicina em amostras de frango (KLARE *et al.*, 1999;

LAUDERDALE *et al.*, 2007). No entanto, o isolamento de *Enterococcus* spp. resistentes à vancomicina ainda é mais comumente relatado em animais de produção do que em animais de companhia (LEMCKE & BÜLTE, 2000; JACKSON *et al.*, 2009; LÓPEZ *et al.*, 2012), o que também foi observado neste estudo, onde o único isolado com resistência fenotípica e detecção de gene adquirível foi oriundo de amostra de frango de corte.

E. casseliflavus é uma espécie que possui resistência intrínseca à vancomicina por apresentar o gene *vanC*, que codifica a alteração de D-Alanina:D-Alanina para D-Alanina:D-Serina na porção final do pentapeptídeo que se liga ao ácido N-acetilmurâmico (NAM), o que geralmente resulta em baixo nível de resistência à vancomicina, com CIMs de 8-16µg/mL (HOLLENBECK & RICE, 2012). Embora *E. casseliflavus* seja uma espécie intrinsecamente resistente à vancomicina, é comum evidenciar a ausência de crescimento bacteriano no teste de ágar *screen*, isso ocorre uma vez que o gene *vanC* confere um nível limitado de resistência a esse antimicrobiano (CLSI VET08, 2020; CLSI, 2021). Isso explica o fato dos dois *E. casseliflavus* isolados neste estudo (perfil 1 – Tabela 9) apresentarem resistência fenotípica à vancomicina, mas serem sensíveis no teste de ágar *screen*.

Tabela 9. Perfil da análise fenogenotípica da resistência à penicilina e vancomicina

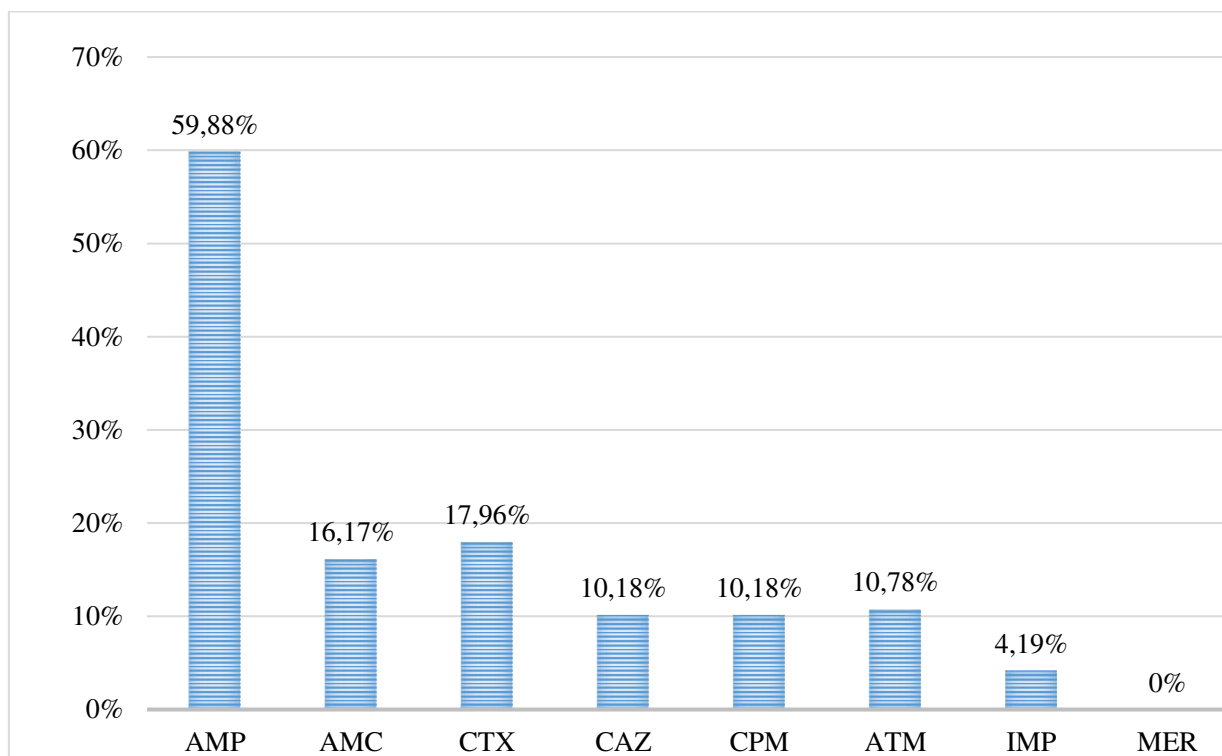
Perfil	Espécies (n)	DD VAN	AS VAN	PCR <i>vanA</i>	PCR <i>vanB</i>
1	<i>E. casseliflavus</i> (2)	R	-	-	-
2	<i>E. durans</i> (1)	S	NR	-	-
3	<i>E. faecalis</i> (6)	R	-	-	-
4	<i>E. faecalis</i> (1)	R	+	-	+
5	<i>E. faecalis</i> (16)	S	NR	-	-
6	<i>E. faecium</i> (3)	S	NR	-	-
7	<i>E. hirae</i> (5)	S	NR	-	-
8	<i>Enterococcus</i> spp. (1)	S	NR	-	-

Legenda: (n) – número de cepas; R – resistente; S – sensível; NR – teste não realizado; DD (PEN) – difusão em disco com Penicilina G; DD (VAN) – difusão em disco com Vancomicina; AS (VAN) – Ágar *Screen* com Vancomicina.

5.5 Caracterização da resistência fenotípica aos beta-lactâmicos em BGNs

As 167 cepas da Ordem Enterobacterales tiveram sua resistência fenotípica aos beta-lactâmicos caracterizada através da realização de antibiograma de triagem, utilizando a técnica de difusão em disco (CLSI VET08, 2020; CLSI, 2021). Os percentuais de resistência desse grupo aos antimicrobianos encontram-se dispostos na Figura 11.

Para a detecção da resistência fenotípica aos beta-lactâmicos nas 6 cepas de BGNNFs, não foram utilizados os discos de antimicrobianos aos quais as espécies testadas apresentam resistência intrínseca. Sendo assim, para as três *Pseudomonas* spp. foram testados ceftazidima, cefepime, aztreonam, imipenem e meropenem, já no caso das três cepas de *Acinetobacter* spp., foram testados cefotaxima, ceftazidima, cefepime, imipenem e meropenem (CLSI VET08, 2020; CLSI, 2021). Tanto a definição da resistência intrínseca quanto os pontos de corte estipulados pelo CLSI (2021) para esses BGNNFs são estabelecidos especificamente para *P. aeruginosa* e bactérias do complexo *Acinetobacter calcoaceticus-baumannii* (Acb). Entretanto, na ausência de uma definição mais ampla por parte deste documento, tais referências foram extrapoladas para outras cepas pertencentes aos gêneros *Pseudomonas* spp. e *Acinetobacter* spp. isoladas neste estudo.



Legenda: AMP – Ampicilina; AMC – Amoxicilina+Ácido Clavulânico; CTX – Cefotaxima; CAZ – Ceftazidima; CPM – Cefepime; ATM – Aztreonam; IMP – Imipenem; MER – Meropenem.

Figura 11. Gráfico apresentando percentual de resistência detectado nas cepas da Ordem Enterobacterales frente as diferentes classes de beta-lactâmicos testados.

A análise da suscetibilidade do grupo Enterobacterales aos beta-lactâmicos demonstrou que 59,88% (100/167) das cepas apresentaram resistência à ampicilina e 16,17% (27/167) foram resistentes à amoxicilina associada ao ácido clavulânico, um composto inibidor de beta-lactamases. Já com relação as cefalosporinas, a cefotaxima apresentou o maior percentual de resistência com 16,17% (30/167), seguida pela ceftazidima e cefepime, ambos antimicrobianos com 10,18% (17/167). O aztreonam, único representante da classe dos monobactâmicos, apresentou 10,78% (18/167) de resistência. Apenas 4,19% (7/167) das cepas isoladas apresentaram resistência intermediária ao imipenem, no entanto, quando testadas com o meropenem, carbapenêmico que apresenta maior sensibilidade no teste de difusão em disco, todas se mostraram sensíveis ao ensaio.

As cepas que apresentaram sensibilidade à amoxicilina+clavulanato e não foram suscetíveis a pelo menos um antimicrobiano representante das cefalosporinas de terceira geração (ceftazidima e cefotaxima), quarta geração (cefepime) ou monobactâmico (aztreonam) foram consideradas positivas no teste fenotípico de triagem para produção de beta-lactamases de espectro estendido (ESBL). Uma vez que as ESBLs degradam cefalosporinas de terceira geração e são caracterizadas por serem sensíveis aos inibidores de beta-lactamases, como ácido clavulânico, sulbactam e tazobactam (SAWA *et al.*, 2020), observa-se o aumento no halo de inibição de crescimento bacteriano nos discos contendo o clavulanato quando comparado aos discos impregnados apenas com as cefalosporinas (CLSI, 2021).

Na ordem Enterobacterales, foi detectada resistência indicando a expressão de ESBLs em 11,98% (20/167) das cepas (Figura 12A) e, em 70% (14/20) delas, o resultado foi positivo no teste confirmatório (Figura 12B). Já com relação aos bastonetes Gram-negativos não fermentadores (BGNNFs), observou-se resistência fenotípica no teste de triagem em 16,67% (1/6), sendo um *Acinetobacter* spp. isolado de *swab* pulmonar de cão, e esta resistência foi reconhecida através da positividade no teste confirmatório para expressão de ESBL.

Somada a avaliação fenotípica, foi realizada análise da qualidade do DNA bacteriano pela PCR do gene 16S *rRNA*, e posterior PCR para detecção dos genes *bla_{SHV}*, *bla_{CTX-M-1}* e *bla_{TEM}*. Embora existam muitos genes que codificam beta-lactamases de espectro estendido, os três escolhidos para avaliação neste trabalho representam os genes mais comumente encontrados em Enterobacterales e que possuem elevada disseminação global (PÉREZ-ETAYO *et al.* 2018; EJAZ *et al.*, 2021).

As cepas da ordem Enterobacterales que apresentaram resistência em pelo menos um dos ensaios fenotípicos, seja de triagem ou confirmatório, ou genotípicos, pela detecção dos genes *bla_{SHV}*, *bla_{CTX-M-1}* e *bla_{TEM}*, têm seus resultados descritos na Tabela 10.

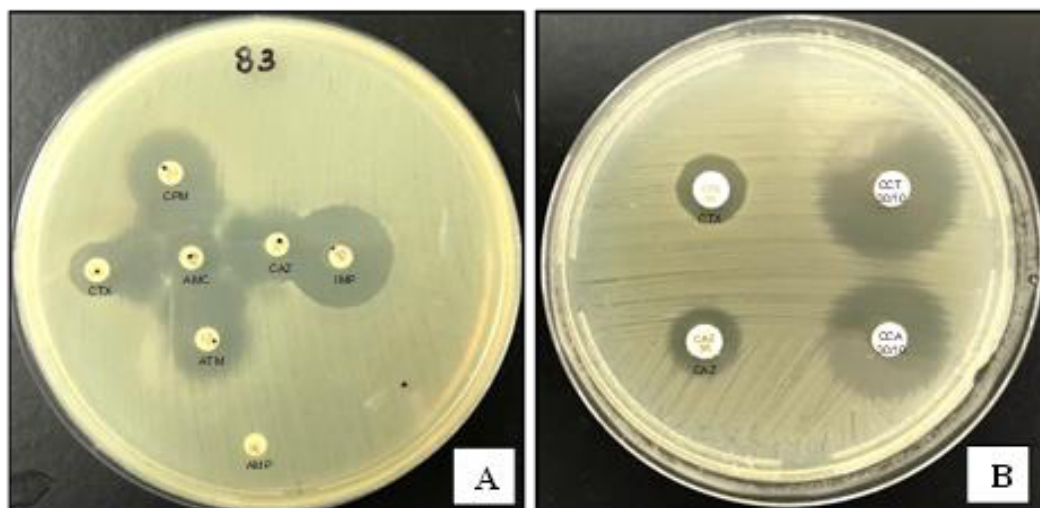


Figura 12: Resultado de teste de triagem para avaliação da resistência aos beta-lactâmicos mediada pela expressão de ESBL: evidencição de halos de resistência aos antimicrobianos CAZ, CPM e ATM em *E. cloacae* (A). Resultado positivo de teste confirmatório para avaliação da resistência aos beta-lactâmicos mediada por ESBL devido ao aumento do halo de sensibilidade aos antimicrobianos na presença de ácido clavulânico tanto em CAZ quanto em CTX (B). Abreviações: AMC, amoxicilina + ácido clavulânico; AMP, ampicilina; ATM, aztreonam; CAZ, ceftazidima; CCA, ceftazidima + ácido clavulânico; CCT, cefotaxima + ácido clavulânico; CPM, cefepima; CTX, cefotaxima; IMP, imipenem. CLSI VET08 (2020); CLSI (2021). Fonte: Arquivo pessoal.

A pesquisa genotípica revelou a presença do gene *bla_{SHV}* em 10,18% (17/167) das cepas da ordem Enterobacterales, seguida pelo gene *bla_{TEM}* em 6,59% (11/167) e *bla_{CTX-M-1}* em 4,19% (7/167). Foi observada a presença de mais de um dos genes em 32% (8/25) das cepas cuja detecção genotípica foi positiva (Tabela 10). Com relação a prevalência das variantes enzimáticas, as ESBLs dos tipos SHV e TEM foram inicialmente reconhecidas, na década de 1980, e encontram-se vastamente disseminadas em diferentes espécies de bactérias Gram-negativas, principalmente entre as Enterobacterales. Essas variantes têm sido gradativamente substituídas por enzimas do tipo CTX-M, que é o tipo de enzima mais dominante (EWERS *et al.*, 2010; MINARINI *et al.*, 2007; PATERSON & BONOMO, 2005). A proximidade entre a frequência de detecção dos três genes pesquisados, revela que esses diferentes tipos de enzimas permanecem em circulação, tanto em animais de companhia quanto em animais de produção, de forma bastante homogênea.

Embora muitos pesquisadores relatem a ocorrência de resistência ao grupo dos beta-lactâmicos pela expressão genética de ESBLs em animais selvagens (ISLAM *et al.*, 2021; WASYL *et al.*, 2017; GUENTHER *et al.*, 2010), neste estudo não houve resultados fenotípicos de resistência por produção de ESBLs, tampouco detecção dos genes procurados. Tal achado pode estar relacionado a uma baixa disponibilidade de amostras provenientes de animais selvagens, que levou a uma também menor quantidade de cepas de Enterobacterales isoladas (6,59% - 11/167), quando comparada ao isolamento obtido em amostras de animais de produção (47,31% - 79/167) e de companhia (46,11% - 77/167). Além da pesquisa ter sido desenvolvida com amostragem por conveniência, a pandemia de Covid-19 trouxe desafios que limitaram o acesso às necropsias, uma vez que a demanda por esse exame foi significativamente reduzida no período pandêmico, principalmente nos momentos definidos para coleta de amostras.

Com relação a única cepa de *Acinetobacter* spp. resistente nos testes fenotípicos, houve detecção do gene *bla_{SHV}*, o que confirmou a resistência aos beta-lactâmicos mediada pela produção de ESBL neste BGNNF. Na última década, as espécies de *Acinetobacter* spp. emergiram como um dos agentes de maior importância clínica devido ao seu potencial como patógeno nosocomial, a sua elevada resistência intrínseca a vários antimicrobianos de rotina, tanto na Medicina Veterinária quanto na Humana, e ao aumento dos casos de multidroga resistência, tornando-o muito infeccioso e de difícil controle (VIJAYAKUMAR *et al.*, 2019). A determinação da resistência aos beta-lactâmicos mediada pela produção de ESBL em *Acinetobacter* spp. é de extrema importância para orientar o protocolo terapêutico a ser seguido, uma vez que, nesse caso, os carbapenêmicos representam a última opção da classe dos beta-lactâmicos e, a escolha de cefalosporinas de última geração ou de aztreonam pode ser responsável pela seleção de cepas resistentes, capazes de disseminar seus genes para outras espécies e, até mesmo, outros gêneros bacterianos.

Apesar de uma cepa de *E. cloacae* (83 – Tabela 10) ter apresentado fenótipo de resistência por produção de ESBL tanto no teste de triagem quanto no confirmatório, não houve detecção de nenhum dos genes pesquisados. Nesse caso, a vasta diversidade molecular encontrada nas enzimas dos tipos SHV, TEM e CTX-M pode ser a explicação para a ausência de correlação fenogenotípica. Em estudo que avaliou a diversidade e virulência de cepas de *E. coli* produtoras de ESBL em animais de companhia, Bortolami e colaboradores (2019) relataram que o genótipo *bla_{CTX-M}* foi o mais comumente encontrado, sendo o *bla_{CTX-M-15}* o mais prevalente (46,9% - 30/64), seguido pelo *bla_{CTX-M-14}* (21,9% - 14/64) e *bla_{CTX-M-55}* (12,5% - 8/64), entre outros menos frequentes, como *bla_{CTX-M-1}*, *bla_{CTX-M-24}* e *bla_{CTX-M-28}*, o que

demonstra a variedade molecular encontrada nessa beta-lactamase. As enzimas dos tipos SHV e TEM também possuem muitas variantes moleculares e a ausência de detecção genotípica em cepa com fenótipo de resistência por produção de ESBL muito bem caracterizado, sugere que os *primers* de escolha para o estudo não amplificaram o gene responsável por codificar a síntese da ESBL presente nesta bactéria. Outras análises serão realizadas a fim de detectar o elemento genético responsável pelo fenótipo encontrado neste *E. cloacae*.

Cinco cepas isoladas de fragmentos de órgãos de *Lithobates catesbeianus* que foram resistentes na análise fenotípica de triagem, apresentaram-se negativos ao teste confirmatório, mas houve detecção do gene *bla_{SHV}* (cepas 40, 44, 45, 64 e 82 – Tabela 10). Além disso, foram observadas divergências nas análises fenogenotípicas em cinco cepas isoladas a partir de amostras de frangos de corte, as quais apresentaram sensibilidade aos antimicrobianos no teste de triagem, mas foram positivas na busca genotípica, inclusive três delas carregavam mais de um dentre os genes pesquisados (cepas 270, 272, 275, 281 e 285 – Tabela 10). Tais achados evidenciam que as pesquisas genotípicas representam o padrão ouro para a determinação da resistência antimicrobiana. A ausência de um fenótipo resistente em cepa geneticamente capacitada para a produção de ESBL, pela presença de um dos genes pesquisados, pode direcionar o clínico veterinário a utilizar um beta-lactâmico que não seja eficaz, uma vez que a bactéria pode vir a expressar a ESBL e, dessa forma, inibir a ação do fármaco.

Em triagem fenotípica para detecção de resistência aos carbapenêmicos realizada através do teste de disco-difusão, foi evidenciado que 4,19% (7/167) das cepas da ordem Enterobacterales apresentaram resistência intermediária ao imipenem, entretanto, todas foram suscetíveis no ensaio com o disco de meropenem, antimicrobiano esse que apresenta maior sensibilidade para o teste (SOARES, 2012). Com relação à pesquisa genotípica de carbapenemase, nenhuma cepa apresentou os genes *bla_{KPC}*, *bla_{NDM}* e *bla_{OXA-48}*. Esse resultado já era esperado uma vez que não houve detecção de resistência fenotípica aos carbapenêmicos.

A presença de carbapenemases denota um panorama crítico no tocante à antibioticoterapia, uma vez que limita as opções terapêuticas em infecções ocasionadas por bactérias Gram-negativas ao uso da colistina, um antimicrobiano que apresenta muitos efeitos danosos ao organismo humano, uma vez que tem como alvo a membrana citoplasmática bacteriana, estrutura essa que também está presente em células eucariontes (COSTA & SILVA, 2017). Sendo assim, a disseminação dos mecanismos de resistência à classe dos antimicrobianos carbapenêmicos, especialmente entre os BGNs, é algo extremamente preocupante, o que torna muito importante a investigação e detecção do mecanismo envolvido

nessa resistência, a fim de estabelecer medidas de controle e prevenção que possibilitem a manutenção da eficácia dos carbapenêmicos.

A rápida expansão da resistência adquirida aos carbapenêmicos em bastonetes Gram-negativos é cada vez mais propagada por elementos genéticos móveis (BRINK, 2019). Os principais grupos de carbapenemases mais comumente encontrados em Enterobacterales incluem KPC, NDM e OXA-48 (IOVLEVA & DOI, 2017), daí a escolha dos genes que foram pesquisados neste estudo.

Tabela 10. Análise da resistência fenogenotípica aos beta-lactâmicos por produção de ESBL em cepas da Ordem Enterobacterales

Cepa	Identificação	Procedência Espécie animal (c) – sítio de coleta	Testes Fenotípicos		PCR		
			Triagem	Confirmatório	<i>bla</i> _{SHV}	<i>bla</i> _{CTX-M}	<i>bla</i> _{TEM}
14	<i>K. pneumoniae</i>	Canina (1) – swab retal	(+)	(+)*	(+)	neg.	neg.
22	<i>E. coli</i>	Canina (2) – swab retal	(+)	(+)*	(+)	(+)	neg.
23	<i>E. coli</i>	Canina (2) – swab retal	(+)	(+)*	(+)	(+)	(+)
40	<i>Citrobacter freundii</i>	<i>Lithobates catesbeianus</i> (4) – fragmento fígado	(+)	neg.	(+)	neg.	neg.
44	<i>Citrobacter freundii</i>	<i>Lithobates catesbeianus</i> (4) – fragmento pulmão	(+)	neg.	(+)	neg.	neg.
45	<i>E. tarda</i>	<i>Lithobates catesbeianus</i> (4) – fragmento pulmão	(+)	neg.	(+)	neg.	neg.
64	<i>K. pneumoniae</i>	<i>Lithobates catesbeianus</i> (11) – fragmento pulmão	(+)	neg.	(+)	neg.	neg.
82	<i>Leclercia adecarboxylata</i>	<i>Lithobates catesbeianus</i> (9) – fragmento rim	(+)	neg.	(+)	neg.	neg.
83	<i>E. cloacae</i>	<i>Lithobates catesbeianus</i> – fragmento pulmão	(+)	(+)*	neg.	neg.	neg.
138	<i>E.coli</i>	Canina (17) – swab retal	(+)	(+)**	neg.	neg.	(+)
140	<i>K. pneumoniae</i>	Canina (17) – swab pulmão	(+)	(+)*	(+)	(+)	(+)
227	<i>E. cloacae</i>	Felina (32) – swab pulmão	(+)	(+)*	neg.	neg.	(+)
228	<i>E. cloacae</i>	Felina (32) – swab pulmão	(+)	(+)*	neg.	(+)	(+)
270	<i>K. pneumoniae</i>	<i>Gallus gallus</i> (27) – swab traqueia	neg.	NR	(+)	neg.	neg.
272	<i>E. coli</i>	<i>Gallus gallus</i> (27) – swab traqueia	neg.	NR	(+)	neg.	(+)
273	<i>K. pneumoniae</i>	<i>Gallus gallus</i> (28) – swab traqueia	(+)	(+)*	(+)	(+)	neg.
275	<i>E. coli</i>	<i>Gallus gallus</i> (29) – swab traqueia	neg.	NR	(+)	(+)	neg.
277	<i>E. coli</i>	<i>Gallus gallus</i> (30) – swab traqueia	(+)	(+)**	(+)	neg.	(+)
280	<i>E. coli</i>	<i>Gallus gallus</i> (26) – swab cloaca	(+)	(+)*	(+)	neg.	neg.
281	<i>E. coli</i>	<i>Gallus gallus</i> (27) – swab cloaca	neg.	NR	(+)	neg.	(+)
284	<i>E. coli</i>	<i>Gallus gallus</i> (28) – swab cloaca	(+)	neg.	neg.	neg.	(+)
285	<i>E. coli</i>	<i>Gallus gallus</i> (29) – swab cloaca	neg.	NR	neg.	neg.	(+)
289	<i>E. coli</i>	<i>Gallus gallus</i> (30) – fragmento fígado	(+)	(+)*	(+)	neg.	neg.
331	<i>K. pneumoniae</i>	Canina (36) – swab retal	(+)	(+)**	neg.	neg.	(+)
334	<i>E. cloacae</i>	Canina (36) – swab pulmão	(+)	(+)*	neg.	(+)	neg.
TOTAL	26 cepas	-	20	14	17	7	11

Legenda: (c) – código do animal; (+) – resultado positivo; neg. – resultado negativo; (*) – Confirmação com Ceftazidima e Cefotaxima; (***) – Confirmação apenas com Ceftazidima; (***) – Confirmação apenas com Cefotaxima; NR – não realizado.

5.6 Pesquisa de genes de resistência à colistina em BGNs

Em pesquisa genotípica de resistência adquirida à colistina, realizada através da técnica de PCR, não foram detectados genes *mcr* em nenhuma das cepas de bastonetes Gram-negativos isoladas neste trabalho.

6 CONCLUSÃO

A concordância entre as técnicas bioquímica, proteômica e genotípica na identificação de *Staphylococcus* spp. foi de 80,58%. Parte das discrepâncias evidenciadas já foram notificadas anteriormente em cepas atípicas provenientes de animais, o que confirma a importância da associação entre diferentes métodos diagnósticos para a correta caracterização das espécies bacterianas e efetuar a predição da resistência de modo acurado.

Os elevados percentuais de resistência fenogenotípica à penicilina, quando comparados à resistência a oxacilina e cefoxitina, indicam que a produção de beta-lactamases foi o mecanismo de resistência predominante nas cepas de *Staphylococcus* spp. estudadas.

Não houve detecção genotípica de resistência à vancomicina em cepa de *S. haemolyticus* que apresentou crescimento em ágar *screen* com esse antimicrobiano. No entanto, deve-se pesquisar a CIM para uma avaliação mais completa do provável mecanismo envolvido nessa resistência.

A concordância entre as técnicas fenotípica e proteômica na identificação de espécies do gênero *Enterococcus* foi 85,37%. Já as técnicas proteômica e genotípica apresentaram 100% de concordância para identificação em nível de gênero, evidenciando que o MALDI-TOF é uma ferramenta eficaz para a identificação de *Enterococcus* spp.

Uma cepa de *E. faecalis* isolada de amostra de frango de corte foi resistente à vancomicina nos ensaios fenotípicos de difusão em disco e ágar *screen*, havendo detecção do gene *vanB*.

A concordância entre as técnicas fenotípica e proteômica na identificação de cepas da ordem Enterobacterales foi de 92,96%. Conclui-se que o MALDI-TOF representa uma técnica de elevada acurácia e confiabilidade para a identificação de enterobactérias, inclusive no caso de espécies em que a identificação fenotípica através de métodos tradicionais torna-se inviável, uma vez que compartilham muitas características bioquímicas semelhantes.

A dificuldade do MALDI-TOF em distinguir *Escherichia coli* de *Shigella* spp. representa uma limitação da ferramenta e é um ponto de atenção para cepas atípicas, que devem ser caracterizadas genotipicamente para fins comprobatórios e direcionamento correto de análise da resistência antimicrobiana.

Em 11,98% das cepas da ordem Enterobacterales foi detectada resistência indicando a expressão de ESBLs. Foi detectada a presença do gene *bla_{SHV}* em 10,18% das cepas, seguida pelo gene *bla_{TEM}* em 6,59% e *bla_{CTX-M-1}* em 4,19%. Foi observada a presença de mais de um

dos genes em 32% das cepas cuja detecção genotípica foi positiva. Não houve detecção de nenhum dos genes em uma cepa que apresentou resistência fenotípica.

Não foram isoladas cepas produtoras de carbapenemases e não foram detectados genes de resistência à colistina.

O ambiente de necropsia é um local com elevada diversidade de microrganismos potencialmente patogênicos, onde foi observada circulação de bactérias de importância para a Saúde Única, tais como *Staphylococcus* spp. resistente à meticilina, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Enterobacter cloacae*, *Citrobacter freundii*, *Edwardsiella tarda* e *Leclercia adecarboxylata* com resistência aos beta-lactâmicos por produção de ESBL codificadas pelos genes *bla_{SHV}*, *bla_{TEM}* e *bla_{CTX-M-1}*. Cepa de *Acinetobacter* spp. produtor de ESBL codificada pelo gene *bla_{SHV}* também foi isolada de animal necropsiado no SAP.

O descarte adequado de carcaças deve ser capaz de eliminar não apenas os microrganismos, de modo a diminuir os riscos biológicos, mas também inativar os elementos genéticos responsáveis pela disseminação da RAM, a fim de interromper os ciclos de transmissão horizontal de genes de resistência. A incineração representa um método de descarte de resíduos de necropsia seguro e eficiente, promovendo a completa eliminação tanto dos microrganismos quanto dos genes de resistência albergados por eles.

7 PERSPECTIVAS FUTURAS

Com relação às cepas de *S. aureus* e *S. pseudintermedius* que foram negativos ao teste da coagulase, serão realizadas análises de sequenciamento a fim de confirmar a identificação de isolados atípicos.

Também será realizado o sequenciamento de cepa caracterizada por bioquimismo como *Shigella* spp., mas identificada como *E. coli* pela ferramenta MALDI-TOF para fins de avaliação da ocorrência de *E. coli* atípica.

8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AARESTRUP, F.M. The Origin, Evolution, and Local and Global Dissemination of Antimicrobial Resistance. In: *Antimicrobial Resistance in Bacteria of Animal Origin*. ASM Press, Washington, D.C., p. 339–360, 2006.

AKGÜL, Ö.; BORA, G.; GÜDÜCÜOĞLU, H. Investigation of the gene carriage rates for *Staphylococcus aureus*, *mecA*, *vanA* and *nuc* genes in the nasal and milk specimens from the sheep caretakers with sheep. **Large Animal Review**, v. 27, p. 259–268, 2021.

ALÓS, J-I. Resistencia bacteriana a los antibióticos: una crisis global. **Enfermedades Infecciosas Y Microbiología Clínica**, v. 33, n. 10, p. 692-699, 2015.

ALVARADO, M.; CLEMENTE-CASARES, P.; MORENO, D.A.; DE GROOT, P.W.J. MicroMundo Upside Down: Targeted Searching for Antibiotics Producing Bacteria from Soil with Reverse Antibiosis Approaches. **Frontiers in Microbiology**, v. 11, 577550, 2020.

ALQUEIDÃO, SORAIA DIAS. **Resistência a antibióticos em isolados de cães com foliculite superficial bacteriana: estudo retrospectivo**. Dissertação de Mestrado. 87p., 2018.

AMÂNCIO, F.L.R.; CARVALHO, I.K.N.P.; MENEZES, T.A.; ALBUQUERQUE, R.L.C.; SANTOS, A.G.; PINHEIRO, M.S. Fenótipos de resistência antimicrobiana epidemiologicamente importantes em culturas de vigilância de um serviço terciário de saúde em Aracaju-SE. **Vigilância Sanitária em Debate: Sociedade, Ciência & Tecnologia**, v. 9, n. 2, p. 111–116, 2021.

ANVISA. Bases teóricas e uso clínico. 2007. https://www.anvisa.gov.br/servicosade/controle/rede_rm/cursos/rm_controle/opas_web/modulo1/daptomicina.htm Acesso em 27 de outubro de 2021.

AMÁBILE-CUEVAS, C.F. Global Perspectives of Antibiotic Resistance. In: SOSA, A.; BYARUGABA, D.; AMÁBILE-CUEVAS, C.; HSUEH, P.R.; KARIUKI, S.; OKEKE, I. *Antimicrobial Resistance in Developing Countries*. Springer, New York, NY, p. 3-13, 2010.

ATLAS, R.M. One Health: Its Origins and Future. In: MACKENZIE, J.; JEGGO, M.; DASZAK, P.; RICHT, J. *One Health: The Human-Animal-Environment Interfaces in Emerging Infectious Diseases*. **Current Topics in Microbiology and Immunology**, v. 365. Springer, Berlin, Heidelberg, 2012.

BABIŃSKA, I.; SOŁTYSZEWSKI, I.; KARAŻNIEWICZ, J.; SZAREK, J.; FELSMANN, M.Z.; DZIKOWSKI, A. Veterinary necropsy in the light of ethics and law. **Med. Weter**, v. 75, n. 11, p. 652–655, 2019.

BENNETT, J.W.; CHUNG, K.T. Alexander Fleming and the discovery of penicillin. **Advances in Applied Microbiology**, v. 49, p. 163–184, 2001.

BOROWIAK, M.; BAUMANN, B.; FISCHER, J.; THOMAS, K.; DENEKE, C.; HAMMERL, J.A.; SZABO, I.; MALORNY, B. Development of a Novel *mcr-6* to *mcr-9* Multiplex PCR and Assessment of *mcr-1* to *mcr-9* Occurrence in Colistin-Resistant *Salmonella enterica* Isolates from Environment, Feed, Animals and Food (2011–2018) in Germany. **Frontiers in Microbiology**, v. 11:80, 2020.

BORTOLAMI, A.; ZENDRI, F.; MACIUCA, E.I.; WATTRET, A.; ELLIS, C.; SCHMIDT, V.; *et al.* Diversity, Virulence, and Clinical Significance of Extended-Spectrum β -Lactamase- and pAmpC-Producing *Escherichia coli* From Companion Animals. **Frontiers in Microbiology**, 10:1260, 2019.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC nº 306, de 07 de dezembro de 2004. Dispõe sobre o Regulamento Técnico para o gerenciamento de resíduos de serviços de saúde. Diário Oficial da União, Brasília, DF, 2004.

BRASIL. Conselho Nacional do Meio Ambiente. Resolução nº 358, de 29 de abril de 2005. Dispõe sobre o tratamento e disposição final dos resíduos de serviço de saúde e dá outras providências. Diário Oficial da República, Federativa do Brasil, Brasília, DF, 2005.

BRESALIER, M.; CASSIDY, A.; WOODS, A. One health in history. In: One Health: The Theory and Practice of Integrated Health Approaches, eds ZINSSTAG, J.; SCHELLING, E.; WHITTAKER, M.; TANNER, M.; WALTNER-TOEWS, D. (1st ed. Oxfordshire, CAB International). p. 1–15, 2015.

BRINK, A.J. Epidemiology of carbapenem-resistant Gram-negative infections globally. **Curr Opin Infect Dis**, v. 32, n. 6, p. 609–616, 2019.

BRITO, M.A.V.P. *et al.* Concentração mínima inibitória de dez antimicrobianos para amostras de *Staphylococcus aureus* isoladas de infecção intramamária bovina. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 53, n. 5, p. 531–537, 2001.

CARDOSO, C.V.P. Descarte de Carcaças. In: ANDRADE, A.; PINTO, S.C.; OLIVEIRA, R.S. (orgs.) Animais de Laboratório: criação e experimentação. Rio de Janeiro: Editora FIOCRUZ, 388 p., 2002.

CARROLL, D.; WANG, J.; FANNING, S.; MCMAHON, B.J. Antimicrobial Resistance in Wildlife: Implications for Public Health. **Zoonoses and Public Health**, v. 62, n. 7, p. 534–542, 2015.

CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION. One Health Basics. 2018. <https://www.cdc.gov/onehealth/basics/index.html> Acesso em 25 de setembro de 2021.

CHANG, S.; SIEVERT, D.M.; HAGEMAN, J.C.; BOULTON, M.L.; TENOVER, F.C.; DOWNES, F.P.; *et al.* Infection with vancomycin-resistant *Staphylococcus aureus* containing the *vanA* resistance gene. **New England Journal of Medicine**, v. 348, n. 14, p. 1342–1347, 2003.

CHRISTAKI, E.; MARCOU, M.; TOFARIDES, A. Antimicrobial Resistance in Bacteria: Mechanisms, Evolution, and Persistence. **Journal of Molecular Evolution**, v. 88, p. 26–40, 2020.

CIFTCI, A.; FINDIK, A.; ONUK, E. E.; SAVASAN, S. Detection of methicillin resistance and slime factor production of *Staphylococcus aureus* in bovine mastitis. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 40, p. 254–261, 2009.

CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE. Performance Standards for Antimicrobial Disk and Dilution Susceptibility Tests for Bacteria Isolated From Animals. 4th ed. **CLSI Supplement VET08**. Wayne, PA, 2020.

CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing. 30th ed. **CLSI Supplement M100**. Wayne, PA, 2021.

CONG, Y.; YANG, S.; RAO, X. Vancomycin resistant *Staphylococcus aureus* infections: A review of case updating and clinical features. **Journal of Advanced Research**, v. 21, p. 169–176, 2020.

COSTA, A.; SILVA, G.J. Resistência à Colistina e sua Disseminação: Implicações em Saúde Pública. **Rev Port Farmacoter**, v. 10, p. 47–52, 2017.

COURVALIN, P. Predictable and unpredictable evolution of antibiotic resistance. **Journal of Internal Medicine**, v. 264, n. 1, p. 4–16, 2008.

CUI, L.; MURAKAMI, H.; KUWAHARA-ARAI, K.; HANAKI, H.; HIRAMATSU, K. Contribution of a thickened cell wall and its glutamine nonamidated component to the vancomycin resistance expressed by *Staphylococcus aureus* Mu50. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 44, p. 2276–2285, 2020.

DAMBORG, P.; SØRENSEN, A.H.; GUARDABASSI, L. Monitoring of antimicrobial resistance in healthy dogs: First report of canine ampicillin-resistant *Enterococcus faecium* clonal complex 17. **Veterinary Microbiology**, v. 132, p. 190–196, 2008.

DASHTI, A. A.; JADAON, M. M.; ABDULSAMAD, A. M.; DASHTI, H. M. Heat Treatment of Bacteria: A Simple Method of DNA Extraction for Molecular Techniques. **Kuwait Medical Journal**, v. 41, n. 2, p. 117–122, 2009.

EJAZ, H.; YOUNAS, S.; ABOSALIF, KOA.; JUNAID, K.; ALZHRANI, B.; ALSRHANI, A.; *et al.* Molecular analysis of *bla*_{SHV}, *bla*_{TEM}, and *bla*_{CTX-M} in extended-spectrum β-lactamase producing *Enterobacteriaceae* recovered from fecal specimens of animals. **PLoS ONE**, v. 16, n. 1, e0245126, 2021.

EWERS, C.; GROBBEL, M.; STAMM, I.; KOPP, P. A.; DIEHL, I.; SEMMIER, T.; FRUTH, A.; BEUTLICH, J.; GUERRA, B.; WIELER, L. H.; GUENTHER, S. Emergence of human pandemic O25:H4-ST131 CTX-M-15 extended-spectrum beta lactamase producing *Escherichia coli* among companion animals. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 65, p. 1–10, 2010.

EZECHUKWU, I.; SINGAL, M.; IGBINOSA, O. *Aerococcus viridans*: Case Report, Microbiology, and Literature Review. **American Journal of Case Reports**, v. 20, p. 697–700, 2019.

FARON, M.L.; BUCHAN, B.W.; HYKE, J.; MADISEN, N.; LILLIE, J.L.; GRANATO, P.A. *et al.* Multicenter Evaluation of the Bruker MALDI Biotyper CA System for the Identification of Clinical Aerobic Gram-Negative Bacterial Isolates. **PLoS ONE**, v. 10, n. 11, 2015.

FENG, B.; SHI, H.; XU, F.; HU, F.; HE, J.; YANG, H.; DING, C.; CHEN, W.; YU, S. FTIR-assisted MALDI-TOF MS for the identification and typing of bacteria. **Analytica Chimica Acta**, v. 1111, p 75–82, 2020.

FERREIRA, A.M.; BONESSO, M.F.; MONDELLI, A.L.; CAMARGO, C.H.; CUNHA, M.L.R.S. Oxacillin resistance and antimicrobial susceptibility profile of *Staphylococcus saprophyticus* and other Staphylococci isolated from patients with urinary tract infection. **Chemother**, v. 58, n. 6, p. 482–491, 2012.

FICK, J.; SÖDERSTRÖM, H.; LINDBERG, R.H.; PHAN, C.; TYSKLIND, M.; LARSSON, D.G.J. Contamination of surface, ground, and drinking water from pharmaceutical production. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 28, n. 12, p. 2522–2527, 2009.

FLUIT, A.C.; VISSER, M.R.; SCHMITZ, F.J. Molecular Detection of Antimicrobial Resistance. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 14, n. 4, p. 836–871, 2001.

FOURNIER, C.; AIRES-DE-SOUSA, M.; NORDMANN, P.; POIREL, L. Occurrence of CTX-M-15- and MCR-1-producing Enterobacterales in pigs in Portugal: evidence of direct links with antibiotic selective pressure. **Int J Antimicrob Agents**, v. 55, 105802, 2020.

FRIGATTO, E.A.M.; MACHADO, A.M.O.; PIGNATARI, A.C.C.; GALES, A.C. Is the cefoxitin disk test reliable enough to detect oxacillin resistance in coagulase-negative Staphylococci? **J Clin Microbiol**, v. 43, p. 2028–2029, 2005.

FUNG, J.C.; KAPLAN, M.H.; HSIEH, H.; STEPHENS, A.; TYBURSKI, M.B.; TENENBAUM, M.J. Two Coagulase-Variant Forms of *Staphylococcus aureus* Isolated from Blood Cultures. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 20, n. 1, p.115–117, 1984.

GARINO JUNIOR, F. *et al.* Susceptibilidade a antimicrobianos e produção de betalactamase em amostras de *Staphylococcus* isolados de mastite caprina no Semi-árido Paraibano. **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 78, n. 1, p. 103–107, 2011.

GESER, N.; STEPHAN, R.; KORCZAK, B.M.; BEUTIN, L.; HÄCHLER, H. Molecular Identification of Extended-Spectrum- β -Lactamase Genes from *Enterobacteriaceae* Isolated from Healthy Human Carriers in Switzerland. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 56, n. 3, p. 1609–1612, 2012.

GUARDABASSI, L.; SCHWARZ, S.; LLOYD, D. H. Pet animals as reservoirs of antimicrobial-resistant bacteria. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 54, n. 2, p. 321–332, 2004.

GUENTHER, S.; GROBBEL, M.; LÜBKE-BECKER, A.; GOEDECKE, A.; FRIEDRICH, N.D.; WIELER, L.H.; EWERS, C. Antimicrobial resistance profiles of *Escherichia coli* from common European wild bird species. **Veterinary Microbiology**, v. 144, p. 219–225, 2010.

GUENTHER, S.; EWERS, C.; WIELER, L.H. Extended-spectrum betalactamases producing *E. coli* in wildlife, yet another form of environmental pollution? **Frontiers in Microbiology**, v. 2, n. 246, 2011.

HANAKI, H.; KUWAHARA-ARAI, K.; BOYLE-VAVRA, S.; DAUM, R.S.; LABISCHINSKI, H.; HIRAMATSU, K. Activated cell-wall synthesis is associated with

vancomycin resistance in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clinical strains Mu3 and Mu50. **Antimicrob Chemother**, v. 42, p. 199–209, 1998.

HERNANDO-AMADO, S.; COQUE, T.M.; BAQUERO, F.; MARTÍNEZ, J.L. Defining and combating antibiotic resistance from One Health and Global Health perspectives. **Nature Microbiology**, v. 4, p. 1432–1442, 2019.

HOLLENBECK, B.L. & RICE, L.B. Intrinsic and acquired resistance mechanisms in *Enterococcus*. **Virulence**, v. 3, n. 5, p. 421–433, 2012.

HOLMES, A. H.; MOORE, L. S. P.; ORD, A. N. S.; STEINBAKK, M.; REGMI, S.; KARKEY, A.; GUERIN, P. J.; PIDDOCK, L. J. V. Understanding the mechanisms and drivers of antimicrobial resistance. **The Lancet**, v. 387, p. 176–187, 2015.

HOOKEY, J. V.; RICHARDSON, J. F.; COOKSON, B. D. Molecular typing of *Staphylococcus aureus* based on PCR Restriction Fragment Length Polymorphism and DNA sequence analysis of the coagulase gene. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 36, n. 4, p. 1083–1089, 1998.

IOVLEVA, A.; DOI, Y. Carbapenem-Resistant Enterobacteriaceae. **Clinics in Laboratory Medicine**, v. 37, n. 2, p. 303–315, 2017.

ISLAM, M.S.; SOBUR, M.A.; RAHMAN, S.; *et al.* Detection of *bla*_{TEM}, *bla*_{CTX-M}, *bla*_{CMY}, and *bla*_{SHV} Genes Among Extended-Spectrum Beta-Lactamase-Producing *Escherichia coli* Isolated from Migratory Birds Travelling to Bangladesh. **Microbial Ecology**, 2021.

KAASE, M.; LENGA, S.; FRIEDRICH, S.; SZABADOS, F.; SAKINC, T.; KLEINE, B.; GATERMANN, S.G. Comparison of phenotypic methods for penicillinase detection in *Staphylococcus aureus*. **Clin. Microbiol. Infect.**, v. 14, p. 614–616, 2008.

KARIYAMA, R.; MITSUHATA, R.; CHOW, J.W.; CLEWELL, D.B.; KUMON, H. Simple and reliable multiplex PCR assay for surveillance isolates of vancomycin-resistant Enterococci. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 38, n. 8, p. 3092–3095, 2000.

KATAOKA, Y.; UMINO, Y.; OCHI, H.; HARADA, K.; SAWADA, T. Antimicrobial susceptibility of enterococcal species isolated from antibiotic-treated dogs and cats. **Journal of Veterinary Medical Science**, v. 76, p. 1399–1402, 2014.

KAWANO, J.; SHIMIZU, A.; SAITOH, Y.; YAGI, M.; SAITO, T.; OKAMOTO, R. Isolation of methicillin-resistant coagulase-negative staphylococci from chickens. **J. Clin. Microbiol.**, v. 34, n. 9, p. 2072–2077, 1996.

KE, D.; PICARD, F. J.; MARTINEAU, F.; MÉNARD, C.; ROY, P. H.; OUELLETTE, M.; BERGERON, M. G. Development of a PCR Assay for Rapid Detection of Enterococci. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 37, n. 11, p. 3497–3503, 1999.

KINGSLEY, P. & TAYLOR, E.M. One Health: Competing Perspectives in an Emerging Field. **Parasitology**, v. 144, n. 1, p. 7–14, 2017.

KLARE, I.; BADSTÜBNER, D.; KONSTABEL, C.; BÖHME, G.; CLAUS, H.; WITTE, W. Decreased Incidence of *VanA*-type Vancomycin-Resistant Enterococci Isolated from Poultry Meat and from Fecal Samples of Humans in the Community after Discontinuation of Avoparcin Usage in Animal Husbandry. **Microbial Drug Resistance**, v. 5, n. 1, p. 45–52, 1999.

KONEMAN, E. W.; PROCOP, G. W.; CHURCH, D. L.; HALL, G. S.; JANDA, W. M.; SCHRECKENBERGER, P. C.; WOODS, G. L. **Diagnóstico Microbiológico**, 7ª ed. Rio de Janeiro. Editora: Guanabara Koogan, 2018. 1854 p.

KUDIRKIENE, E.; WELKERB, M.; KNUDSENA, N.R.; BOJESEN, A.M. Rapid and accurate identification of *Streptococcus equi* subspecies by MALDI-TOF MS. **Systematic and Applied Microbiology**, v. 38, p. 315–322, 2015.

LA SCOLA, B.; *et al.* Sequencing of the *rpoB* gene and flanking spacers for molecular identification of *Acinetobacter* species. **Journal of clinical microbiology**, v. 44, n. 3, p. 827–832, 2006.

LAN, R.; ALLES, M.C.; DONOHOE, K.; MARTINEZ, M.B.; REEVES, P.R. Molecular evolutionary relationships of enteroinvasive *Escherichia coli* and *Shigella* spp. **Infection and Immunity**, v. 72, n. 9, p. 5080–5088, 2004.

LARSSON, D.G.J.; DE PEDRO, C.; PAXEUS, N. Effluent from drug manufactures contains extremely high levels of pharmaceuticals. **Journal of Hazardous Materials**, v. 148, p. 751–755, 2007.

LAUDERDALE, T.-L.; SHIAU, Y.-R.; *et al.* Effect of banning vancomycin analogue avoparcin on vancomycin-resistant enterococci in chicken farms in Taiwan. **Environmental Microbiology**, v. 9, n. 3, p. 819–823, 2007.

LEHNER, A.; LOY, A.; BEHR, T.; GAENGE, H.; LUDWIG, W.; WAGNER, M.; SCHLEIFER, M. Oligonucleotide Microarray for Identification of *Enterococcus* Species. **FEMS Microbiology Letters**, v. 246, n. 1, p. 133–142, 2005.

LEMCKE, R.; BÜLTE, M. Occurrence of the vancomycin-resistant genes *vanA*, *vanB*, *vanC1*, *vanC2* and *vanC3* in *Enterococcus* strains isolated from poultry and pork. **International Journal of Food Microbiology**, v. 60, p. 185–194, 2000.

JACKSON, C. R.; FEDORKA-DRAY, P. J.; DAVIS, J. A.; *et al.* Prevalence, species distribution and antimicrobial resistance of enterococci isolated from dogs and cats in the United States. **Journal of Applied Microbiology**, v. 107, n. 4, p. 1269–1278, 2009.

LENCASTRE, H., OLIVEIRA, D. C. Multiplex PCR strategy for rapid identification of structural types and variants of the *mec* element in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 46, n. 7, p. 2155–2161, 2002.

LING, Z.; YIN, W.; SHEN, Z.; WANG, Y.; SHEN, J.; WALSH, T. R. Epidemiology of mobile colistin resistance genes *mcr-1* to *mcr-9*. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 75, p. 3087–3095, 2020.

LÓPEZ, M.; CERCENADO, E.; TENORIO, C.; *et al.* Diversity of clones and genotypes among vancomycin-resistant clinical *Enterococcus* isolates recovered in a Spanish hospital. **Microbial Drug Resistance**, v. 18, n. 5, p. 484–491, 2012.

LUO, Q.; WANG, Y.; XIAO, Y. Prevalence and transmission of mobilized colistin resistance (*mcr*) gene in bacteria common to animals and humans. **Biosafety and Health**, v. 2, p. 71–78, 2020.

MACHADO, V.S.; BICALHO, R.C. Complete Genome Sequence of *Trueperella pyogenes*, an Important Opportunistic Pathogen of Livestock. **Genome Announcements**, v. 2, n. 2, 2014.

MAGIORAKOS, A.P.; SRINIVASAN, A.; CAREY, R.B.; *et al.* Multidrug-resistant, extensively drug-resistant and pandrug-resistant bacteria: an international expert proposal for interim standard definitions for acquired resistance. **Clin Microbiol Infect**, v. 18, p. 268–281, 2012.

MARKEY, B.; LEONARD, F.; ACHAMBAULT, M; *et al.* **Clinical Veterinary Microbiology**, 2 ed. Editora: Elsevier Health Sciences, 2013.

MCGUINNESS, W.A.; MALACHOWA, N.; DELEO, F.R. Vancomycin Resistance in *Staphylococcus aureus*. **Yale Journal of Biology and Medicine**, v. 90, p. 269–281, 2017.

MEDINA, M.; LEGIDO-QUIGLEY, H.; HSU, L.Y. Antimicrobial Resistance in One Health. In: MASYS, A.J. *et al.* (eds). Global Health Security. Springer Nature Switzerland AG, p. 209–229, 2020.

MELO, D. A.; COELHO, I. D. S.; MOTTA, C. C. D.; *et al.* Impairments of *mecA* gene detection in bovine *Staphylococcus* spp. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 45, n. 3, p. 1075–1082, 2014.

MENDONÇA, E. C. L.; MAQUES, V.F.; MELO, D.A.; *et al.* Caracterização fenogenotípica da resistência antimicrobiana em *Staphylococcus* spp. isolados de mastite bovina. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 32, n. 9, p. 859-864, 2012.

MINARINI, L.A.R.; GALES, A.C.; PALAZZO, I.C.V.; DARINI, A.L.C. Prevalence of Community-Occurring Extended Spectrum β -Lactamase-Producing Enterobacteriaceae in Brazil. **Current Microbiology**, v. 54, p. 335–341, 2007.

MŁYNARCZYK, G.; KOCHMAN, M.; ŁAWRYNOWICZ, M.; FORDYMACKI, P.; MŁYNARCZYK, A.; JELJASZEWICZ, J. Coagulase-negative variants of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* subsp. *aureus* strains isolated from hospital specimens. **Zentralblatt Für Bakteriologie**, v. 288, n. 3, p. 373–381, 1998.

MONTEIRO, J.; WIDEN, R.H.; PIGNATARI, A.C.C.; KUBASEK, C.; SILBERT, S. Rapid detection of carbapenemase genes by multiplex real-time PCR. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 67, n. 4, p. 906–909, 2012.

MOYAERT, H.; DE JONG, A.; SIMJEE, S.; *et al.* Survey of antimicrobial susceptibility of bacterial pathogens isolated from dogs and cats with respiratory tract infections in Europe: ComPath results. **Journal of Applied Microbiology**, v. 127, p. 29-46, 2019.

MURAKAMI, K.; MINAMIDE, W.; WADA, K.; *et al.* Identification of methicillin-resistant strains of staphylococci by polymerase chain reaction. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 29, n. 10, p. 2240–2244, 1991.

OIE – WORLD ORGANISATION FOR ANIMAL HEALTH. COVID-19. 2021. <https://www.oie.int/en/what-we-offer/emergency-and-resilience/covid-19/> Acesso em 20 de setembro de 2021.

OLAITAN, A.O.; DANDACHI, I.; BARON, S.A.; DAOUD, Z.; MORAND, S.; ROLAIN, J.-M. Banning colistin in feed additives: a small step in the right direction. **The Lancet Infectious Diseases**, v. 21, n. 1, p. 29–30, 2021.

OLSEN, J.E.; CHRISTENSEN, H.; AARESTRUP, F.M. Diversity and evolution of *blaZ* from *Staphylococcus aureus* and coagulase-negative staphylococci. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 57, n. 3, p. 450–60, 2006.

O'NEILL, J. Tackling drug-resistant infections globally: Final report and recommendations. The review on antimicrobial resistance, London: HM Government and the Wellcome Trust, 2016.

NOWAKIEWICZ, A.; ZIÓLKOWSKA, G.; ZIEBA, P.; *et al.* Modified 16S–23S rRNA intergenic region restriction endonuclease analysis for species identification of Enterococcus strains isolated from pigs, compared with identification using classical methods and matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry. **Journal of Medical Microbiology**, v. 64, n. 3, p. 217–223, 2015.

PAHLAVANZADEH, S.; KHOSHBAKHT, R.; KABOOSI, H.; MOAZAMIAN, E. Antibiotic resistance and phylogenetic comparison of human, pet animals and raw milk *Staphylococcus aureus* isolates. **Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases**, v. 79, p. 101717, 2021.

PATERSON, D. L.; BONOMO, R. A. Extended-spectrum beta-lactamases: a clinical update. **Clin. Microbiol.**, v. 18, p. 657–686, 2005.

PEIXOTO, P. V.; BARROS, C. S. L. A importância da necropsia em medicina veterinária. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 18, p. 3-4, 1998.

PÉREZ-ETAYO, L.; BERZOSA, M.; GONZÁLEZ, D.; VITAS, A.I. Prevalence of Integrins and Insertion Sequences in ESBL-Producing *E. coli* Isolated from Different Sources in Navarra, Spain. **Int J Environ Res Public Health**. v. 15, n. 10, 2308, 2018.

PÉREZ-SANCHO, M.; VELA, A.I.; GARCÍA-SECO, T.; GONZÁLEZ, S.; DOMÍNGUEZ, L.; FERNÁNDEZ-GARAYZÁBAL, J.F. Usefulness of MALDI-TOF MS as a Diagnostic Tool for the Identification of *Streptococcus* Species Recovered from Clinical Specimens of Pigs. **PLoS ONE**, v. 12, n. 1, 2017.

PINTO, L.; RADHOUANI, H.; COELHO, C.; MARTINS DA COSTA, P.; SIMOES, R.; BRANDAO, R.M.; *et al.* Genetic detection of extended-spectrum beta-lactamase containing *Escherichia coli* isolates from birds of prey from Serra da Estrela Natural Reserve in Portugal. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 76, n. 12, p. 4118–4120, 2010.

PLANO DE AÇÃO NACIONAL DE PREVENÇÃO E CONTROLE DA RESISTÊNCIA AOS ANTIMICROBIANOS NO ÂMBITO DA SAÚDE ÚNICA 2018-2022 (PAN-BR). Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde, Departamento de Vigilância das Doenças Transmissíveis. Brasília, 2019.

http://bvsmis.saude.gov.br/bvsmis/publicacoes/plano_prevencao_resistencia_antimicrobianos.pdf
Acesso em 19 de março de 2022.

- POSTHAUS, H.; BODMER, T.; ALVES, L.; OEVERMANN, A.; SCHILLER, I.; RHODES, S.G.; ZIMMERLI, S. Accidental infection of veterinary personnel with *Mycobacterium tuberculosis* at necropsy: A case study. **Veterinary Microbiology**, v. 149, p. 374–380, 2011.
- PRESCOTT, J.F.; BRAD HANNA, W.J.; REID-SMITH, R.; DROST, K. Antimicrobial drug use and resistance in dogs. **Can Veterinary Journal**, v. 43, p. 107–116, 2002.
- REBELO, A. R.; BORTOLAIA, V.; KJELDGAARD, J. S. *et al.* Multiplex PCR for detection of plasmid-mediated colistin resistance determinants, *mcr-1*, *mcr-2*, *mcr-3*, *mcr-4* and *mcr-5* for surveillance purposes. **Euro Surveill**, v. 23, n. 6, 2018.
- RADHOUANI, H.; POETA, P.; PINTO, L.; MIRANDA, J.; COELHO, C.; CARVALHO, C.; *et al.* Proteomic characterization of *vanA*-containing *Enterococcus* recovered from Seagulls at the Berlengas Natural Reserve, W Portugal. **Proteome Science**, v. 8, n. 1, p. 48, 2010.
- RADHOUANI, H.; SILVA, N.; POETA, P.; TORRES, C.; CORREIA, S.; IGREJAS, G. Potential impact of antimicrobial resistance in wildlife, environment and human health. **Frontiers in Microbiology**, v. 5, n. 23, p. 1–12, 2014.
- REZANEJAD, M.; KARIMI, S.; MOMTAZ, H. Phenotypic and molecular characterization of antimicrobial resistance in *Trueperella pyogenes* strains isolated from bovine mastitis and metritis. **BMC Microbiology**, v. 19, n. 305, 2019.
- RIBEIRO, M.G.; RISSETI, R.M.; BOLAÑOS, C.A.D.; CAFFARO, K.A.; DE MORAIS, A.C.B.; LARA, G.H.B.; ZAMPROGNA, T.O.; PAES, A.C.; LISTONI, F.J.P.; FRANCO, M.M.J. *Trueperella pyogenes* multispecies infections in domestic animals: a retrospective study of 144 cases (2002 to 2012). **Veterinary Quarterly**, v. 35, n. 2, p. 82 – 87, 2015.
- RODRIGUES, N.M.B.; BRONZATO, G. F.; SANTIAGO, G. S.; BOTELHO, L.A.B.; MOREIRA, B.M.; COELHO, I.S.; SOUZA, M.M.S.; COELHO, S.M.O. The Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization-Time of Flight Mass Spectrometry (MALDI-TOF MS) identification versus biochemical tests: a study with enterobacteria from a dairy cattle environment. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 48, n. 1, p. 132-138, 2016.
- RODRÍGUEZ, C. H.; NASTRO, M.; FAMIGLIETTI, A. Carbapenemases in *Acinetobacter baumannii*. Review of their dissemination in Latin America. **Revista Argentina de Microbiología**. v. 50, n. 3, p. 327–333, 2018.
- RODRÍGUEZ-MEDINA, N.; BARRIOS-CAMACHO, H.; DURAN-BEDOLLA, J.; GARZARAMOS, U. *Klebsiella variicola*: an emerging pathogen in humans. **Emerging Microbes & Infections**, v. 8, n. 1, p. 973–988, 2019.
- ROGERS, K.L.; FEY, P.D.; RUPP, M.E. Coagulase-Negative Staphylococcal Infections, **Infectious Disease Clinics of North America**, v. 23, n. 1, p. 73–98, 2009.
- ROSATO, A.E; KREISWIRTH, B.N; GRAIG, W.A.; EISNER, W.; CLIMO, M.W.; AECHER, G.L. *mecA-blaZ* corepressors in clinical *Staphylococcus aureus* isolates. **Antimicrobial Agents Chemotherapy**, v.47, p. 1463-1466, 2003.
- RUTGERSSON, C.; FICK, J.; MARATHE, N.; KRISTIANSOON, E.; JANZON, A.; ANGELIN, M.; JOHANSSON, A.; SHOUCHE, Y.; FLACH, C.F.; LARSSON, D.G.J.

Fluoroquinolones and *qnr* Genes in Sediment, Water, Soil, and Human Fecal Flora in an Environment Polluted by Manufacturing Discharges. **Environmental Science & Technology**, v. 48, n. 14, p. 7825–7832, 2014.

SARAIVA, M.M.S.; DE LEON, C.M.C.G.; SILVA, N.M.V.; RASO, T.F.; *et al.* *Staphylococcus sciuri* as a Reservoir of *mecA* to *Staphylococcus aureus* in Non-Migratory Seabirds from a Remote Oceanic Island. **Microbial Drug Resistance**, v. 27, n. 4, 2021.

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, n. 3, p. 765–769, 2010.

SAWA, T.; KOOGUCHI, K.; MORIYAMA, K. Molecular diversity of extended-spectrum β -lactamases and carbapenemases, and antimicrobial resistance. **Journal of Intensive Care**, v. 8, n. 1, 2020.

SENG, P.; ROLAIN, J.M.; FOURNIER, P.E.; LA SCOLA, B.; DRANCOURT, M.; RAOULT, D. MALDI-TOF-mass spectrometry applications in clinical microbiology. **Future Microbiology**, v. 5, n. 11, p. 1733–1754, 2010.

SEVERIN, J. A.; LESTARI, E. S.; KUNTAMAN, K.; *et al.* Nasal carriage of methicillin-resistant and methicillin-sensitive strains of *Staphylococcus sciuri* in the Indonesian population. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 54, n. 12, p. 5413–5417, 2010.

SHAHID, M. *Citrobacter* spp. Simultaneously Harboring *bla*_{CTX-M}, *bla*_{TEM}, *bla*_{SHV}, *bla*_{ampC}, and Insertion Sequences IS26 and *orf513*: an Evolutionary Phenomenon of Recent Concern for Antibiotic Resistance. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 48, n. 5, p. 1833–1838, 2010.

SHARMA, S. K.; GALAV, V.; AGRAWAL, M.; FARIDI, F. N.; KUMAR, B. Multi-drug resistance pattern of bacterial flora obtained from necropsy samples of poultry. **Journal of Animal Health and Production**, v. 5, n. 4, p. 165-17, 2017.

SHEN, C.; ZHONG, L.-L.; YANG, Y.; *et al.* Dynamics of *mcr-1* prevalence and *mcr-1*-positive *Escherichia coli* after the cessation of colistin use as a feed additive for animals in China: a prospective cross-sectional and whole genome sequencing-based molecular epidemiological study. *Lancet Microbe*, v. 1, p. 34–43, 2020.

SILBERGELD, E.K.; GRAHAM, J.; PRICE, L.B. Industrial food animal production, antimicrobial resistance, and human health. **Annu. Rev. Public Health**, v. 29, p. 151–169, 2008.

SMITH, D.L.; HARRIS, A.D.; JOHNSON, J.A.; SILBERGELD, E.K.; MORRIS, J.G. Animal antibiotic use has an early but important impact on the emergence of antibiotic resistance in human commensal bacteria. **Proc. Natl. Acad. Sci**, v. 99, n. 9, p. 6434–6439, 2002.

SO, A.; FURLONG, M.; HEDDINI, A. Globalisation and antibiotic resistance. **British Medical Journal**, v. 341, p. 615–616, 2010.

SOARES, V.M. Emergência de *Klebsiella pneumoniae* produtora de carbapenemase (KPC) em um hospital terciário. **Bras. Patol. Med. Lab.**, v. 48, n. 4, p. 251–253, 2012.

SOUZA, M. M. S.; COELHO, S. M. O.; COELHO, I. S.; *et al.* Antimicrobial resistance in animal production: an overview. **Revista Brasileira de Medicina Veterinária**, v. 38, p. 68-74, 2016.

STĘPIEŃ-PYŚNIAK, D.; HAUSCHILD, T.; RÓŻAŃSKI, P.; MAREK, A. MALDI-TOF Mass Spectrometry as a Useful Tool for Identification of Enterococcus spp. from Wild Birds and Differentiation of Closely Related Species. **Journal of Microbiology Biotechnology**, v. 27, n.6, p. 1128–1137, 2017.

STRAUB, J.A.; HERTEL, C.; HAMMES, W.P. A 23S RNAr-targeted polymerase chain reaction-based system for detection of *Staphylococcus aureus* in meat started cultures and dairy products. **Journal of Food Protection**, v.62, p. 1150–1156, 1999.

SUKRU, K.; UGUR, P.; TUGBA, Y.H.; ALI, O.M. Molecular Identification of *Aerococcus viridans* Associated with Bovine Mastitis and Determination of Antibiotic Susceptibilities. **Arch Animal Husb & Dairy Sci**. v. 1, n. 1, 2018.

SYKES, J.E. Antimicrobial drug use in dogs and cats. In GIGUÈRE S.; PRESCOTT, J.F.; DOWLING, P.M. Antimicrobial Therapy in Veterinary Medicine, 5th ed, pp. 473–494. Iowa State University Press, USA, 2013.

TAUBES, G. The bacteria fight back. **Science**, v. 321, p. 356–361, 2008.

TORRES-CORRAL, Y.; FERNÁNDEZ-ÁLVAREZ, C.; SANTOS, Y. Proteomic and molecular fingerprinting for identification and tracking of fish pathogenic *Streptococcus*. **Aquaculture**, v. 498, p. 322–334, 2019.

TUNON, G.I.L.; SILVA, E.P.; FAIERSTEIN, C.C. Isolamento de estafilococos multirresistentes de otites em cães e sua importância para a saúde pública. **Boletim Epidemiológico Paulista**, v. 5, n. 58, p. 4–7, 2008.

VAN DER KOLK, J. H.; ENDIMIANI, A.; GRAUBNER, C.; GERBER, V.; PERRETEEN, V. *Acinetobacter* in veterinary medicine, with an emphasis on *Acinetobacter baumannii*. **Journal of global antimicrobial resistance**, v. 16, p. 59–71, 2019.

VENUGOPAL, N.; MITRA, S.; TEWARI, R.; GANAIE, F.; SHOME, R.; RAHMAN, H.; SHOME, B.R. Molecular detection and typing of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and methicillin-resistant coagulase-negative staphylococci isolated from cattle, animal handlers, and their environment from Karnataka, Southern Province of India, **Veterinary World**, v. 12, n. 11, p. 1760–1768, 2019.

VIJAYAKUMAR, S.; BISWAS, I.; VEERARAGHAVAN, B. Accurate identification of clinically important *Acinetobacter* spp.: an update. **Future science OA**, v. 5, n. 7, p. FSO395, 2019.

WALLER, K. P.; ASPAN, A.; NYMAN, A.; PERSSON, Y.; ANDERSSON, U. G. CNS species and antimicrobial resistance in clinical and subclinical bovine mastitis. **Veterinary Microbiology**, v.152, p.112–116, 2011.

WANG, C.; FENG, Y.; LIU, L.; WEI, L.; KANG, M.; ZONG, Z. Identification of novel mobile colistin resistance gene *mcr-10*. **Emerging Microbes & Infections**, v. 9, n. 1, p. 508–516, 2020.

WANGER, A. R.; MORRIS, S. L.; ERICSSON, C.; SINGH, K. V.; LAROCCO, M. T. Latex agglutination-negative methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* recovered from neonates: epidemiologic features and comparison of typing methods. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 30, p. 2583–2588, 1992.

WASYL, D.; ZAJĄC, M.; LALAK, A.; SKARŻYŃSKA, M.; SAMCIK, I.; KWIT, R.; *et al.* Antimicrobial Resistance in *Escherichia coli* Isolated from Wild Animals in Poland. **Microbial Drug Resistance**, v. 24, n. 6, p. 807–815, 2018.

WOODFORD, N.; JOHNSON, A.; MORRISON, D.; SPELLER, D. Current perspectives on glycopeptide resistance. **Clin. Microbiol. Rev.**, v. 8, p. 585–615, 1995.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. One Health. 2017a. <https://www.who.int/news-room/questions-and-answers/item/one-health> Acesso em 20 de agosto de 2021.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Prioritization of pathogens to guide discovery, research and development of new antibiotics for drug-resistant bacterial infections, including tuberculosis. 2017b. <https://www.who.int/publications/i/item/WHO-EMP-IAU-2017.12> Acesso em 31 de outubro de 2021.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. WHO publishes list of bacteria for which new antibiotics are urgently needed. 2017c <https://www.who.int/news/item/27-02-2017-who-publishes-list-of-bacteria-for-which-new-antibiotics-are-urgently-needed> Acesso em 07 de novembro de 2021.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. WHO Antibiotic Categorization. 2019. <https://aware.essentialmeds.org/groups> Acesso em 20 de setembro de 2021.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Tripartite and UNEP support OHHLEP’s definition of “One Health”. 2021. (<https://www.who.int/news/item/01-12-2021-tripartite-and-unep-support-ohhlepe-s-definition-of-one-health>) Acesso em 10 de dezembro de 2021.

ZHANG, K.; SPARLING, J.; CHOW, B. L.; ELSAYED, S.; HUSSAIN, Z.; CHURCH, D. L.; GREGSON, D. B.; LOUIE, T.; CONLY, J. M. New quadriplex PCR assay for detection of methicillin and mupirocin resistance and simultaneous discrimination of *Staphylococcus aureus* from coagulase-negative staphylococci. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 42, n. 11, p. 4947–4955, 2004.

ZONG, Z.; PENG, C.; LU, X. Diversity of SCC*mec* elements in methicillin-resistant coagulase-negative *Staphylococcus* clinical isolates. **PLoS One**, v. 6, n. 5, 2009.