

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

**TESE**

**OCORRÊNCIA, RESISTÊNCIA, VIRULÊNCIA E DIVERSIDADE  
GENÉTICA DE *Staphylococcus pseudintermedius* ORIUNDOS DE  
PROCESSOS INFECCIOSOS EM ANIMAIS DE COMPANHIA**

**Cássia Couto da Motta**

**2018**



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

**OCORRÊNCIA, RESISTÊNCIA, VIRULÊNCIA E DIVERSIDADE  
GENÉTICA DE *Staphylococcus pseudintermedius* ORIUNDOS DE  
PROCESSOS INFECCIOSOS EM ANIMAIS DE COMPANHIA**

**CÁSSIA COUTO DA MOTTA**

*Sob a orientação da Professora*  
**Miliane Moreira Soares de Souza**

*e Coorientação da Professora*  
**Shana de Mattos de Oliveira Coelho**

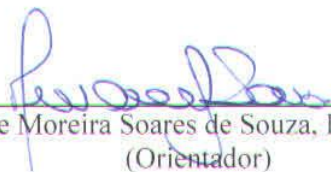
Tese submetida como requisito parcial  
para obtenção do grau de **Doutora em**  
**Ciências**, no Programa de Pós-  
Graduação em Ciências Veterinárias.

Seropédica, RJ  
Abril de 2018

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

CÁSSIA COUTO DA MOTTA

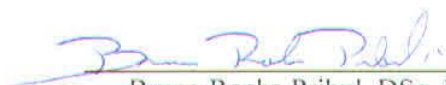
Qualificação submetida como requisito parcial para obtenção do grau de Doutora em Ciências, no curso de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, área de concentração Ciências Veterinárias.



Miliane Moreira Soares de Souza, DSc. UFRRJ  
(Orientador)



Bruno de Araújo Penna, DSc. UFF



Bruno Rocha Pribul, DSc. Fiocruz



Irene da Silva Coelho, DSc. UFRRJ



Marcia Giambiagi de Marval, DSc. UFRJ

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

M921o Motta, Cássia Couto da, 1989-  
OCORRÊNCIA, RESISTÊNCIA, VIRULÊNCIA E DIVERSIDADE  
GENÉTICA DE Staphylococcus pseudintermedius ORIUNDOS  
DE PROCESSOS INFECCIOSOS EM ANIMAIS DE COMPANHIA /  
Cássia Couto da Motta. - 2018.  
90 f.

Orientadora: Miliane Moreira Soares de Souza.  
Coorientadora: Shana de Mattos de Oliveira Coelho.  
Tese(Doutorado). -- Universidade Federal Rural do  
Rio de Janeiro, PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS  
VETERINÁRIAS, 2018.

1. Processos infecciosos em animais de companhia.  
2. Staphylococcus pseudintermedius. 3. Resistência a  
antimicrobianos. 4. Virulência. 5. Diversidade  
genética. I. de Souza, Miliane Moreira Soares , 1970  
, orient. II. Coelho, Shana de Mattos de Oliveira,  
1980-, coorient. III Universidade Federal Rural do  
Rio de Janeiro. PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS  
VETERINÁRIAS. IV. Título.

## AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus pela minha vida e saúde para seguir esta caminhada.

À Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, pela incrível experiência de vida. Lugar que por onze anos foi a minha segunda casa, onde amadureci, cresci profissionalmente e fiz amizades para vida toda. Esse lugar mágico ficará gravado na alma e deixará marcas eternas em mim.

Aos meus pais, meus maiores incentivadores, Humberto Machado da Motta e Tânia Lúcia Gonçalves Couto da Motta, por me mostrarem que a maior herança que se deixa aos filhos é a educação. Por nunca terem medido esforços para que eu pudesse ter acesso ao bom ensino, mesmo nos momentos mais difíceis e, principalmente, pelo amor incondicional. Aos meus avós, o meu muito obrigado pelo carinho, por participarem da minha educação e formação como ser humano. Vocês estarão eternamente em meu coração.

Ao meu marido e companheiro há nove anos, Herbet Pereira dos Santos. Obrigada por todo o amor, respeito e paciência. Pelos os anos que estamos juntos, fortalecendo e incentivando um ao outro.

A minha orientadora, Dra. Miliane Moreira Soares de Souza, por ser meu exemplo de profissional e pela confiança depositada. Muito obrigada por acreditar no meu trabalho e permitir que ele fosse conduzido sob sua orientação.

À equipe do laboratório de Medicina Veterinária Preventiva da Iowa State University (ISU, EUA), sob a orientação da Dr. Catherine Mary Logue, que me acolheu, possibilitando a realização de parte deste estudo, e participou dos cinco meses mais especiais da minha vida.

A coorientadora, Dra. Shana de Mattos de Oliveira Coelho, pelos conselhos e incentivo. Muito obrigada.

A professora Dra. Irene da Silva Coelho, pelo carinho, paciência e vontade desmedida em cooperar para o sucesso deste trabalho! Muito obrigada.

Às amiga e companheira de laboratório Bianca Soares, pela amizade e colaboração com as análises de diversidade, sendo fundamental para conclusão deste estudo.

Às amigas e companheiras de laboratório Dayanne Melo e Marisol Gómez, pela amizade e colaboração. Vocês foram especialmente importantes ao longo deste estudo.

A todos os amigos e colegas de Pós-Graduação e laboratório, Bruno Oliveira, Daniel Paiva, Felipe Carlos Dubenczuk, Greiciane Bronzato, Mário Makita, Mario Bonci e Ramon Pimenta. Obrigada por tornarem o trabalho mais prazeroso e colaborativo.

A todos os estagiários do LABAC VET que colaboraram com este trabalho, em especial Thomas Santos e Richard Garcia, por toda ajuda, disponibilidade e capacidade. Vocês foram essenciais.

Aos ex e atuais residentes do Programa de Residência Multiprofissional em Medicina Veterinária da UFRRJ, que não medem esforços para a realização de um bom trabalho. Obrigada pelo suporte e colaboração para a realização deste estudo.

Aos professores e funcionários do Departamento de Microbiologia e Imunologia Veterinária pela amizade e carinho.

A toda equipe do Laboratório de Diagnóstico Veterinário Vet Análises, pelo apoio, amizade e pelo prazer que é trabalhar com vocês.

Ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias da UFRRJ e funcionários, pelas condições que recebemos para trabalhar e estudar.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e à Coordenação De Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelas bolsas de estudos, patrocínios e fomentos agraciados durante o doutorado.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro (FAPERJ) pelos patrocínios e fomentos agraciados durante o doutorado.

Por fim, a todos que de alguma forma contribuíram para a conclusão deste ciclo. Meus sinceros agradecimentos.

## BIOGRAFIA

Cássia Couto da Motta ingressou no curso de Medicina Veterinária da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro no ano de 2007, diplomando-se em janeiro de 2012. Em 2008, foi estagiária no Laboratório de Quimioterapia Experimental em Parasitologia Veterinária do Departamento de Parasitologia Animal, Instituto de Veterinária, da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro. Estagiou no Laboratório de Bacteriologia Veterinária, do período de 2009 a 2011, realizando projetos na área de mastite bovina. Foi bolsista de iniciação científica do CNPq de 2010 a 2011, com projeto intitulado “Caracterização genotípica da resistência e virulência em isolados de *Staphylococcus* spp. a partir de mastite bovina como subsídio para implementação de Boas Práticas de Ordenha.”, sob a orientação da professora Dra. Miliane Moreira Soares de Souza. Em 2012, ingressou no Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias (PPGCV – UFRRJ), nível Mestrado (bolsa CNPq), sob a orientação da professora Dra. Miliane Moreira Soares de Souza. Após a conclusão do Mestrado, em 2014, iniciou sua pesquisa de Doutorado (bolsa CNPq/PPGCV – UFRRJ). Durante o curso de Pós-Graduação ministrou aulas teórico-práticas na disciplina Bacteriologia Veterinária na UFRRJ, sob a orientação da professora Dra. Miliane Moreira Soares de Souza, além de outras colaborações na mesma instituição, na disciplina Microbiologia Básica sob a orientação da professora Dra. Shana Mattos de Oliveira Coelho. No período compreendido entre abril e setembro de 2017 realizou doutorado “sanduíche” pela CAPES (Processo nº 88881.135567/2016-01) na Iowa State University (EUA), desenvolvendo o projeto intitulado “Tipagem e análise genotípica de resistência e virulência em *Staphylococcus pseudintermedius* oriundos de processos infecciosos em animais de companhia”, sob a orientação das professoras Dra. Catherine Mary Logue e Dra. Miliane Moreira Soares de Souza.

## RESUMO

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

No Brasil, a prevalência de *Staphylococcus pseudintermedius* metilina-resistentes como causa de processos infecciosos em animais de companhia permanece desconhecida. A emergência de MRSP é um desafio para a Medicina Veterinária, uma vez que pode acarretar falhas terapêuticas. O presente estudo fornece uma visão da ocorrência de cepas MRSP multirresistentes oriundas de amostras clínicas caninas e felinas do Rio de Janeiro, Brasil. Um total de 92 isolados de *S. pseudintermedius* foi investigado quanto à formação de biofilme, presença de genes de virulência que codificam enterotoxinas estafilocócicas (*sea*, *seb*, *sed*, *sec*, *seC<sub>canine</sub>* e *se-int*), leucocidinas (*lukS-lukF*, *lukE-lukD* e *lukM*), hemolisinas (*hla*, *hlb*, *hld*, *hlg*, *hglv*) e toxinas esfoliativas (*eta*, *etb*, *etd*, *siet* e *exi*), suscetibilidade à metilina e presença dos genes *mec*. O estudo da diversidade genética foi realizado com as cepas MRSP através da tipagem do SCC*mec*, do gene *spa* e das técnicas de PFGE e MLST. A maioria dos isolados avaliados (93,0%; 81/87) foi classificada como produtora de biofilme, em diferentes intensidades. Dentre os genes de virulência pesquisados, 97,8% (90/92) dos isolados amplificaram o gene *siet*, que codifica uma toxina esfoliativa de *S. pseudintermedius*, 87,0% (80/92) amplificaram o gene *se-int*, relacionado à produção de enterotoxina nessa espécie, e 12,0% (11/92) o gene que codifica o bicomponente da leucotoxina LukE-LukD (*lukE/D*) em *S. aureus*. Nenhum isolado amplificou os demais genes de virulência pesquisados. Quanto à resistência à metilina, 22 (23,9%) foram identificados como MRSP por difusão em disco, microdiluição em caldo e presença do gene *mecA*. Após a tipificação do SCC*mec*, o tipo de cassete frequentemente encontrado foi o II-III (81,8%; 18/22), seguido de SCC*mec* não-tipáveis (13,6%; 3/22) e de SCC*mec* IV (4,5%; 1/22). Além disso, foi observada multirresistência em todas as cepas MRSP. Quatro tipos de *spa* intimamente relacionados foram detectados: t02 (72,2%; 13/18), t15 (16,6%; 3/18), t05 (5,6%; 1/18) e t06 (5,6%; 1/18). A técnica de PFGE permitiu a identificação de dois clones, além de outras duas cepas relacionadas. Através da tipagem por MLST, três STs/CCs (ST/CC71, ST265/CC258 e ST282/CC45) que nunca foram reportados em cepas MRSP brasileiras oriundas de processos infecciosos puderam ser detectados. Além desses, dois novos STs (NST) foram identificados e serão submetidos ao curador da base do banco de dados do MLST. A predominância da linhagem mundialmente disseminada ST/CC71-*spat02*-SCC*mec*II-III (54,5%; 12/22) dentre as cepas avaliadas foi revelada. A análise comparativa dos métodos de tipagem utilizados evidenciou a importância da combinação de técnicas para a compreensão da estrutura populacional de cepas MRSP. Os resultados obtidos confirmam a necessidade do monitoramento de patógenos multirresistentes e de mais estudos no Brasil que busquem determinar a prevalência e as características de MRSP em animais de companhia, fornecendo dados de que subsidiarão medidas preventivas e de controle.



## ABSTRACT

MOTTA, Cássia Couto da. **Occurrence, resistance, virulence and genetic diversity of *Staphylococcus pseudintermedius* originated from clinical specimens of companion animals.** 2018. 90 p. Thesis (Ph.D. in Veterinary Science) Veterinary Institute, Department of Animal Parasitology, Federal Rural University of Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2018.

In Brazil, the prevalence of methicillin-resistant *Staphylococcus pseudintermedius* (MRSP) as a cause of infectious diseases in companion animals remains unknown. The emergence of MRSP is a challenge in veterinary medicine as multidrug resistant strains may potentially result in treatment failures. This study provides an overview of the occurrence and characterization of multidrug-resistant MRSP strains from canine and feline clinical samples in Rio de Janeiro, Brazil. A total of 92 *S. pseudintermedius* isolates were investigated for biofilm formation, presence of virulence genes (*sea*, *seb*, *sed*, *sec*, *seC<sub>canine</sub>*, *se-int*, *lukS-lukF*, *lukE-lukD*, *lukM*, *hla*, *hlb*, *hld*, *hlg*, *hgl*, *eta*, *etb*, *etd*, *siet* and *exI*), methicillin susceptibility and presence of *mec* genes. Most of the isolates (92.0%, 81/88) were classified as biofilm producers. Among the virulence genes detected, 97.8% (90/92) of the isolates amplified the *siet* gene, which encode an exfoliated toxin of *S. pseudintermedius*, 87.0% (80/92) the *se-int* gene, a enterotoxin-gene related, and 12.0% (11/92) the gene encoding the LukE-LukD leukotoxin (*lukE/D*) bicomponent of *S. aureus*. No isolates amplified the remaining virulence genes. Regarding methicillin resistance, 22 (23.9%) were identified as MRSP by both methods tested (disk diffusion and broth dilution) and by the presence of the *mecA* gene. These strains were submitted to SCC*mec* typing which revealed that the dominant SCC*mec* were type II-III (81,8%; 18/22), followed by non-typeable SCC*mec* (13,6%; 3/22) and SCC*mec* IV (4,5%; 1/22). Furthermore, multidrug resistance (MDR) was found in all MRSP isolates. Four types of closely related *spa* were detected: t02 (72.2%, 13/18), t15 (16.6%, 3/18), t05 (5.6%, 1/18) and t06 (5.6%; 1/18). PFGE analysis allowed the identification of two clones and two related strains. MLST typing revealed three STs/CCs (ST/CC71, ST265/CC258, and ST282/CC45) never reported in Brazilian MRSP strains from clinical specimens. In addition, two new STs (NSTs) have been identified and will be submitted to the curator of the MLST database. The predominance of the ST/CC71-*spa*t02-SCC*mec*II-III (54.5%, 12/22) worldwide strain among the strains evaluated was revealed. The comparative analysis of the typing methods used evidenced the importance of combined analysis for understanding the population structure of MRSP. The results confirm the importance of monitoring multidrug-resistant pathogens and the need of further studies in Brazil to determine the prevalence and the characteristics of MRSP in companion animals from this region, providing data that will support preventive and control measures.

## LISTA DE ABREVIÇÕES

<b>AMH</b>	Ágar Müller-Hinton
<b>AMVF</b>	Ágar Manitol Vermelho de Fenol
<b>BHI</b>	Infuso Cérebro Coração
<b>CC</b>	Complexo Clonal
<i>ccr</i>	“Cassete Chromosome Recombinases”
<b>CIP</b>	Ciprofloxacina
<b>CLO</b>	Cloranfenicol
<b>CLSI</b>	“Clinical and Laboratory Standards Institute”
<b>CMH</b>	Caldo Müller-Hinton
<b>DNA</b>	Ácido Desoxiribonucléico
<b>dNTP</b>	Desorribonucleotídeo trifosfatado
<b>ECN</b>	Estafilococos Coagulase-Negativos
<b>ECP</b>	Estafilococos Coagulase-Positivos
<b>ERI</b>	Eritromicina
<b>GEN</b>	Gentamicina
<b>h</b>	Horas
<b>HVPA</b>	Hospital Veterinário de Pequenos Animais
<b>H<sub>2</sub>O</b>	Água
<b>IS431</b>	Ilha de patogenicidade 431
<b>KAN</b>	Kanamicina
<b>KOH</b>	Hidróxido de potássio
<b>LIN</b>	Lincomicina
<b>m/s</b>	metros/segundo
<b>mg</b>	Miligramas
<b>MgCl<sub>2</sub></b>	Cloreto de magnésio
<b>min</b>	Minuto (s)
<b>ml</b>	Mililitro (s)
<b>mM</b>	Milimolar
<b>mm</b>	Milímetro (s)
<b>MALDI-TOF MS</b>	Espectrometria de Massa por Tempo de Vôo de Ionização/Desorção por Laser Assistida por Matriz (“Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization–Time of Flight Mass Spectrometry”)
<b>MRSA</b>	<i>Staphylococcus aureus</i> resistentes à meticilina (“Methicillin resistant <i>Staphylococcus aureus</i> ”)
<b>MRSP</b>	<i>Staphylococcus pseudintermedius</i> resistentes à meticilina (“Methicillin resistant <i>Staphylococcus pseudintermedius</i> ”)
<b>NaCl</b>	Cloreto de sódio
<b>ng</b>	Nanogramas
<b>nm</b>	Nanômetro
<b>OXA</b>	Oxacilina
<b>pb</b>	Pares de base
<b>PBP</b>	Proteína Ligadora de Penicilina (“Penicillin Binding Protein”)
<b>PCR</b>	Reação em Cadeia de Polimerase (“Polymerase Chain Reaction”)
<b>PEN</b>	Penicilina
<b>PFGE</b>	Eletofórese em Campo Pulsado (“Pulsed-Field Gel Electrophoresis”)

<b>pH</b>	Potencial hidrogeniônico
<b>rpm</b>	Rotação por minuto
<b>SCC<sub>mec</sub></b>	Cassete cromossômico estafilocócico <i>mec</i> ("staphylococcal cassette chromosome")
<b>s</b>	Segundo (s)
<b>SDS</b>	Dodecil sulfato de sódio
<b>ST</b>	Tipo de Sequência ("Sequence Type")
<b>TE</b>	Tris EDTA
<b>TET</b>	Tetraciclina
<b>TSA</b>	Ágar Trypticase de Soja
<b>U</b>	Unidade
<b>USA</b>	"United States of America"
<b>UI</b>	Unidades internacionais
<b>V</b>	Voltagem
<b>µg</b>	Micrograma
<b>µl</b>	Microlitro
<b>°C</b>	Graus Celsius

## ÍNDICE DE FIGURAS

	Pág.
<b>Figura 1</b>	26
Eletoforese em gel de agarose 2,0 % dos produtos de amplificação do gene <i>nuc</i> (926 pb). M: Marcador de tamanho molecular (Hi-Lo Dna Marker <sup>□</sup> – 10.000 pb); 1: Controle positivo ( <i>Staphylococcus pseudintermedius</i> CD93); 2 – 9: Isolados positivos ( <i>Staphylococcus pseudintermedius</i> ); Br: Branco.	
<b>Figura 2</b>	28
Eletoforese em gel de agarose 2,0 % dos produtos de amplificação do gene <i>siet</i> (359 pb). M: Marcador de tamanho molecular (Bionexus <sup>TM</sup> Hi-Lo DNA Marker <sup>□</sup> – 10.000 pb); 1 – 3: <i>Staphylococcus pseudintermedius</i> positivos para o gene <i>siet</i> ; Br: Branco.	
<b>Figura 3</b>	29
Eletoforese em gel de agarose 2,0 % dos produtos de amplificação do gene <i>se-int</i> (874 pb). Br: Branco; 1 – 3: <i>Staphylococcus pseudintermedius</i> positivos para o gene <i>se-int</i> ; M: Marcador de tamanho molecular (Bionexus <sup>TM</sup> Hi-Lo DNA Marker <sup>□</sup> 10.000 pb).	
<b>Figura 4</b>	29
Eletoforese em gel de agarose 2,0 % dos produtos de amplificação do gene <i>luke/D</i> (269 pb). 1 – 3: <i>Staphylococcus pseudintermedius</i> positivos para o gene <i>luke/D</i> ; 4 e 5: <i>Staphylococcus pseudintermedius</i> negativos para o gene <i>luke/D</i> ; Br: Branco; M: Marcador de tamanho molecular (Bionexus <sup>TM</sup> Hi-Lo DNA Marker <sup>□</sup> 10.000 pb).	
<b>Figura 5</b>	31
Ensaio de difusão em disco (DD) de oxacilina (1 <sup>□</sup> g). Isolado <i>Staphylococcus pseudintermedius</i> resistente.	
<b>Figura 6</b>	31
Ensaio de microdiluição em caldo para determinação da CIM. Br: Branco (água mili-Q); CP: Controle Positivo ( <i>Staphylococcus aureus</i> subsp. <i>aureus</i> ATCC <sup>®</sup> 33591 <sup>TM</sup> ); 1-10: Isolados <i>S. pseudintermedius</i> resistentes à oxacilina (diferentes concentrações).	
<b>Figura 7</b>	37
Dendograma de similaridade gerado a partir da técnica de PFGE através do método UPGMA e complemento do índice de Dice (Bionumerics, Versão 6.6 Applied Math®, Austin, TX; 1% de tolerância e otimização de 0,5%). Ponto de corte ao nível de 85% de similaridade genética (linha de cor vermelha). Tipos de SCCmec, spa e agrupamentos gerados a partir dos padrões de restrição enzimática. a Sítio de infecção não informado; b não-tipável; c cepa não clivada pela enzima <i>SmaI</i> .	
<b>Figura 8</b>	40
(A) Gráfico de torta representando os tipos de sequência (STs) das cepas MRSP avaliadas. (B) Aplicação do algoritmo PHILOViZ, mostrando a estrutura populacional e retratando a distribuição clonal das cepas MRSP investigadas. Cada tipo de sequência é representado por um círculo e dentro de cada um estão inseridas as cepas representantes. Os retângulos na cor verde destacam as cepas do grupo III e os retângulos na cor azul destacam as do grupo X, de acordo com o padrão de restrição obtido com a técnica de PFGE. As cepas que não puderam ter o ST determinado e deverão gerar novos STs (NST) foram demonstradas com por única cor (azul claro) e as que apresentaram combinações exatas foram representadas pelo círculo azul escuro.	

## ÍNDICE DE QUADROS

	<b>Pág.</b>
<b>Quadro 1.</b> Resultados esperados na identificação fenotípica das espécies de ECP	16
<b>Quadro 2.</b> Iniciadores e ciclos empregados para identificação genotípica	17
<b>Quadro 3.</b> Interpretação dos escores resultantes da avaliação proteômica por MALDI-TOF MS	17
<b>Quadro 4.</b> Iniciadores e ciclos empregados para a amplificação dos genes de virulência	19
<b>Quadro 5.</b> Iniciadores e ciclos empregados para a amplificação dos genes <i>mec</i>	21
<b>Quadro 6.</b> Iniciadores e ciclos empregados para a tipificação dos elementos SCC <i>mec</i>	22
<b>Quadro 7.</b> Iniciadores e ciclos empregados para a amplificação do gene <i>spa</i>	23
<b>Quadro 8.</b> Iniciadores e ciclos empregados para a amplificação por PCR dos sete <i>loci</i> para tipificação por MLST	25

## ÍNDICE DE TABELAS

	<b>Pág.</b>
<b>Tabela 1.</b> Isolamento de <i>Staphylococcus pseudintermedius</i> por sítio de infecção e espécie animal	27
<b>Tabela 2.</b> Produção de biofilme nos isolados de <i>Staphylococcus pseudintermedius</i> por sítio de infecção	27
<b>Tabela 3.</b> Identificação por MALDI-TOF MS, perfil de resistência à meticilina e tipos de SCC <i>mec</i>	33
<b>Tabela 4.</b> Tipo de SCC <i>mec</i> e perfil de resistência das 22 cepas MRSP investigadas	34
<b>Tabela 5.</b> Origem e tipos de <i>spa</i> das cepas avaliadas	35
<b>Tabela 6.</b> Perfil alélico gerado através da tipagem por MLST	39
<b>Tabela 7.</b> Origem, perfis de virulência, resistência e tipagem molecular das 24 cepas de <i>Staphylococcus pseudintermedius</i> investigadas	42

## SUMÁRIO

	Pág.
<b>1. INTRODUÇÃO</b>	<b>1</b>
<b>2. REVISÃO DE LITERATURA</b>	<b>2</b>
2.1 Taxonomia	2
2.1.1 Gênero <i>Staphylococcus</i> sp.	2
2.1.2 <i>Staphylococcus pseudintermedius</i>	2
2.2 Identificação de <i>Staphylococcus pseudintermedius</i>	3
2.3 Patogenicidade e potencial zoonótico	5
2.4 Fatores de virulência	6
2.5 <i>Staphylococcus pseudintermedius</i> metilina-resistentes (MRSP) e multirresistência	8
2.6 Tipagem molecular de cepas MRSP	9
2.6.1 Eletroforese em Gel de Campo Pulsado (“Pulsed Field Gel Electrophoresis” – PFGE)	9
2.6.2 Tipagem do gene <i>spa</i>	10
2.6.3 Tipagem da Sequência Multilocus (“Multilocus Sequence Typing” – MLST)	11
2.6.4 Tipagem do cassete cromossômico <i>mec</i> (SCC <i>mec</i> )	12
<b>3. OBJETIVOS</b>	<b>13</b>
<b>4. MATERIAL E MÉTODOS</b>	<b>14</b>
4.1. Amostragem	14
4.1.1 Isolamento e identificação presuntiva de <i>Staphylococcus</i> coagulase-positivos	14
4.1.2 Prova do hidróxido de potássio (KOH) 3% e prova da catalase	14
4.1.3 Prova da coagulase	15
4.1.4 Prova de suscetibilidade à bacitracina e à polimixina	15
4.1.5 Prova de Voges-Proskauer e fermentação de manose e maltose	15
4.2. Identificação molecular de <i>Staphylococcus pseudintermedius</i>	16
4.2.1 Liberação do DNA bacteriano por lise térmica	16
4.2.2 Identificação pela técnica da Reação em Cadeia da Polimerase (“Polymerase Chain Reaction” – PCR)	16
4.2.3 Identificação proteômica por MALDI-TOF MS	17
4.3. Detecção da produção de “slime” em microplaca de poliestireno	18
4.4. Detecção de genes de virulência	18
4.5. Detecção fenotípica da resistência aos antimicrobianos	19
4.5.1 Difusão em disco de oxacilina	19
4.5.2 Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) para oxacilina	20
4.5.3 Detecção da resistência à vancomicina por Ágar Screen	20
4.5.4 Antibiograma automatizado para detecção de isolados multirresistentes	20
4.6. Detecção de genes <i>mec</i>	21
4.7. Caracterização dos cassetes cromossômicos <i>mec</i> (SCC <i>mec</i> )	21
4.8. Estudo da diversidade de cepas MRSP	22
4.8.1 Tipagem pelo gene <i>spa</i>	22
4.8.2 Eletroforese em Campo Pulsado (“Pulsed-field Gel Electrophoresis” – PFGE)	23
4.8.3 Tipagem da Sequência Multilocus (“Multilocus Sequence Typing” – MLST)	24
<b>5. RESULTADOS E DISCUSSÃO</b>	<b>26</b>
5.1. Identificação de <i>Staphylococcus pseudintermedius</i> e perfil das amostras clínicas	26
5.2. Detecção da produção de “slime” em microplaca de poliestireno	27

5.3. Detecção genotípica de fatores de virulência	28
5.4. Detecção da resistência aos antimicrobianos	30
5.4.1 Detecção fenotípica da resistência à metilina	30
5.4.2 Detecção do gene <i>mecA</i> e caracterização dos cassetes <i>SCCmec</i>	31
5.4.3 Detecção de multirresistência nas cepas MRSP	33
5.5. Estudo da diversidade das cepas MRSP	34
5.5.1 Tipagem do gene <i>spa</i>	34
5.5.2 Eletroforese em Campo Pulsado (“Pulsed-field Gel Electrophoresis” – PFGE)	35
5.5.3 Tipagem da Sequência Multilocus (“Multilocus Sequence Typing” – MLST)	38
5.5.4 Análise comparativa dos perfis genéticos gerados pelas técnicas de tipagem molecular	41
<b>6. CONCLUSÕES</b>	<b>46</b>
<b>7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b>	<b>47</b>
<b>ANEXOS</b>	<b>68</b>



# 1 INTRODUÇÃO

*Staphylococcus pseudintermedius* é comumente presente na pele e mucosas de cães e é o patógeno bacteriano mais frequentemente isolado de amostras clínicas caninas. Embora os cães sejam os hospedeiros naturais, pode colonizar e infectar outras espécies animais, principalmente gatos e também humanos. Produz diversos fatores de virulência e também é capaz de formar biofilmes, no entanto, a maioria desses fatores de *S. pseudintermedius* ainda não foi totalmente caracterizada. Esse patógeno é primariamente associado a infecções de pele e ouvidos, mas também pode estar envolvido em diversos outros quadros, que podem ter o tratamento complicado se a cepa envolvida for resistente à metilina (MRSP).

Mais de uma década após a descrição e a reclassificação dessa espécie, a heterogeneidade dos membros do Grupo *Staphylococcus intermedius* (SIG) e a ausência de “kits” e sistemas comerciais de identificação acessíveis e acurados dificultam a diferenciação fenotípica entre as espécies, que segue como um desafio ao diagnóstico veterinário. A notada importância desse agente para a Medicina Veterinária de pequenos animais e os frequentes casos de infecções associadas a cepas multirresistentes reforçam a necessidade da acurada identificação dos isolados provenientes de amostras clínicas.

O surgimento de bactérias multirresistentes representa um dos principais problemas para a Medicina Veterinária de pequenos animais, uma vez que a distribuição e a prevalência desses organismos em espécimes clínicos animais são relativamente desconhecidas, assim como a presença e circulação de genes como o *mecA*, implicado na resistência à metilina, e seu potencial de propagação em animais de companhia.

O gene *mecA* está localizado em um elemento genético móvel, denominado cassete cromossômico estafilocócico *mec* (“staphylococcal cassette chromosome” – SCC*mec*), de diferentes tipos, que pode ser transferido e se integrar ao genoma de diferentes espécies de estafilococos. Esse cassete pode carrear ainda outros elementos genéticos, que codificam resistência a diversas classes de antimicrobianos e a transferência horizontal do gene *mecA* e desses elementos genéticos inseridos no SCC*mec*, resultou na disseminação mundial de clones metilina e multirresistentes. Em MRSP são descritos diferentes tipos de elementos SCC*mec*, no entanto, dados de frequência e distribuição desses elementos em cepas brasileiras permanecem pouco conhecidos. Diferentes técnicas têm sido empregadas para caracterizar e determinar a diversidade genética de cepas MRSP. A Eletroforese em Gel de Campo Pulsado (“Pulsed Field Gel Electrophoresis” – PFGE), a tipagem do gene *spa*, a Tipagem da Sequência Multilocus (“Multilocus Sequence Typing” – MLST) e a tipagem do cassete SCC*mec* são os métodos frequentemente utilizados e que têm possibilitado a comparação mundial de cepas, estudos acerca da estrutura populacional, bem como a discussão dos mecanismos de evolução desses patógenos.

O presente trabalho avaliou a ocorrência de MRSP multirresistentes oriundos de amostras clínicas de cães e gatos, visando o estudo da diversidade genética dessas cepas através da detecção de fatores de virulência e tipagem do gene *spa*, do SCC*mec* e através das técnicas PFGE e MLST.

## 2 REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 Taxonomia

#### 2.1.1 Gênero *Staphylococcus* sp.

Bactérias do gênero *Staphylococcus*, pertencente à família Staphylococcaceae, são cocos Gram positivos arranjados principalmente de forma irregular, com aparência semelhante a “cachos de uva”. São ainda anaeróbios facultativos, imóveis, não esporulados, produtores da enzima catalase e resistentes à bacitracina (0,04 UI) (MARKEY et al., 2013).

O gênero *Staphylococcus* está presente na pele e microbiota nasal, causando infecções oportunistas em seres humanos e vários animais (SASAKI et al., 2010). Colonizam as mucosas, especialmente de mamíferos e aves, onde eventualmente podem ocasionar um processo infeccioso em decorrência de alterações teciduais do hospedeiro, como traumas (GRIFFETH et al., 2008). Infecções estafilocócicas estão entre as doenças oportunistas mais comuns, o que tem levado a práticas de controle desses patógenos, tanto em hospitais veterinários quanto em humanos (WEESE, 2012).

De acordo com o “List of Prokaryotic Names With Standing in Nomenclature” (2018), pertencem a esse gênero 52 espécies e 28 subespécies que habitam diferentes ambientes e espécies animais. O gênero é subdividido em dois grupos, com base na produção da enzima coagulase, cuja função é formar coágulos de fibrina no tecido do hospedeiro, dificultando seu reconhecimento e fagocitose por parte do sistema fagocitário mononuclear (SOARES, 2010).

De modo geral, sete espécies de estafilococos coagulase-positivos (ECP) têm sido identificadas: *Staphylococcus aureus*, *S. intermedius*, *S. delphini*, *S. pseudintermedius*, *S. schleiferi* subsp. *coagulans*, *S. hyicus* e *S. lutrae* (SASAKI et al., 2010; DEVRIESE et al., 2005; FRENEY et al., 1999), além da espécie coagulase-variável *S. agnetis* (TAPONEN et al., 2012). As espécies de estafilococos tendem a apresentar especificidade quanto ao hospedeiro. Por exemplo, as espécies predominantes em ruminantes, suínos, cães e pombos são *S. aureus*, *S. hyicus*, *S. pseudintermedius* e *S. intermedius*, respectivamente (SASAKI et al., 2007a; FITZGERALD; PENADÉS, 2008; SASAKI et al., 2010). Entretanto, é possível isolar a mesma espécie bacteriana de quadros clínicos em diferentes hospedeiros animais. Nesses casos, a bactéria pode apresentar variações decorrentes dessa adaptação (PANTOSTI, 2012; SPOOR et al., 2013).

O outro grupo de bactérias pertencentes a esse gênero compreende as muitas espécies de estafilococos coagulase-negativos (ECN), que podem ser divididas em dois grupos dependendo da sensibilidade à novobiocina. *Staphylococcus* sensíveis à novobiocina incluem *S. epidermidis*, *S. haemolyticus*, *S. hominis*, *S. lugdunensis* e os resistentes são as espécies *S. saprophyticus* e *S. xylosus* (HEILMANN; PETERS, 2000; VON EIFF et al., 2005; LONGAUEROVA, 2006;). Durante muito tempo, as espécies de ECP eram implicadas como patogênicas, enquanto as espécies de ECN eram consideradas saprófitas e raramente patogênicas. Nos últimos anos, entretanto, a importância das espécies de ECN implicadas em infecções animais, como por exemplo, na mastite bovina, tem aumentado, pois compõem a microbiota natural da pele e mucosa desses animais, ordenhadores, além de estarem presentes no ambiente no qual o animal está inserido (SOARES et al., 2008).

#### 2.1.2 *Staphylococcus pseudintermedius*

*Staphylococcus pseudintermedius* foi primeiramente descrito como *S. intermedius* por Hajek (1976) a partir de amostras de cães, pombos, martas e cavalos. Durante décadas, *S.*

*intermedius* foi considerada a principal espécie de *Staphylococcus* associada a infecções de pele e tecidos moles em cães até que Devriese e colaboradores (2005) demonstraram que *S. intermedius* é, na verdade, um grupo heterogêneo de bactérias. Esse estudo descreveu a nova espécie *S. pseudintermedius*, que até então era classificada com *S. intermedius*, através da hibridização de DNA e sequenciamento do gene 16S rRNA.

Essa descoberta fomentou estudos subsequentes que avaliaram a diversidade fenotípica e genotípica observada em isolados de *S. intermedius* e levaram a criação do Grupo *S. intermedius* (SIG), o qual é constituído de três espécies estreitamente relacionadas: *S. intermedius*, *S. pseudintermedius* e *S. delphini* (SASAKI et al., 2007b; BANNOEHR et al., 2007). A partir dessas pesquisas, *S. pseudintermedius* foi reconhecido como a causa comum de infecções cutâneas em cães e foi proposto que todos os isolados caninos sejam denominados como *S. pseudintermedius*, a menos que métodos de tipagem genotípica revelem o contrário (DEVRIESE et al., 2009).

Devriese e colaboradores (2005) também avaliaram as características de crescimento e bioquímicas de *S. pseudintermedius*, que formam colônias não pigmentadas em ágar Sangue de Carneiro e são cercadas por uma zona de dupla hemólise. Dentre outras características, são catalase positivos, coagulase positivos, fator “clumping” negativo, fortes produtores de DNase e sensíveis à novobiocina. São ainda positivos nos testes de produção de acetoina (prova de Voges-Prokauer), b-glicosidase, arginina, urease, redução de nitrato e ONPG (b-galactosidase). Produzem ácidos a partir de glicerol (fraca e tardiamente), ribose, galactose, D-glicose, D-fructose, D-mannose, manitol (fraca e tardiamente), N-acetilglicosamina, maltose, lactose, sacarose, trealose e D-turanose (fraca e tardiamente). O conteúdo G+C do seu DNA é 38 mol%.

## 2.2 Identificação de *Staphylococcus pseudintermedius*

Historicamente, membros do gênero *Staphylococcus* eram classificados e diferenciados com base na variedade de suas características fenotípicas, como morfologia de colônias e reações bioquímicas que realizam (CAPURRO, 2009). *Staphylococcus pseudintermedius* apresenta colônias de tamanho médio, não pigmentadas e geralmente cercadas por dupla hemólise em ágar Sangue de Carneiro: incompleta (beta-hemólise) e completa (alfa-hemólise) (BANNOEHR; GUARDABASSI, 2012). No entanto, a heterogeneidade do Grupo SIG e a dificuldade de diferenciação fenotípica entre as espécies representam um desafio ao diagnóstico veterinário (SASAKI et al., 2010).

Diversos métodos de identificação de *Staphylococcus* spp. estão disponíveis atualmente. Sistemas automatizados e “kits” comerciais encontram-se no mercado e são utilizados por inúmeros laboratórios. Todavia, a interpretação dos resultados pode ser subjetiva, levando a erros, além de possuírem baixa acurácia devido ao limitado número de testes bioquímicos que possuem, reduzindo assim a quantidade de espécies detectáveis (ZADOKS; WATTS, 2009). Como consequência, *S. pseudintermedius* pode ser erroneamente identificado como ECN, uma vez que esses sistemas são frequentemente padronizados para a diferenciação rápida entre *S. aureus* e ECNs desse patógeno em amostras clínicas humanas (BANNOEHR; GUARDABASSI, 2012).

Diferentes provas bioquímicas podem ser realizadas para a diferenciação das espécies de *Staphylococcus*, como por exemplo: prova da coagulase, produção de acetoina, beta-galactosidase, suscetibilidade à polimixina B (300 UI) e à novobiocina (5 µg), fermentação de manitol e fermentação de maltose (MARKEY et al., 2013). No entanto, a ausência de marcadores bioquímicos únicos (SASAKI et al., 2010) dificulta a diferenciação fenotípica entre os membros do grupo SIG (DEVRIESE et al., 2009). A ausência de sistemas de identificação comerciais apropriados para patógenos de importância veterinária leva ao diagnóstico epidemiológico de *S.*

*pseudintermedius*, uma vez que as outras espécies do grupo SIG não costumam causar infecções em cães (BANNOEHR; GUARDABASSI, 2012).

A taxonomia do gênero *Staphylococcus* foi melhor esclarecida nos últimos anos, graças ao emprego de técnicas moleculares que permitiram relacionar ou comparar resultados de testes fenotípicos e genotípicos (LANGE et al, 2011). A descrição de *S. pseudintermedius*, sua consequente reclassificação (DEVRIESE et al., 2005) e o reconhecimento da importância de *S. schleiferi* sub. *coagulans* como causador de infecções em cães (FRANK et al., 2003; MAY et al., 2005) quebraram importantes paradigmas na microbiologia veterinária.

Tendo em vista a dificuldade de discriminação pela identificação bioquímica, novas tecnologias têm sido desenvolvidas para superar essas limitações e assim possibilitar uma melhor diferenciação das espécies. Dentre esses métodos, a análise comparativa das sequências de determinados genes conservados tem sido empregada com a finalidade taxonômica e filogenética, como por exemplo, o sequenciamento do gene que codifica o RNA ribossomal 16S, que é altamente conservado entre as espécies (LANGE et al, 2011). As sequências obtidas são comparadas às depositadas em bancos de dados internacionais, como o National Center for Biotechnology Information (NCBI), permitindo a inferência da espécie. Porém, técnicas como essa são relativamente onerosas e consomem bastante tempo (SALGADO, 2013). Desse modo, reações em cadeia da polimerase (PCR) da região intergênica 16-23S e iniciadores espécie-específicos surgem como alternativas mais acessíveis (JOUSSON et al., 2007), porém ainda muito pouco utilizadas por laboratórios brasileiros de diagnóstico microbiológico veterinário. Diversos genes para identificação bacteriana estão disponíveis na literatura, dentre eles os genes *hsp60*, *tuf*, *femA*, *orfX*, *Sa442*, *rpoB*, *sodA*, *dnaJ* e *nuc* (VOYTENKO et al., 2006; SHAH et al., 2007; GHEBREMEDHIN et al., 2008; AL-TALIB et al., 2009; REISCHL et al., 2009; BODE et al., 2012;), além dos genes como *nuc*, 23S rDNA e *coa*, de *S. aureus*, que podem ser usados para identificação da espécie (HOOKEY et al, 1998; STRAUB et al., 1999; CIFTCI et al, 2009).

Atentos à necessidade de padronização para a identificação genotípica das diferentes espécies de ECP de importância veterinária, Sasaki e colaboradores (2010) desenvolveram uma PCR multiplex (M-PCR) baseada na amplificação dos genes *nuc*, codificador de uma termonuclease. Esse método mostrou-se sensível (99,8%) e específico (100%), podendo ser utilizado para a identificação de *S. pseudintermedius* e diferenciação das demais espécies do grupo SIG.

Outro método utilizado para diferenciação de *S. pseudintermedius* das demais espécies de ECP é a técnica de PCR associada ao polimorfismo dos tamanhos de fragmentos de restrição (RFLP-PCR), que tem sido padronizada para os mais diversos genes nos últimos anos e possui alguns alvos moleculares, como por exemplo, o gene *pta* (BANNOEHR et al., 2009), *kat* (BLAIOTTA et al, 2010) e o gene *groEL* (BARROS et al., 2007).

Atualmente, outra técnica vem sendo introduzida em laboratórios de diagnóstico humano e animal, devido ao seu custo-benefício e abordagem rápida e precisa (BANNOEHR; GUARDABASSI, 2012). A espectrometria de massa MALDI-TOF MS, ou Espectrometria de Massa por Tempo de Voo de Ionização/Desorção por Laser Assistida por Matriz, vem ganhando cada vez mais destaque pelo uso na identificação de diferentes microrganismos ao nível de espécie. Vantagens como quantidade mínima de amostra necessária para identificação, baixo custo de execução, níveis insignificantes de resíduos químicos e biológicos gerados e tempo extraordinariamente curto para obtenção de resultados (CHERKAOUI et al., 2010; ALATOOM et al., 2011; CARBONNELLE et al., 2011), atraem bastante atenção para essa ferramenta. Os resultados produzidos são de elevada acurácia em relação à identificação de espécies dentro dos diversos gêneros bacterianos (PIGNONE et al., 2006; FRIEDRICHS et al., 2007; BARBUDDHE

et al., 2008; ILINA et al., 2009; NAGY et al., 2009), possibilitando assim, uma identificação bacteriana mais precisa, mesmo em culturas mistas (BIZZINI; GREUB, 2010). Os espectros, que são gerados após o processamento pelo equipamento e análise pelo programa, são então comparados aos de cepas de referência de seu banco de dados, permitindo a identificação do microrganismo. É importante ressaltar que essa identificação depende da padronização e atualização regular do banco de dados (GUARDABASSI et al., 2017), especialmente para discriminação dos membros do grupo SIG (DECRISTOPHORIS et al., 2011; MURUGAIYAN et al., 2014).

Apesar do baixo custo de execução, a principal desvantagem dessa tecnologia ainda é o elevado custo do equipamento e sua implementação, que a torna praticamente inviável para pequenos e médios laboratórios de diagnóstico veterinário (GUARDABASSI et al., 2017), especialmente no Brasil.

### 2.3 Patogenicidade e potencial zoonótico

*Staphylococcus pseudintermedius* é comensal da pele e mucosas de cães saudáveis, incluindo folículos pilosos, sacos conjuntivais, narinas, cavidade bucal e região perianal (VAN DUIJKEREN et al., 2011; BANNOEHR; GUARDABASSI, 2012). Como os demais membros do gênero, é um patógeno oportunista, capaz de causar doença quando há um desequilíbrio na resistência natural do hospedeiro ou quando a barreira da pele é alterada (BANNOEHR; GUARDABASSI, 2012). Dermatite atópica, procedimentos médicos ou cirúrgicos e doenças imunossupressoras são exemplos de fatores predisponentes à infecção (BANNOEHR; GUARDABASSI, 2012). Fazakerley e colaboradores (2009, 2010) demonstraram que os percentuais de colonização são maiores em cães com dermatite atópica quando comparado com indivíduos saudáveis, principalmente em sítios como ouvidos e sacos conjuntivais, como demonstrado por Furiani e colaboradores (2011). Quanto à colonização por MRSP, os principais fatores de riscos associados são a hospitalização prévia do animal e a terapia antimicrobiana nos últimos seis meses (NIENHOFF et al., 2011a)

Esse patógeno é o mais frequentemente isolado de amostras clínicas caninas e é primariamente associado a infecções de pele (piodermite, infecções teciduais e abscessos) e ouvidos (otite externa), mas também pode causar infecção em outros tecidos e cavidades, podendo ser transmitido na comunidade ou em ambiente hospitalar (COX et al., 1984; MORRIS et al., 2006; WEESE; VAN DUIJKEREN, 2010; BANNOEHR; GUARDABASSI, 2012). Além de ser a principal causa de piodermite canina, *S. pseudintermedius* também é frequentemente isolado de amostras de infecções do trato urinário e pode ser um fator de complicação na pododermatite plasmocítica linfocítica responsiva a imunomoduladores (BANNOEHR; GUARDABASSI, 2012).

Embora os cães sejam os hospedeiros naturais, esse ECP pode colonizar e infectar outras espécies animais, principalmente gatos e também humanos (VAN HOOVELS et al., 2006; KADLEC et al., 2010). *Staphylococcus pseudintermedius* e *S. aureus* são as espécies de ECP que compõem a microbiota comensal da pele em gatos, mas não há consenso na literatura veterinária sobre qual dessas é dominante e fatores geográficos devem ser considerados (ABRAHAM et al., 2007). Nesses animais, *S. pseudintermedius* pode causar infecções teciduais, rinite, nefrite, pneumonia, infecções de trato urinário e septicemia (WETTSTEIN et al., 2008; KADLEC et al., 2010; POMBA et al., 2010). Dentre as infecções teciduais, é ocasionalmente isolado a partir de piodermite felina (LOEFFLER et al., 2007), lesões dérmicas inflamatórias como placa eosinofílica, úlceras, granulomas, dermatite miliar, alopecia auto infligida (psicogênica), pruridos não lesionais e otite inflamatória (ABRAHAM et al., 2007). Apesar de serem menos colonizados e infectados

por *S. pseudintermedius* (COUTO et al., 2011; NIENHOFF et al., 2011b), gatos apresentam risco significativo de desenvolverem infecções por MRSP de origem hospitalar ou clínica (NIENHOFF et al., 2011b; LEHNER et al., 2014). No entanto, infecções por *S. pseudintermedius* em felinos parecem ser menos frequentes que as causadas por *S. haemolyticus*, *S. felis* e *S. simulans* (BANNOEHR; GUARDABASSI, 2012).

Desde o primeiro relato de infecção humana por *S. pseudintermedius* (VAN HOOVELS et al., 2006), infecções têm sido ocasionalmente relatadas e muitas vezes estão diretamente relacionados ao contato próximo com um cão (BANNOEHR; GUARDABASSI, 2012). Estudos demonstram que tutores de cães portadores de infecções causadas por *S. pseudintermedius* e veterinários são mais propensos a serem nasalmente colonizados por esse agente do que outros indivíduos (FRANK et al., 2009; ISHIHARA et al., 2010; WALTHER et al., 2012).

Infecções por *S. pseudintermedius* associadas a feridas decorrentes de mordidas de cães e procedimentos pós-mastoidectomia, onicólise, otite externa, sinusite, bacteremia, pneumonia adquirida em hospital e abscesso cerebral já foram descritas em humanos (BARNHAM & HOLMES, 1992; LEE, 1994; VANDENESCH et al., 1995; GERSTADT et al., 1999; TANNER et al., 2000; KIKUCHI et al., 2004; POTTUMARTHY et al., 2004; ATALAY et al., 2005; KEMPKER et al., 2009). Também já foram relatadas associadas a dispositivos cardíacos em pacientes idosos e a cateter em uma criança com hemofilia (VAN HOOVELS et al., 2006; CHUANG et al., 2010; RIEGEL et al., 2011). Dois casos de infecção por MRSP foram descritos em pacientes com sinusite e, em um deles, num primeiro momento, *S. pseudintermedius* foi erroneamente identificado como MRSA (KEMPKER et al., 2009; STEGMANN et al., 2010), sugerindo que pode haver uma subnotificação de casos devido identificação errônea do agente.

Recentemente, Somayaji e colaboradores (2016) relataram 24 casos de infecções humanas provocadas por *S. pseudintermedius* no Canadá, a maioria associada a infecções de pele e tecidos moles, sendo que em três deles a cepa envolvida era multirresistente. Infecções humanas causadas por MRSP em pacientes sem nenhum contato com cães sugerem que seres humanos podem, eventualmente, ser colonizados por MRSP (KELESIDIS & TSIODRAS, 2010; SOMAYAJI et al., 2016) e que a transmissão homem a homem pode ocorrer (BANNOEHR; GUARDABASSI, 2012), apesar da sua importância como patógeno zoonótico ser menor que a de MRSA (WEESE; VAN DUJKEREN, 2010).

## 2.4 Fatores de virulência

Microrganismos patogênicos desenvolvem uma série de estratégias de sobrevivência para colonizar determinados sítios do hospedeiro mediante a aquisição de uma variedade de fatores de virulência, que facilitam sua aderência às células epiteliais, permitem a invasão das defesas fagocíticas, a colonização dos tecidos e favorecem sua persistência extracelular (MARQUES et al., 2013). A adesão do microrganismo às células epiteliais do hospedeiro é uma etapa necessária à colonização e ao estabelecimento da infecção, sendo mediada por proteínas, como as de ligação do fibrinogênio, da fibronectina e do colágeno, presentes na superfície bacteriana e que reconhecem moléculas da célula hospedeira promovendo a colonização (FOSTER, 2009; DUBIN et al., 2013).

Além das proteínas, um mucopolissacarídeo extracelular denominado “slime” relacionado à produção do biofilme também pode ser produzido durante as etapas iniciais da infecção. (ARCIOLA et al., 2015). Sua produção é considerada um importante fator de virulência em estafilococos, especialmente *S. aureus* e *S. epidermidis*, pois possibilita a adesão a superfícies, como a de dispositivos médicos (por exemplo, cateteres e implantes), favorecendo a persistência desses agentes e a ocorrência de infecções nosocomiais (OTTO, 2013). Além disso, biofilmes

bacterianos também são formados em superfícies de mucosas e tecidos, como pele, ouvidos, tratos urinário e respiratório, entre outros, resultando em infecções crônicas, recorrentes e difíceis de tratar, uma vez que a ação de antimicrobianos sobre biofilmes é bastante limitada. Esse complexo sistema, além de constituir uma barreira física, parece regular, através de múltiplos mecanismos, os alvos antimicrobianos celulares e a expressão de genes de resistência, como a do gene *mecA* (AN; FRIEDMAN, 1998; MCCARTHY et al., 2015). Recentemente, Pompilio e colaboradores (2015) demonstram a habilidade de uma cepa de *S. pseudintermedius* oriunda de infecção tecidual humana em formar biofilme maduro *in vitro* e resistente a antibióticos em concentrações acima daquelas observadas no soro, incluindo linezolida, tigeciclina e vancomicina, que são considerados antibióticos de “último recurso” para a medicina contra estafilococos resistentes à meticilina.

Uma vez estabelecidos no tecido, estafilococos são capazes de secretar diversos outros fatores para obter nutrientes, invadir, sobreviver e disseminar. Esses fatores incluem enzimas e exotoxinas, tais como: hemolisinas, leucocidinas e DNases (MARQUES, 2016). A principal função dessas proteínas é converter os tecidos locais do hospedeiro em nutrientes necessários à sua multiplicação e por isso, são responsáveis pelos efeitos patológicos observados durante o desenvolvimento da infecção (HAVERI et al., 2008; EL-SAYED et al., 2006). A maioria desses fatores de virulência extracelulares são codificados por elementos genéticos móveis, tais como: plasmídeos, transposons e integrons, que facilitam a disseminação horizontal de populações de estafilococos (MARQUES, 2016).

Muitos dos fatores de virulência de *S. aureus* tem sido descritos em *S. pseudintermedius* (FOSTER, 2009), incluindo enzimas como coagulase, termonuclease e proteases, proteínas de superfície similares ao fator “clumping” (proteínas de superfície de *S. pseudintermedius* – Sps) e à proteína A, além de toxinas como as citotoxinas, toxinas esfoliativas e enterotoxinas (HAJEK et al., 1976; RAUS et al., 1983; EDWARDS et al., 1997; TERAUCHI et al., 2003a; TERAUCHI et al., 2003b; FUTAGAWA-SAITO et al., 2004; FUTAGAWA-SAITO et al., 2006; LAUTZ et al., 2006; WLADYKA et al., 2008; FUTAGAWA-SAITO et al., 2009; GEOGHEGAN et al., 2009; BANNOEHR et al., 2011a; BANNOEHR et al., 2011b; PIETROCOLA et al., 2015). No entanto, a maior parte dos fatores de virulência de *S. pseudintermedius* ainda não foi caracterizada em detalhes (MELTER et al., 2017).

Dentre os fatores encontrados especificamente em *S. pseudintermedius* está a variante da enterotoxina estafilocócica do tipo C (SEC<sub>canine</sub>) identificada em isolados de piodermite canina (EDWARDS et al., 1997) e que compartilha a capacidade de induzir vômitos e proliferação de linfócitos T com as demais enterotoxinas estafilocócicas (BANNOEHR et al., 2012). No entanto, sua prevalência na população de *S. pseudintermedius* é variável (FUTAGAWA-SAITO et al., 2004; YOON et al., 2010; BANNOEHR et al., 2012). Outra enterotoxina de *S. pseudintermedius*, SE-int, e gene seu relacionado, *se-int*, foram identificados, com significativa homologia entre SE-int e as enterotoxinas estafilocócicas SEC (59– 61% de identidade) e SEB (56,6% de identidade). (FUTAGAWA-SAITO et al., 2004).

Quanto às toxinas esfoliativas, SIET (toxina esfoliativa de *S. pseudintermedius*) foi caracterizada (LAUTZ et al., 2006) associada à eritema, esfoliação e formação crostas, sintomas semelhantes aos observados na piodermite canina, na síndrome da pele escaldada em humanos e na epiderme exsudativa porcina (TERAUCHI et al., 2003). No entanto, em estudo subsequente, a aplicação intradérmica da toxina recombinante em cães saudáveis não foi capaz de produzir os sintomas clínicos ou as lesões histopatológicas (IYORI et al., 2011), de modo que o papel biológico de SIET permanece não totalmente elucidado (BANNOEHR et al., 2012). Outras duas toxinas esfoliativas de *S. pseudintermedius* foram indetificadas em isolados de piodermite canina: EXI (FUTAGAWA-SAITO et al., 2009) ou ExpA (IYORI et al., 2011) e ExpB (IYORI et al., 2011).

Quando aplicada em cães saudáveis, a forma recombinante de EXI produziu lesões erosivas e alterações histopatológicas, além de possuir efeito sobre um tipo de desmogleína tecidual (Dsg-1), o que não foi observado quando SIET recombinante foi aplicada (IYORI et al., 2011).

## 2.5 *Staphylococcus pseudintermedius* meticilina-resistentes (MRSP) e multirresistência

A relevância de *S. pseudintermedius* sp. como patógeno em diversos quadros infecciosos em animais de companhia também está relacionada ao seu potencial de resistência aos antimicrobianos (WEESE; VAN DUIJKEREN, 2010). Essa resistência tem sido desenvolvida em diferentes patógenos bacterianos devido, principalmente, ao uso inadequado desses fármacos em humanos e animais, propiciando seleção de isolados multirresistentes e o consequente comprometimento da eficácia do tratamento (VENTOLA, 2015).

Os beta-lactâmicos, por sua grande variedade, representam a maior e mais amplamente utilizada classe de antimicrobianos. Pertencem a esse grupo os antibióticos que apresentam o anel beta-lactâmico em sua estrutura, sendo a penicilina a principal família. Essa se divide em três grupos: penicilinas naturais (ex. penicilinas G e V), aminopenicilinas (ex. ampicilina e amoxicilina) e penicilinas anti-estafilocócicas, como a oxacilina e a meticilina, sendo esta última não utilizada no Brasil (BLACK, 2002; LOWY, 2003). Além das penicilinas, também pertencem a esse grupo as cefalosporinas, monobactâmicos e carbapenêmicos.

Resistência à oxacilina, que representa um marcador para avaliação da resistência cruzada com os demais antimicrobianos dessa classe, foi primeiramente descrita em 1961, entre isolados de *S. aureus* de infecções nosocomiais (JEVONS et al., 1961). O primeiro *S. aureus* meticilina (ou oxacilina) resistente (MRSA/ORSA) isolado de animais surgiu em 1972, detectado em leite de vacas com mastite (DEVRIESE et al., 1972). Desde então, diferentes espécies de animais domésticos têm sido implicadas como potenciais reservatórios de bactérias resistentes pertencentes a esse gênero (BAPTISTE et al., 2005; VENGUST et al., 2006; LEONARD; MARKEY 2008; WEESE; VAN DUIJKEREN, 2010).

A emergência mundial de MRSP tornou-se um dos principais problemas para a Medicina Veterinária de pequenos animais (POMBA et al., 2017) e as infecções causadas por esse agente, um desafio à parte. Essa resistência deve-se principalmente a dois mecanismos distintos: a produção da enzima beta-lactamase, codificada pelo gene *blaZ*, e a produção da proteína ligante de penicilina adicional de baixa afinidade (PBP2a), a qual é codificada pelo gene *mecA* e regulada pelos genes *mecI* e *mecRI*. A PBP2a determina resistência à oxacilina devido sua afinidade reduzida aos beta-lactâmicos, podendo realizar as reações de transpeptidação quando as PBPs normais estão bloqueadas pela droga, permitindo a síntese do peptidoglicano no processo de formação da parede celular bacteriana e conferindo resistência a todos os antimicrobianos da classe dos beta-lactâmicos (PEHLIVANOGLU; YARDIMCI, 2012).

O gene *mecA* está localizado em um elemento genético móvel, denominado cassete cromossômico estafilocócico *mec* (“staphylococcal cassette chromosome” – SCC*mec*), de diferentes tipos, que pode ser transferido via plasmídeo, transposons ou elementos genéticos móveis, e se integrar ao genoma bacteriano (KATAYAMA et al., 2001; TURLEJ et al., 2011). O cassete *mec* é formado por dois componentes principais: o complexo *mec*, composto pela ilha de patogenicidade *IS43*, pelo gene *mecA* e seus reguladores *mecI* e *mecRI*; e pelo complexo *ccr* que codifica as recombinases do cassete cromossômico, as quais são responsáveis pela correta excisão e consequentemente integração desse elemento no cromossoma estafilocócico (HIRAMATSU et al. 2014).



O cassete *mec* pode carrear ainda outros elementos genéticos como Tn554, pUB110 e pT181, que codificam resistência às outras classes de antimicrobianos. Por exemplo, os genes *erm*, que são os responsáveis pela resistência cruzada, expressa de maneira constitutiva ou induzida, a macrolídeos, lincosamidas e estreptogramina B (MLSB), estão localizados no Tn554, presente no SCC*mec* tipos II e III (ITO et al., 2001; ROBERTS, 2008). A transferência horizontal do gene *mecA* em estafilococos, e dos elementos genéticos inseridos no SCC*mec*, resultou então na disseminação mundial de clones oxacilina e multirresistentes, tornando-se uma dificuldade adicional para o controle de infecções causadas por esse agente (ITO et al., 2001). Essa multirresistência é frequentemente observada em cepas MRSP (PERRETEN et al., 2010; RUSCHER et al., 2010; MOODLEY et al., 2013), que também constituem um reservatório de genes de resistência para outros estafilococos (POMBA et al., 2017).

Atualmente, existem 11 tipos de elementos SCC*mec* em MRSA, originados da recombinação de oito diferentes complexos de genes *ccr* e seis diferentes genes do complexo *mec* (International Working Group on the *Staphylococcal Cassette Chromosome* Elements – IWG-SCC, 2018). Em MRSP são descritos diferentes tipos de elementos SCC*mec* (II–III, III, IV, V, VII), assim como elementos não tipáveis (NT) (DESCLOUX et al., 2008; BLACK et al., 2009; PERRETEN et al., 2010, 2013), com significativa variabilidade na sua distribuição dentre os clones de MRSP mundialmente reportados (DOS SANTOS et al., 2016). No entanto, dados de frequência e distribuição desses elementos em cepas brasileiras permanecem pouco conhecidos.

## 2.6 Tipagem molecular de cepas MRSP

A tipagem molecular de microrganismos tem o papel principal de avaliar as relações genéticas entre os isolados e possibilitar a compreensão do parentesco clonal entre as cepas, o que é essencial para determinar a fonte e as rotas de infecção, identificar um surto, traçar rotas de transmissão, reconhecer cepas particularmente virulentas e avaliar a eficácia das medidas de controle (PÉREZ-LOSADA et al., 2013).

Diferentes métodos têm sido utilizados para caracterizar e determinar a diversidade genética de cepas bacterianas. Cada método tem suas vantagens e limitações, e nenhum utilizado de forma isolada combina elevado poder discriminatório, completa portabilidade interlaboratorial, fácil execução e baixo custo (SOARES, 2017). Desse modo, devido à especificidade variável e diferentes estruturas alvo, a escolha dos métodos de tipagem deve obedecer ao objetivo do estudo (FESSLER et al., 2011).

Além dos conhecidos desafios na identificação de *S. pseudintermedius*, existe a necessidade de padronização de métodos de tipagem que possibilitem a investigação epidemiológica e o monitoramento de MRSP (BANNOEHR; GUARDABASSI, 2012). Dentre os métodos comumente utilizados para a caracterização de *S. pseudintermedius* estão o PFGE (Eletroforese em Gel de Campo Pulsado – “Pulsed Field Gel Electrophoresis”), a tipagem do gene *spa*, o MLST (Tipagem da Sequência Multilocus – “Multilocus Sequence Typing”) e a tipagem do cassete SCC*mec* (BANNOEHR; GUARDABASSI, 2012).

### 2.6.1 Eletroforese em Gel de Campo Pulsado (“Pulsed Field Gel Electrophoresis” – PFGE)

O PFGE é reconhecidamente um dos métodos mais discriminatórios para tipagem bacteriana e particularmente indicado para monitoramento e investigações de surtos (BANNOEHR; GUARDABASSI, 2012). A técnica foi desenvolvida por Schwartz e Cantor (1984) e é baseada na análise dos perfis gerados pela atuação da enzima de restrição no DNA bacteriano.

O organismo é incorporado em agarose, seguindo-se as etapas de lise e digestão do DNA cromossomal com enzimas de restrição. A principal enzima de restrição utilizada para *Staphylococcus* spp. é a *SmaI*, que reconhece e cliva sequências CCC-GGG do DNA. Peças dessa agarose contendo fragmentos do DNA cromossomal são inseridos nos poços de um gel de agarose, onde os fragmentos são revelados em padrões de bandas, através de um aparelho que regula a direção da corrente de acordo com um padrão pré-determinado. Um dos modelos mais comumente utilizados no PFGE é sistema de campo elétrico homogêneo (CHEF), no qual o DNA, que apresenta carga negativa, é direcionado através de um plano de uma matriz de gel de agarose ao polo positivo. Em contraste a eletroforese convencional, no qual a corrente elétrica é aplicada no gel em uma única direção, a corrente no PFGE é fornecida em pulsos que se alternam entre três conjuntos de eletrodos, resultando em um alto nível de resolução dos fragmentos (ANDREI et al., 2006; TENOVER et al., 1997).

De acordo com Tenover e colaboradores (1995), os padrões de bandas de um isolado são então comparados com os de outro para determinar se há relação entre eles, sendo considerados “clones” no PFGE as cepas que apresentem o mesmo padrão de fragmentação com a devida correspondência de tamanho entre as bandas. Mutações pontuais, deleções, inserções e perda ou aquisição de plasmídeos poderiam acarretar menores diferenças nos perfis sem produzir novos subtipos. Isolados que diferem em duas ou três bandas (consistente em um evento genético) são considerados intimamente relacionados, enquanto a diferença de quatro a seis bandas (dois eventos genéticos) resulta num possível parentesco. Os isolados são considerados sem parentesco caso o padrão no PFGE difere de sete ou mais bandas (três ou mais eventos genéticos).

A técnica tem sido utilizada com sucesso em investigações epidemiológicas de curto prazo, provando ser um método bastante preciso e reprodutível (RANJBAR et al., 2014). No entanto, demanda um intensivo trabalho laboratorial, múltiplos dias para realização do procedimento, pessoal qualificado para interpretar os resultados e auxílio de um “software” para análise do padrão de bandas (GOERING, 2010). Além disso, possui baixa portabilidade interlaboratorial (RANJBAR et al., 2014). Até o momento, não existe um protocolo de PFGE padronizado para *S. pseudintermedius* e maioria dos protocolos utilizados foi desenvolvida para estudos em *S. aureus*, o que dificulta a comparação de resultados entre os estudos e a divulgação dos mesmos (BANNOEHR; GUARDABASSI, 2012; ABOU-ELNAGA, 2017).

## 2.6.2 Tipagem do gene *spa*

Diferentemente da técnica de PFGE, um protocolo específico de tipagem através do gene *spa* foi desenvolvido (MOODLEY et al, 2009) e pode ser facilmente empregada para a tipificação de cepas de MRSP (BANNOEHR; GUARDABASSI, 2012). Essa abordagem baseada em sequência de um único *locus* utiliza os mesmos princípios da tipificação do gene *spa* de *S. aureus* e foi desenvolvida a partir da descoberta de um homólogo da proteína A estafilocócica no genoma de *S. pseudintermedius* (MOODLEY et al, 2009). A proteína A estafilocócica é uma proteína estável da parede celular e é composta de três regiões: (i) sequência C terminal; (ii) região X; e (iii) sequência N-terminal. A região X é a única região polimórfica e sua função não é conhecida.

Através da amplificação, sequenciamento e análise dessa região polimórfica X, sequências de repetição em tandem são visualmente identificadas, recebem um código e o tipo de *spa* é determinado numericamente dependendo da composição e da ordem dessas repetições (MOODLEY et al, 2009). A principal vantagem da tipagem do gene *spa* sobre o PFGE é a possibilidade de coletar e armazenar essas informações sobre repetições e códigos em um banco de dados “online”, acessível a qualquer um que disponha de acesso a internet (<http://www.pse->

[spa.org](http://spa.org)) (MOODLEY et al, 2009). Mas, apesar do seu poder discriminatório ser comparável ao PFGE, não é efetivo para a tipagem de isolados sensíveis à meticilina (MOODLEY et al, 2009).

### 2.6.3. Tipagem da Sequência Multilocus (“Multilocus Sequence Typing” – MLST)

A fim de superar a insuficiência na portabilidade das abordagens tradicionais, o método MLST foi desenvolvido (MAIDEN et al., 1998), sendo amplamente utilizado em estudos epidemiológicos, de evolução e genética populacional. Essa técnica analisa a variação de sequência em genes que evoluem lentamente, com acurácia, elevado poder discriminatório e portabilidade das sequências de DNA (SOLYMAN et al., 2013). Baseia-se na comparação de sequências de DNA de cerca de 500 pb de, no mínimo, sete genes altamente conservados (“housekeeping genes”), que são amplificados por PCR e em seguida sequenciados. Os genes de manutenção são frequentemente selecionados pois são mais conservados e estão presentes em todos os isolados da mesma espécie. A relação genética entre as cepas é determinada pela análise das sequências dos múltiplos genes, os quais são comparados pela substituição de nucleotídeo na sequência, resultando em um perfil alélico ou sequência tipo (“sequence type” – ST) da bactéria analisada. As cepas são agrupadas no mesmo complexo clonal (CC) caso possuam de cinco a sete genes de manutenção com sequências idênticas (DEURENBERG et al., 2008). Parentesco entre STs pode ser revelado usando o método de agrupamento com base em tipos relacionados ao algoritmo de sequência, (eBURST ou a mais recente versão otimizada global, goeBURST) inferindo padrões de descendência evolutiva entre isolados por um modelo de expansão clonal e diversificação e atribuindo aos complexos clonais (FRANCISCO et al., 2012).

O primeiro protocolo de MLST desenvolvido para estudos populacionais de membros do grupo SIG era baseado em quatro *loci* e forneceu informações valiosas sobre a estrutura genética dessas espécies (BANNOEHR et al., 2007). Esse esquema possibilitou a detecção de dois importantes clones epidêmicos de MRSP: ST68, na América do Norte e ST71, na Europa (PERRETEN et al., 2010). No entanto, o método posteriormente desenvolvido para *S. pseudintermedius* e baseado em sete *loci* (SOLYMAN et al., 2013) aumentou o poder discriminatório e ampliou o conhecimento sobre a dinâmica populacional, mostrando que *S. pseudintermedius* possui grande diversidade genética.

Em recente uma revisão sistemática, dos Santos e colaboradores (2016) forneceram evidências, através da análise de 503 STs depositados na base de dados do MLST, de que *S. pseudintermedius* possui estrutura populacional epidêmica, a qual linhagens de MRSP bem-sucedidas com características específicas quanto à resistência antimicrobiana, diversidade genética e distribuição geográfica, emergiram e diversificaram-se rapidamente em uma população fracamente ou não clonal, através de múltiplas aquisições de *SCCmec* e outros elementos genéticos móveis. Isso contrasta com o que é observado em *S. aureus*, que exibe baixas taxas de recombinação (VOS; DIDELOT, 2009) e linhagens clonais discretas, que diversificam radialmente de ancestrais filogeneticamente bem suportados (FEIL et al., 2003; FEIL et al., 2004) e sugere a grande capacidade de transferência horizontal de genes em *S. pseudintermedius* (MCCARTHY ET AL., 2015; DOS SANTOS et al., 2016).

A principal vantagem do MLST é que o método é altamente reprodutível e os dados produzidos não são ambíguos, uma vez a nomenclatura é internacionalmente padronizada. Além disso, as sequências de alelos e perfis ST estão disponíveis em grandes bases de dados centrais (<http://pubmlst.org> e [www.mlst.net](http://www.mlst.net)) que podem ser facilmente consultadas. No entanto, o elevado custo apresenta-se como uma limitação, principalmente pelo sequenciamento de número

considerável de *loci* por isolado, custos esses que tendem a ser ainda mais elevados dependendo do país onde o estudo é conduzido.

#### 2.6.4 Tipagem do cassete cromossômico *mec* (SCC*mec*)

Cepas de *Staphylococcus* sp. também podem ser tipificadas através da detecção do cassete *mec* por PCR. Os elementos que compõem o SCC*mec* são altamente diversos quanto à organização estrutural e conteúdo genético, mas compartilham várias características, como: (i) carreamento do gene *mecA* em um complexo-*mec*, (ii) carreamento do (s) gene (s) *ccr* em um complexo-*ccr*, (ii) integração em um sítio específico no cromossomo estafilocócico, referido como sequência do sítio de integração para SCC, que serve como alvo para recombinação mediada por *ccr* e (iv) a presença de sequências de repetição direta de flanqueamento contendo a sequência do sítio de integração (IWG-SCC, 2009). Esses elementos são classificados em tipos que são definidos pela combinação de: (i) tipo do complexo-*ccr*, que é representado pelo alótipo do gene *ccr* e (ii) classe do complexo-*mec*, que são os elementos-chave responsáveis pela integração e excisão do SCC*mec* e do fenótipo de resistência a beta-lactâmicos, respectivamente (IWG-SCC, 2009).

Além dos complexos *ccr* e *mec*, SCC*mec* também possui três “regiões de junção”, conhecidas como “regiões J”: J1 (anteriormente L-C) situa-se entre a junção cromossômica direita e o complexo-*ccr*, J2 (C-M) está entre o complexo-*ccr* e o complexo-*mec* e J3 (I-R) entre o complexo-*mec* e a junção cromossômica esquerda (IWG-SCC, 2009). Essas regiões constituem componentes não essenciais do cassete, podem conter determinantes adicionais da resistência antimicrobiana e suas variações dentro do mesmo complexo *mec-ccr* são usadas para definir os subtipos de de cassete (IWG-SCC, 2009).

Diferentes protocolos de detecção desenvolvidos originalmente para tipificação do SCC*mec* em cepas de MRSA (OLIVEIRA et al., 2001; ZHANG et al., 2005; KONDO et al., 2007; MILHEIRIÇO et al., 2007) têm sido utilizados na caracterização de MRSP. Dez tipos de SCC*mec* (I–X) têm sido identificados com base no perfil alélico do gene da recombinase (*ccr*) e na classe do complex *mec*, além de subtipos dependendo das variações em três regiões de junção (J1-J3) (BANNOEHR; GUARDABASSI, 2012). Alguns tipos de SCC*mec* observados em MRSP correspondem a tipos previamente encontrados em MRSA (como o SCC*mec* V em ST68), enquanto outros são encontrados somente em cepas MRSP (como o SCC*mec* II-III em ST71), sendo esse elemento uma combinação do SCC*mec* II de *S. epidermidis* e III de *S. aureus*. (DESCLOUX et al., 2008; BANNOEHR; GUARDABASSI, 2012). Outros, no entanto, não são tipáveis quando os esquemas de tipagem desenvolvidos para essas espécies são utilizados (BLACK et al., 2009; PERRETEN et al., 2010; RUSCHER et al., 2010)

Em estudos prévios, o sequenciamento do genoma confirmou seis tipos em cepas MRSP: SCC*mec* tipo II-III e tipo VII (DESCLOUX et al., 2008); tipo V (BLACK et al., 2009);  $\psi$ SCC*mec*<sub>57395</sub> (PERRETEN et al., 2013); tipo IV (MCCARTHY et al., 2015); e tipo AI16-SCC*czr*AI16-CI (CHANCHAITHONG et al., 2016).

### 3 OBJETIVOS

### 3.1. Objetivo geral

Avaliar o perfil de virulência, resistência antimicrobiana e diversidade de cepas de *Staphylococcus pseudintermedius* (MRSP) associados a processos infecciosos em animais de companhia.

### 3.2. Objetivos específicos

- Avaliar, fenotipicamente, a formação de biofilme e detectar genes de virulência associados à produção de enterotoxinas estafilocócicas, leucodinas, hemolisinas e toxinas esfoliativas;
- Avaliar, fenotipicamente, a resistência à meticilina em isolados de *S. pseudintermedius* oriundos de processos infecciosos em animais de companhia;
- Detectar a presença do gene *mecA* e tipificar os elementos *SCCmec* em cepas MRSP;
- Determinar a ocorrência de multirresistência em cepas de MRSP;
- Formar perfis genéticos através da detecção de genes de virulência, tipagem do *SCCmec*, do *spa*, por PFGE e MLST;
- Determinar as linhagens circulantes de MRSP.

## 4 MATERIAIS E MÉTODOS

#### 4.1. Amostragem

Os isolados de *S. pseudintermedius* estudados foram obtidos a partir de 169 amostras clínicas. Dessas, 164 (164/169) eram oriundas de processos infecciosos em animais de companhia atendidos no Hospital Veterinário de Pequenos Animais (HVPA) da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (UFRRJ) nos anos de 2014 e 2015. Essas amostras foram enviadas ao Laboratório de Microbiologia do Programa de Residência em Microbiologia da UFRRJ para identificação do agente etiológico envolvido. Os 188 *Staphylococcus* spp. identificados das 164 amostras clínicas foram estocados a  $-20^{\circ}\text{C}$  em caldo Infuso de Cérebro e Coração (BHI – KASVI<sup>®</sup>) acrescido de glicerol 45%. Após identificação preliminar por espectrometria de massa MALDI-TOF, 87 isolados pertencentes ao grupo SIG foram selecionados para o presente estudo. Também foram estudados cinco *Staphylococcus* spp. oriundos de cinco amostras clínicas (5/169) de processos infecciosos em animais de companhia enviadas a um laboratório comercial na cidade do Rio de Janeiro no ano de 2017, totalizando 92 isolados investigados. A origem desses isolados, os sítios de infecção e tipos de amostra encontram-se detalhados no Anexo A. Com o objetivo de estabelecer um padrão de diferenciação, bem como avaliar uma possível similaridade entre isolados de origens diferentes, a cepa MRSP S231 (*mecA* positiva, SCC*mec* II-III e resistência a CLO, CIP, ERI, GEN, KAN, LIN, PEN, TET) oriundo de amostra de mastite bovina subclínica foi incluída para o estudo da diversidade. O presente estudo foi submetido ao Comitê de Ética da UFRRJ (número do protocolo: CEUA 1652171215).

Este estudo segue a nomenclatura utilizada por Tenover e colaboradores (1995), a qual o termo “isolado” refere-se à cultura pura de bactérias obtidas por subcultura de uma única colônia para o qual não há informações disponíveis além do gênero e espécie. Já termo “cepa” (ou “estirpe”) refere-se à um isolado ou grupo de isolados que podem ser distinguidos de outros do mesmo gênero e espécie por características fenotípicas e/ou genotípicas, sendo uma subdivisão descritiva de uma espécie.

##### 4.1.1 Isolamento e identificação presuntiva de *Staphylococcus* coagulase-positivos

As amostras clínicas foram submetidas à rotina de identificação que consistiu no isolamento primário em ágar Base para Sangue (KASVI)<sup>®</sup> acrescido de 5% de sangue de carneiro desfibrinado. As placas foram incubadas a  $35 \pm 2^{\circ}\text{C}$  por 24 horas. Após a identificação presuntiva das colônias, essas foram submetidas ao método de coloração de Gram para confirmação das suas características morfotintórias. Os cocos Gram-positivos foram então repicados em ágar seletivo Manitol Vermelho de Fenol (AMVF) (microMED, ISOFAR<sup>®</sup>) acrescido de 7,5% de NaCl e incubados  $35 \pm 2^{\circ}\text{C}$  por 24 horas para obtenção de culturas de *Staphylococcus* spp. Após incubação, foi realizada observação das características das colônias e fermentação, ou não, do manitol (KONEMAN et al., 2008).

##### 4.1.2 Prova do hidróxido de potássio (KOH) 3% e prova da catalase

A prova do hidróxido de potássio foi efetuada através da adição de um fragmento da colônia bacteriana a uma gota de KOH a 3% sobre uma lâmina. A não formação de um gel viscoso indicou um resultado negativo. No teste da catalase, um fragmento de colônia bacteriana foi adicionado a algumas gotas de peróxido de hidrogênio ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ). A formação de bolhas indicou teste positivo e presença da enzima catalase (KONEMAN et al., 2008). A cepa *Staphylococcus aureus* subsp. *aureus* ATCC<sup>®</sup> 25923<sup>TM</sup> foi utilizada como controle (KOH 3% negativo, catalase positiva).

### 4.1.3 Prova da coagulase

O teste para detecção da coagulase foi realizado utilizando o crescimento bacteriano obtido em 1 ml de caldo BHI BHI (HIMEDIA) incubado a  $35 \pm 2$  °C por 24 horas. Uma alíquota de 200 µl de cada amostra foi adicionada a 200 µl de plasma de coelho (Larboclin), seguida de incubação  $35 \pm 2$  °C por 6 horas, para visualização do coágulo (KONEMAN et al., 2008). A cepa *Staphylococcus aureus* subsp. *aureus* ATCC® 25923™ foi utilizada como controle (coagulase positiva).

### 4.1.4 Prova de suscetibilidade à bacitracina e à polimixina

Uma suspensão direta da colônia equivalente à escala 0,5 de McFarland foi distribuída por toda a superfície de uma placa de Petri contendo ágar Mueller Hinton (AMH – KASVI) com o auxílio de um “swab”. Os discos de bacitracina 0,04 UI e polimixina 300 µg (Sensifar, Cefar)® foram depositados sobre a superfície do meio, contendo o inóculo. Após incubação por 24 horas a  $35 \pm 2$  °C, a zona de inibição ao redor do disco foi observada e medida. Os estafilococos são resistentes à bacitracina e crescem até a borda do disco, enquanto que os micrococcos são sensíveis e apresentam halo de, no mínimo, 10 mm (KONEMAN et al., 2008; MARKEY et al., 2013). *Staphylococcus pseudintermedius* é sensível à polimixina, apresentando halo  $\leq$  10 mm (MARKEY et al., 2013). A cepa *Staphylococcus aureus* subsp. *aureus* ATCC® 25923™ foi utilizada como controle (resistente à bacitracina e à polimixina).

### 4.1.5 Prova de Voges-Proskauer e fermentação de manose e maltose

Os isolados de ECP foram bioquimicamente identificados através das provas de Voges-Proskauer (VP), fermentação da maltose e manose (KONEMAN et al., 2008). As cepas *S. pseudintermedius* CD93 e *Staphylococcus aureus* subsp. *aureus* ATCC® 25923™ foram utilizadas como controles.

A prova de Voges-Proskauer foi realizada utilizando-se 1 ml de Caldo MR-VP (Vetec Química Fina®). A utilização da glicose, apresentando como produto final a acetoina, é indicada pela coloração rosa após a adição de 100 µl de α-naftol a 5% e 300 µl de KOH (40%) no caldo contendo o inóculo incubado por 24 horas a  $35 \pm 2$  °C.

A fermentação dos açúcares manose e maltose foi avaliada utilizando caldo base contendo o indicativo de pH vermelho de fenol (microMED, ISOFAR) e o açúcar a 1%. A produção de ácido, indicada pela diminuição do pH e consequente mudança de cor, foi avaliada após 24 horas à temperatura de  $35 \pm 2$  °C. O Quadro 1 mostra os resultados esperados na identificação fenotípica das espécies de ECP (DEVRIESE et al., 2005; MARKEY et al., 2013).

**Quadro 1.** Resultados esperados na identificação fenotípica das espécies de ECP

Coagulase	Bacitracina	Polimixina	VP	Manitol	Manose	Maltose	Identificação
+	R	S	-	(+)	+	+/-	<i>S. pseudintermedius</i>
+	R	S	fraco	ND	ND	-/fraco	<i>S. intermedius</i>
+	R	ND	-	+	+	+	<i>S. delphini</i>
+	R	R	+	+	+	+	<i>S. aureus</i>
+	R	ND	-	+/-	-	+	<i>S. aureus</i> subsp. <i>anaerobicus</i>
+	R	ND	+	(+)	+	-	<i>S. schleiferi</i> subsp. <i>coagulans</i>
+/-	R	R	-	-	+	-	<i>S. hyicus</i>

ND: Não determinado; R: Resistente; S: Sensível; (+) 11 a 89% de isolados positivos.

## 4.2 Identificação molecular de *Staphylococcus pseudintermedius*

Os isolados foram reativados em ágar Trypticase de Soja (TSA – BD Difco™) e posteriormente submetidos à liberação do DNA bacteriano por lise térmica para as análises genotípicas.

### 4.2.1 Liberação do DNA bacteriano por lise térmica

Para liberação do DNA bacteriano, foi utilizada metodologia proposta por Velasco e colaboradores (2015), com algumas modificações. Cada isolado foi cultivado em microtubos contendo 1 ml de caldo Infuso de Cérebro e Coração (BHI – BD Difco™) a  $35 \pm 2$  C por 24 horas. Após incubação, os cultivos foram submetidos à centrifugação a  $30.000 \times g$  durante 2 minutos e 30 segundos. O sobrenadante foi descartado, adicionou-se 200 µl de água ultrapura, seguida de agitação em “vortex”, incubação a 100 °C por 10 minutos em bloco de aquecimento do tipo termobloco (ou banho seco) e nova centrifugação a  $30.000 \times g$  por 2 minutos e 30 segundos. Por fim, 180 µl do DNA sobrenadante foi adicionado a um novo microtubo e armazenado a -20 C. °

### 4.2.2 Identificação pela técnica da Reação em Cadeia da Polimerase (“Polymerase Chain Reaction” – PCR)

A caracterização genotípica foi realizada pela amplificação utilizando iniciadores específicos para o gênero *Staphylococcus* (ZHANG et al., 2004), e para a espécie *Staphylococcus pseudintermedius* (SASAKI et al., 2010) (Quadro 2). A cepa *S. pseudintermedius* CD93 foi utilizada como padrão para amplificação do gene *nuc*.

Foram utilizadas as seguintes concentrações de reagentes nas reações de PCR: Tampão DreamTaq 10X (2,0 mM MgCl<sub>2</sub>, Thermo Fischer Scientific □), 0,5 mM de dNTP (Invitrogen®), 1,25 U DreamTaq DNA Polimerase (Thermo Fischer Scientific) □, 0,4 µM de cada iniciador, água mili-Q para completar um volume total de reação de 25 µl e 2 µl do DNA total liberado. Os fragmentos foram avaliados por eletroforese em gel de agarose a 2%. O marcador de tamanho molecular de 10.000 pb (Bionexus™ Hi-Lo DNA marker □) foi utilizado. Após a eletroforese, o gel foi corado em solução de brometo de etídio (1,5 µg/ml) de etídio por 20 minutos. A imagem do mesmo foi capturada pelo fotodocumentador Omega Lum™ G Imaging System (Alpegen).®

#### Quadro 2. Iniciadores e ciclos empregados para identificação genotípica

Gene	Espécie	Sequência dos iniciadores (5'-3')	Ciclo
------	---------	-----------------------------------	-------



(Tamanho do fragmento)			
16S rRNA (756pb)	<i>Staphylococcus</i> spp.	AAC TCT GTT ATT AGG GAA GAA CA CCA CCT TCC TCC GGT TTG TCA CC	95°C 5 min (94°C 30 s, 58°C 30 s, 72°C 1 min) x 30 e 72 °C 10 min
<i>nuc</i> (926 pb)	<i>S. pseudintermedius</i>	TRG GCA GTA GGA TTC GTT AA CTT TTG TGC TYC MTT TTG G	95°C 2 min (95°C 30 s, 56°C 35 s e 72°C 1 min) x 30 e 72°C 2 min

#### 4.2.3 Identificação proteômica por MALDI-TOF MS

A identificação proteômica pela técnica do Tempo de Vôo de Ionização/Desorção por Laser Assistida por Matriz (MALDI-TOF MS) foi realizada em duas etapas. Na primeira, todos os isolados fenotipicamente identificados foram submetidos a essa avaliação no Laboratório de Investigação em Microbiologia Médica (LIMM) do Instituto de Microbiologia Paulo Góes da Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ) para triagem inicial, uma vez que que banco de dados do equipamento (MALDI-TOF LT Microflex Bruker, Bruker<sup>®</sup>) desse laboratório não é padronizado para a apropriada diferenciação entre os membros do grupo SIG.

Os isolados que posteriormente apresentaram-se resistentes à metilina foram então identificados quanto à espécie pelo MALDI-TOF MS do Laboratório do Dr. Qijing Zhang (Veterinary Microbiology & Preventive Medicine, College of Veterinary Medicine, Iowa State University – ISU, EUA), que possuía banco de dados atualizado e adequadamente padronizado para a precisa diferenciação entre os membros do grupo SIG.

Em ambas as etapas, os isolados foram cultivados em ágar BHI (KASVI)<sup>®</sup> a 35 ± 2 C por 24 horas. Cada cultura bacteriana foi transferida, em duplicata, para a microplaca (96 MSP, Bruker - Billerica, EUA) e, ao sedimento bacteriano, foi adicionada uma solução de lise (ácido fórmico 70%, Sigma-Aldrich<sup>®</sup>) em quantidade suficiente para cobri-lo. Em seguida, 1 µl de solução da matriz (ácido alfa-ciano-4-hidroxi-cinâmico diluído em acetonitrila 50% e ácido trifluoracético 2,5%, Sigma-Aldrich<sup>®</sup>) foi utilizado para cobrir o extrato bacteriano, para finalmente ser processado. Os espectros de cada amostra foram gerados em um espectrômetro de massa (MALDI-TOF LT Microflex Bruker, Bruker<sup>®</sup>) equipado com laser de 337 nm de nitrogênio no modo linear controlado pelo programa FlexControl 3.3 (Bruker<sup>®</sup>). 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<sup>®</sup>), com as configurações padronizadas para identificação bacteriana. O programa confronta os espectros da amostra desconhecida com amostras de referência 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 confiável é a identificação (Quadro 3).

**Quadro 3.** Interpretação dos escores resultantes da avaliação proteômica por MALDI-TOF MS

Escore	Interpretação	Símbolo	Cor
2.00 – 3.00	Alta confiança	(+++)	Verde
1.70 – 1.99	Baixa confiança	(+)	Amarelo
0.00 – 1.69	Nenhuma identificação possível	(-)	Vermelho

#### 4.3. Detecção da produção de “slime” em microplaca de poliestireno

A formação de “slime” em microplaca foi avaliada quantitativamente através de metodologia descrita por Marques et al. (2013). Os isolados testados foram repicados em ágar Sangue de Carneiro 5% (AS) por 24 horas a  $35 \pm 2$  °C e as colônias crescidas foram inoculadas em ágar BHI e também incubadas a  $35 \pm 2$  °C por 24 horas. As culturas bacterianas foram ajustadas a escala 0,5 de McFarland e diluídas 1:10 em caldo Tripticase de Soja (TS) (MERCK) com adição de 0,24% de glicose. Alíquotas de 200 µl dessa suspensão foram inoculadas em microplacas de poliestireno estéreis com 96 poços (Zellkultur-Testplatten, TPP) incubadas por 24 horas a  $35 \pm 2$  °C sem agitação. Após incubação, esse material foi desprezado e os poços foram lavados 2 vezes com 200 µl de solução salina estéril, secos em estufa a 65 °C por 1 hora e corado com 200 µl de safranina 1% por 15 minutos. Os poços foram lavados três vezes com água destilada e secos à temperatura ambiente. A absorbância foi determinada à 490 nm em leitor de ELISA (Multiskan™ GO Microplate Spectrophotometer, Thermo Scientific™). Poços não inoculados contendo caldo TSA com 0,24% de glicose serviram como branco. Os isolados foram testados em triplicata e a média dos três valores de absorbância obtidos foi calculada para cada isolado avaliado. As cepas foram classificadas quanto à intensidade de formação de biofilme de acordo com os seguintes valores de absorbância obtidos: forte  $\geq 0.3$ ; moderado  $\geq 0.2$  e  $<0.3$  e fraco  $\geq 0.1$  e  $<0.2$  (MARQUES et al., 2013).

#### 4.4. Detecção de genes de virulência

A técnica de PCR foi realizada utilizando os iniciadores descritos no Quadro 4, para a detecção dos seguintes genes de virulência:

- Enterotoxinas estafilocócicas – *sea*, codificador da enterotoxina do tipo A (SEA), *seb* (SEB), *sec* (SEC), *seC<sub>canine</sub>* (enterotoxina do tipo C em *S. pseudintermedius*), *sed* (SED), e *se-int* (enterotoxina em *S. pseudintermedius* – SE-int);
- Leucocidinas – *lukS-lukF* (leucocidina Pantón-Valentine), *lukE-lukD*, (bicomponente da leucotoxina LukE-LukD em *S. aureus*) e *lukM* (leucocidina M);
- Hemolisinas – *hla* (alfa-hemolisina) *hlb* (beta-hemolisina), *hld* (delta-hemolisina), *hlg* (gama-hemolisina), *hglv* (variante da gama-hemolisina);
- Toxinas esfoliativas – *eta*, que codifica toxina esfoliativa do tipo A (ETA), *etb* (ETB), *etd* (ETD), *siet* (toxina esfoliativa de *S. pseudintermedius*) e *exi* (toxina esfoliativa de *S. pseudintermedius*).

Foram utilizadas as seguintes concentrações de reagentes: Tampão 1 X (Thermo Fischer Scientific □), 0,4 µM de cada iniciador, 0,5 mM de dNTP (Invitrogen □), 1,25 mM de MgCl<sub>2</sub>, 0,5 U de Taq DNA Polimerase (Thermo Fischer Scientific □), água mili-Q para completar um volume total de reação de 25 µl e 2 µl do DNA total liberado. Os fragmentos foram avaliados por eletroforese em gel de agarose a 2%. O marcador de tamanho molecular de 10.000 pb (Bionexus™ Hi-Lo DNA marker □) foi utilizado. Após a eletroforese, o gel foi corado em solução de brometo de etídio (1,5 µg/ml) por 20 minutos. A imagem do mesmo foi capturada pelo fotodocumentador Omega Lum™ G Imaging System (Alpegen®).

**Quadro 4.** Iniciadores e ciclos empregados para a amplificação dos genes de virulência

Gene	Sequência dos iniciadores (5' – 3')	Referência*	Ciclo
------	-------------------------------------	-------------	-------

(Tamanho do fragmento)			
<i>sea</i> (252 pb)	TTG CAG GGA ACA GCT TTA GGC AAT C TGG TGT ACC ACC CGC ACA TTG A	1	95 °C 5 min (95°C 1 min, 60 °C 1 min, 72 °C 1 min) x 35 e 72 °C 10 min
<i>seb</i> (355 pb)	GAC ATG ATG CCT GCA CCA GGA GA AAC AAA TCG TTA AAA ACG GCG ACA CAG		
<i>sed</i> (830 pb)	GAA AGT GAG CAA GTT GGA TAG ATT GCG GCT AG CCG CGC TGT ATT TTT CCT CCG AGA G		
<i>sec</i> (283 pb)	CTT GTA TGT ATG GAG GAA TAA CAA TGC AGG CAT CAT ATC ATA CCA	2	95°C 10 min (95°C 1 min, 68°C 45 s, 72°C 1 min) x 15 e 72°C 10 min
<i>seCcanine</i> (793 pb)	GTA ATT TTG ATA TTC GCA CT TAT CAA AAT CGG ATT AAC A	3	97 °C 5 min (92 °C 30 s, 40 °C 1 min, 72 °C 1 min) x 45 e 72 °C 5 min
<i>se-int</i> (874 pb)	TAT AGG TAC CCT TGG ACT TTT GGA TG TGG CGA GCT CCA AAT CCA TTA GCC	4	95 °C 5 min (95°C 30 s, 55 °C 30 s, 72 °C 2 min) x 30 e 72 °C 10 min
<i>lukS-PV-lukF-PV</i> (433 pb)	ATC ATT AGG TAA AAT GTC TGG ACA TGA TCC A GCA TCA AST GTA TTG GAT AGC AAA AGC	5	94 °C 5 min (94°C 30 s, 55 °C 30 s, 72 °C 1 min) x 30 e 72 °C 7 min
<i>lukE-lukD</i> (269 pb)	TGA AAA AGG TTC AAA GTT GAT ACG AG TGT ATT CGA TAG CAA AAG CAG TGC A	6	94 °C 30 s (94°C 30 s, 55 °C 30 s, 72 °C 30 s) x 30 e 72 °C 1 min
<i>lukM</i> (780 pb)	TGG ATG TTA CCT ATG CAA CCT AC GTT CGT TTC CAT ATA ATG AAT CAC TAC		
<i>hla</i> (209 pb)	CTG ATT ACT ATC CAA GAA ATT CGA TTG CTT TCC AGC CTA CTT TTT TAT CAG T		
<i>hlb</i> (309 pb)	GTG CAC TTA CTG ACA ATA GTG C GTT GAT GAG TAG CTA CCT TCA GT		
<i>hld</i> (111 pb)	AAG AAT TTT TAT CTT AAT TAA GGA AGG AGT G TTA GTG AAT TTG TTC ACT GTG TCG A		
<i>hlg</i> (535 pb)	GTC AYA GAG TCC ATA ATG CAT TTA A CAC CAA ATG TAT AGC CTA AAG TG		
<i>hgl</i> (390 pb)	GAC ATA GAG TCC ATA ATG CAT TYG T ATA GTC ATT AGG ATT AGG TTT CAC AAA G		
<i>eta</i> (190 pb)	ACT GTA GGA GCT AGT GCA TTT GT TGG ATA CTT TTG TCT ATC TTT TTC ATC AAC		
<i>etb</i> (612 pb)	CAG ATA AAG AGC TTT ATA CAC ACA TTA C AGT GAA CTT ATC TTT CTA TTG AAA AAC ACT C		
<i>etd</i> (376 pb)	AAC TAT CAT GTA TCA AGG CAG AAT TTC CCG ACT CAG		
<i>siet</i> (359 pb)	ATG GAA AAT TTA GCG GCA TCT GG CCA TTA CTT TTC GCT TGT TGT GC	8	M-PCR 94 °C 5 min (94°C 30 s, 48 °C 30 s, 72 °C 1 min) x 30 e 72 °C 7 min
<i>exi</i> (455 pb)	AGT AAC AAA CTA TCA CAT AGC G TTA ACA GGT TAT AAC GTC CCC	9	95 °C 5 min (95°C 30 s, 55 °C 30 s, 72 °C 2 min) x 30 e 72 °C 10 min

\* 1. CAMPBELL et al., 2008; 2. MONDAY et al., 1999; 3. EDWARDS et al., 1997; 4. BEXLEY et al., 2013; 5. LINA et al., 1999; 6. JARRAUD et al., 2002; 7. YAMAGUCHI et al., 2002; 8. LAUTZ et al., 2006; 9. MELTER et al., 2017.

## 4.5. Detecção fenotípica da resistência aos antimicrobianos

### 4.5.1 Difusão em disco de oxacilina

Todos os isolados foram submetidos a técnica de difusão em disco com o antimicrobiano oxacilina. O ensaio foi realizado através da distribuição dos isolados provenientes de suspensões diretas das colônias equivalentes à escala 0,5 de McFarland sobre a superfície de placas contendo AMH (BD Difco™), onde foram depositados os discos de oxacilina (1 µg) (Oxoid™). Após

incubação por 18 horas a  $35 \pm 2$  °C, os halos (diâmetros) formados ao redor dos discos foram observados e medidos em milímetros. Isolados que apresentaram halos  $\leq 17$  mm foram classificados como resistentes (CLSI VET01S ED3, 2015). A cepa *Staphylococcus aureus* subsp. *aureus* ATCC® 33591™ foi usada como controle positivo (resistente).

#### 4.5.2 Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) para Oxacilina

O método da microdiluição em caldo foi utilizado para a determinação da concentração inibitória mínima de oxacilina nos isolados (CLSI VET01S ED3, 2015; CLSI M100, 2017). Para isso a solução estoque de oxacilina (1,0 mg/ml) foi diluída nas concentrações 0,25 µg/ml, 0,5 µg/ml, 1,0 µg/ml, 2,0 µg/ml, 4,0 µg/ml, 8,0 µg/ml, 16 µg/ml, 32 µg/ml, 64 µg/ml, 128 µg/ml, 256 µg/ml e 512 µg/ml em caldo Müeller Hinton (CMH – BD Difco™) arcrescido de 2% NaCl. Após os processos de inoculação e incubação por 24 horas a  $35 \pm 2$  °C a leitura foi realizada por visualização de turbidez. Isolados que apresentaram valores de CIM  $\leq 0,5$  µg/ml foram classificados como resistentes (CLSI VET01S ED3, 2015). A cepa *Staphylococcus aureus* subsp. *aureus* ATCC® 33591™ foi usada como controle positivo (resistente).

#### 4.5.3 Detecção da resistência à vancomicina por Ágar Screen

O Ágar “Screen” com vancomicina foi utilizado para a detecção de *Staphylococcus* spp. resistentes ou com reduzida suscetibilidade a esse antimicrobiano. O teste foi realizado de acordo com o Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI M100, 2017), através da inoculação de isolados provenientes de suspensões diretas das colônias equivalentes à escala 0,5 de McFarland sobre a superfície do ágar BHI (KASVI) suplementado com 6 µg/ml de vancomicina. Essas placas foram incubadas a  $35 \pm 2$  °C por 24 horas e após esse período, um exame cuidadoso foi realizado para verificar a presença de pequenas colônias ou crescimento em filme, o que caracteriza resistência. As cepas *Enterococcus faecalis* ATCC® 29212™ (sensível) e *E. faecalis* ATCC® 51299™ (resistente) foram usadas como controles.

#### 4.5.4 Antibiograma automatizado para detecção de isolados multirresistentes

A resistência aos antimicrobianos cloranfenicol, ciprofloxacina, daptomicina, eritromicina, gentamicina, kanamicina, lincomicina, linezolida, nitrofurantoína, penicilina, quinupristina/dalfopristina, tetraciclina, tigeciclina e vancomicina foi analisada por diluição em caldo através do sistema automatizado Sensititre Automated System (Sensititre AIM™) com painel de antibióticos NARM para bactérias Gram positivas (CMV3AGPF; Sensititre, Thermo Fischer Scientific). As microplacas foram incubadas a  $35 \pm 2$  °C por 24 horas. A CIM foi interpretada automaticamente pelo Sensititre OptiRead™, de acordo com parâmetros determinados pelo CLSI VET01S ED3 (2015). Isolados foram considerados multirresistentes quando exibirem resistência a pelo menos um agente em três ou mais classes de antimicrobianos diferentes (MAGIORAKOS et al., 2012).

#### 4.6. Detecção de genes *mec*

Foi realizada a técnica de PCR para amplificação dos genes *mecA* (GEHA et al., 1994), *mecA* variante (MELO et al., 2014) e *mecC* (STEEGER et al., 2012) (Quadro 5). Foram utilizadas as seguintes concentrações de reagentes: Tampão 10X (Thermo Fischer Scientific <sup>□</sup>), 0,5 µM de cada iniciador, 0,5 mM de dNTP (Invitrogen <sup>□</sup>), 1,25 mM de MgCl<sub>2</sub>, 0,5 U de Taq DNA Polimerase (Thermo Fischer Scientific <sup>□</sup>), água mili-Q para completar um volume total de reação de 25 µl e 2 µl do DNA total liberado. Os fragmentos foram avaliados por eletroforese em gel de agarose a 2%. O marcador de tamanho molecular de 10.000 pb (Bionexus™ Hi-Lo DNA marker <sup>□</sup>) foi utilizado.

Apos a eletroforese, o gel foi corado em solução de brometo de etídio (1,5 µg/ml) por 20 minutos. A imagem do mesmo foi capturada pelo fotodocumentador Omega Lum™ G Imaging System (Alpegen®). As cepas *Staphylococcus aureus* subsp. *aureus* ATCC® 33591™, *Staphylococcus aureus* MO48A e *Staphylococcus aureus* BAA 2312 foram usadas como controles positivos para a presença dos genes *mecA*, *mecA* variante e *mecC*, respectivamente.

**Quadro 5.** Iniciadores e ciclos empregados para a amplificação dos genes *mec*

Gene (Tamanho do fragmento)	Sequência dos iniciadores (5' – 3')	Ciclo
<i>mecA</i> (310 pb)	GTA GAA ATG ACT GAA CGT CCG ATA A CCA ATT CCA CAT TGT TTC GGT CTA A	95°C 5 min (94°C 30 s, 58°C 30 s, 72 °C 1 min) x 30 e 72°C 10 min
<i>mecA variante</i> (809 pb)	CAG GCA TGC AGA AAA ATC AA TTG AGT CGA ACC AGG TGA TG	95°C 5 min (94°C 1 min, 55°C 1 min, 72°C 1 min) x 30 e 72°C 10 min
<i>mecC</i> (718 pb)	GAA AAA AAG GCT TAG AAC GCC TC CCT GAA TC[W] GCT AAT AAT ATT TC	94°C 15 min (94°C 30 s, 50°C 1 min, 72°C 1 min) x 35 e 72°C 10 min

#### 4.7. Caracterização dos cassetes cromossômicos *mec* (SCC*mec*)

Para a caracterização dos cassetes cromossômicos *mec* (SCC*mec*), reações de PCR “multiplex” (Quadro 6) foram conduzidas de acordo com Milheirico e colaboradores (2007). Foram utilizadas as seguintes concentrações de reagentes nas reações de PCR: DreamTaq PCR Master Mix (tampão DreamTaq 2X; 1,6 mM dNTP; 4 mM MgCl<sub>2</sub> – Thermo Fischer Scientific <sup>□</sup>), 0,4 µM de cada iniciador, água mili-Q para completar um volume total de reação de 25 µl e 2 µl do DNA total liberado. Os fragmentos foram avaliados por eletroforese em gel de agarose a 2%. O marcador de tamanho molecular de 10.000 pb (Bionexus™ Hi-Lo DNA marker <sup>□</sup>) foi utilizado. Apos a eletroforese, o gel foi corado em solução de brometo de etídio (1,5 µg/ml) por 20 minutos. A imagem do mesmo foi capturada pelo fotodocumentador Omega Lum™ G Imaging System (Alpegen®). A cepa *Staphylococcus aureus* subsp. *aureus* ATCC® 33591™ foi usada como controle (SCC*mec* tipo III).

**Quadro 6:** Iniciadores e ciclos empregados para a tipagem dos elementos SCC*mec*

Iniciadores (Tamanho do fragmento)	Sequência dos iniciadores (5' – 3')	Tipo de SCC <i>mec</i> , região	Ciclo
(1) CIF2 F2 CIF2 R2 (495 pb)	TTC GAG TTG CTG ATG AAG AAG G ATT TAC CAC AAG GAC TAC CAG C	I, região J1	94°C 12 min (94°C 30 s, 53°C 30 s, 68°C 3 min) x 25 e 72°C 10 min
(2) <i>ccrC</i> F10 <i>ccrC</i> R13 (449 pb)	GTA CTC GTT ACA ATG TTT GG ATA ATG GCT TCA TGC TTA CC	V, complexo <i>ccr</i>	
(3) RIF5 F10 RIF5 R13 (414 pb)	TTC TTA AGT ACA CGC TGA ATC G ATG GAG ATG AAT TAC AAG GG	III, região J3	
(4) SCC <i>mec</i> V J1 F SCC <i>mec</i> V J1 R (377 pb)	TTC TCC ATT CTT GTT CAT CC AGA GAC TAC TGA CTT AAG TGG	V, região J1	
<i>dcs</i> F2 (5) <i>dcs</i> R1 (342 pb)	CAT CCT ATG ATA GCT TGG TC CTA AAT CAT AGC CAT GAC CG	I, II, IV, e VI, região J3	
(6) <i>ccrB2</i> F2 <i>ccrB2</i> R2 (311 pb)	AGT TTC TCA GAA TTC GAA CG CCG ATA TAG AA[W] GGG TTA GC	II e IV, complexo <i>ccr</i>	
(7) <i>kdp</i> F1 <i>kdp</i> R1 (284 pb)	AAT CAT CTG CCA TTG GTG ATG C CGA ATG AAG TGA AAG AAA GTG G	II, região J1	
(8) SCC <i>mec</i> III J1 F SCC <i>mec</i> III J1 R (243 pb)	CAT TTG TGA AAC ACA GTA CG GTT ATT GAG ACT CCT AAA GC	III, região J1	
(9) <i>mecl</i> P2 <i>mecl</i> P3 (209 pb)	ATC AAG ACT TGC ATT CAG GC GCG GTT TCA ATT CAC TTG TC	II e III, complexo <i>mec</i>	
(10) <i>mecA</i> P4 <i>mecA</i> P7 (162 pb)	TCC AGA TTA CAA CTT CAC CAG G CCA CTT CAT ATC TTG TAA CG	Controle positivo interno	

#### 4.8. Estudo da diversidade das cepas MRSP

##### 4.8.1 Tipagem pelo gene *spa*

A tipagem molecular pelo gene *spa* foi realizada conforme descrito por Moodley e colaboradores (2009). Os isolados que foram negativos para o gene *spa* utilizando os iniciadores descritos por Moodley e colaboradores (2009) foram submetidos à PCR para detecção desse gene utilizando os iniciadores desenhados por Ruscher e colaboradores (2010). Os iniciadores e condições utilizados para amplificação da região variável X do gene *spa* estão descritos no Quadro 7. Foram utilizadas as seguintes concentrações de reagentes nas reações de PCR: Tampão DreamTaq 10X (2,0 mM MgCl<sub>2</sub>, Thermo Fischer Scientific □), 0,5 mM de dNTP (Invitrogen ®), 1,25 U DreamTaq DNA Polimerase (Thermo Fischer Scientific □), 0,4 µM de cada iniciador, água mili-Q para completar um volume total de reação de 25 µl e 2 µl do DNA total liberado. Os fragmentos foram avaliados por eletroforese em gel de agarose a 2%. O marcador de tamanho molecular de 10.000 pb (Bionexus™ Hi-Lo DNA marker □) foi utilizado. Após a eletroforese, o gel foi corado em solução de brometo de etídio (1,5 µg/ml) por 20 minutos. A imagem do mesmo foi capturada pelo fotodocumentador Omega Lum™ G Imaging System (Alpegen).®

**Quadro 7.** Iniciadores e ciclos empregados para a amplificação do gene *spa*

Gene (Tamanho do fragmento)	Sequência dos iniciadores (5' – 3')	Referência*	Ciclo
<i>spa</i> (750 – 810 pb)	ACC TGC GCC AAG TTT CGA TGA AG CGT GGT TTG CTT TAG CTT CTT GGC	1	95 °C 10 min (95 °C 30 s, 58 °C 30 s, 72 °C 1 min) x 30 e 72 °C 10 min
<i>spa</i> (303 – 392 pb)	AAG TAG TGA TAT TCT TGC T CCA GGT TGA ACG ACA TGC AT	2	94 °C 5 min (94 °C 30 s, 57 °C 30 s, 72 °C 30 s) x 25 e 72 °C 10 min

\*1. MOODLEY et al., 2009; 2. RUSCHER et al., 2010.

Os produtos de PCR foram purificados através da ExoSAP-IT<sup>®</sup> (USB Corporation, Cleveland, Ohio), conforme recomendação do fabricante. As fitas “forward” e “reverse” foram sequenciadas (método de Sanger) pelo “DNA Facility of the Iowa State University Office of Biotechnology”. As sequências foram alinhadas utilizando o programa MEGA versão 7.0 e visualmente analisadas pela combinação de repetições de sequências de 30 pb descritas para *S. pseudintermedius* (MOODLEY et al., 2009) e disponíveis no site <http://www.pse-spa.org/>, que possui um banco de dados específico para a tipagem por *spa* para essa espécie. A combinação das repetições resulta em diferentes tipos de *spa* (t01 – t074, tyA e tyB).

#### 4.8.2 Eletroforese em Gel de Campo Pulsado (“Pulsed-field Gel Electrophoresis” – PFGE)

O protocolo utilizado para a tipagem das amostras foi o preconizado para *Staphylococcus aureus* pelo “Center for Disease and Control and Prevention” (CDC), com modificações (Velasco et al., 2015). Os isolados foram inoculados em placas de ágar Trypticase de Soja (TSA), e incubados a 37°C por 18 a 24 horas. A cepa *Salmonella* sorotipo Branderup H9812 foi utilizada como controle e foram preparadas de acordo com “PulseNet One-Day (24-28h) Standardized by Laboratory Protocol for Molecular Subtyping of *Escherichia coli* O157:H7, nonon-typhoidal *Salmonella* serotypes and *Shigella sonnei* by Pulsed Field Gel Electrophoresis”.

Com o auxílio de um “swab”, as colonias dos isolados e do controle foram coletadas e ressuspendidas em 2 ml de tampão de suspensão celular (“Cell Suspension Buffer” – CSB; 100 mM Tris; 100 mM EDTA, pH 8,0) de autoclavado e posteriormente ajustados no espectrofotômetro (Absorbância = 0,9 a 1,1 a 610 nm). Em seguida, 200 µl da suspensão de células ajustadas foi transferida para um microtubo contendo 300 µl de TE (10 mM Tris HCl; 1 mM EDTA, pH8,0) e 3 µl de lisostafina para os isolados de *S. pseudintermedius* e 10 µl de Proteínase K para os controles de *S. ser. Braenderup*. Posteriormente adicionou-se 300 µl de SeaKem<sup>®</sup> Gold Agarose equilibrados a temperatura de 55 °C à suspensão ajustada. Após homogeneização, a mesma foi depositada nos moldes de “plugs”. Para cada isolado, foram preparados dois “plugs”.

Para o preparo da agarose, alguns aspectos foram considerados, uma vez que a concentração da agarose depende do tipo de isolado. Para *S. pseudintermedius*, foi utilizada a concentração de 1,8% e, para os controles, 1% acrescido de 1% de SDS. Após a solidificação, os “plugs” dos isolados de *S. pseudintermedius* foram transferidos em tubos Falcon contendo 3 ml de tampão de Lise (6 mM Tris HCl; 1M NaCl; 100 mM EDTA; 0,5% de Brij-58; 0,2% Desoxilato de Sódio; 0,5% Lauril- sarcosina de sódio), e incubados a 37 °C por 4 horas. Já os “plugs” dos controles de *Salmonella ser. Braenderup* foram depositados em 3 ml de outro tampão de lise (50 mM Tris; 50 mM EDTA, pH = 8,0 + 1% sarcosil), foram incubados a 54 °C em banho maria e agitados vigorosamente por 2 horas.

Para a lavagem dos “plugs” dos isolados de *S. pseudintermedius* foram realizadas quatro lavagens utilizando em cada uma 6 ml de TE (10 mM Tris HCl; 1 mM EDTA, pH8,0), num intervalo de 30 minutos entre cada. Já nas lavagens dos “plugs” controles de *S. ser. Braenderup* foram realizadas seis lavagens utilizando em cada 6 ml de água Mili-Q nas duas primeiras, seguidas de quatro lavagens com TE (10 mM Tris HCl; 1 mM EDTA, pH8,0), num intervalo de 10 minutos entre cada. Após a lavagem dos “plugs”, os mesmos foram estocados em TE e refrigerados a 4°C.

Para a digestão enzimática, uma porção de aproximadamente 2 mm de cada “plug” foi cortada com o auxílio de bisturi estéril. Cada porção foi depositada posteriormente em microtubo contendo 100 µl da mistura para a digestão enzimática (*S. pseudintermedius*: 1,5 µl de *Sma*I, 10 µl de Tango Buffer e 88,5 µl de água Mili-Q; controles de *Salmonella ser. Braenderup*: 2,5 µl de *Xba*I, 10 µl de Tango Buffer e 87,5 µl de água Mili-Q). Os isolados de *S. pseudintermedius* foram incubados a 25°C e os controles a 37°C por 3 horas. Após o período de digestão, os “plugs” foram lavados com TE (10 mM Tris HCl; 1 mM EDTA, pH8,0) e armazenados.

Para a Eletroforese em Gel de Campo Pulsado, os “plugs” foram acomodados na superfície dos dentes do pente e deixados alguns minutos à temperatura ambiente para secar. Foi preparado o tampão de eletroforese 0,5X TBE e essa concentração do tampão foi utilizada para o preparo do gel 1% SeaKem® Gold Agarose.

Após a mistura do gel alcançar uma temperatura de 55°C a 60°C, o mesmo foi depositado lentamente na cama contendo o pente com “plugs” aderidos aos dentes. Dessa forma, o gel solidifica com os “plugs” já inseridos nos pocos. Em seguida, foi realizada a Eletroforese em Gel de Campo Pulsado, seguindo os parâmetros para CHEF DR-II, DR-III e CHEF Mapper (Volts = 200 (6v/cm; 14°C, transferência inicial = 5 segundos; transferência final = 40 segundos; tempo de eletroforese 18 horas).

Após a eletroforese, o gel foi corado em solução de brometo de etídio (1,5 µg/ml) por 20 minutos e a imagem do mesmo foi capturada pelo fotodocumentador Omega Lum™ G Imaging System (Alpegen®), que foi avaliada pelo programa Bionumerics (Versão 6.6 Applied Math, Austin, TX) para a determinação das bandas. Para o cálculo da similaridade, utilizou-se o complemento do índice de Dice, com 1% de tolerância e otimização de 0,5%. Utilizou-se o método UPGMA (“Unweighted-Pair Group Method”) para a construção do dendograma e, para o agrupamento, foi considerado o ponto de corte ao nível de 85% de similaridade genética (GRONTHAL et al., 2015). As cepas com diferenças em até três bandas foram consideradas intimamente relacionadas (TENOVER et al., 1995).

#### 4.8.3 Tipagem da Sequência Multilocus (“Multilocus Sequence Typing” – MLST)

A técnica de MLST foi realizada conforme metodologia descrita por Solyman e colaboradores (2013). Os iniciadores e ciclos empregados encontram-se descritos no Quadro 8. Foram utilizadas as seguintes concentrações de reagentes nas reações de PCR: Tampão DreamTaq 10X (2,0 mM MgCl<sub>2</sub>, Thermo Fischer Scientific □), 0,5 mM de dNTP (Invitrogen), 1,25 U DreamTaq DNA Polimerase (Thermo Fischer Scientific □), 0,4 µM de cada iniciador, água mili-Q para completar um volume total de reação de 25 µl e 2 µl do DNA total liberado. Os fragmentos foram avaliados por eletroforese em gel de agarose a 2%. O marcador de tamanho molecular de 10.000 pb (Bionexus™ Hi-Lo Dna marker □) foi utilizado. Após a eletroforese, o gel foi corado em solução de brometo de etídio (1,5 µg/ml) por 20 minutos. A imagem do mesmo foi capturada pelo fotodocumentador Omega Lum™ G Imaging System (Alpegen).®



Os produtos de PCR foram purificados através da ExoSAP-IT<sup>®</sup> (USB Corporation, Cleveland, Ohio), conforme recomendação do fabricante. As fitas “forward” e “reverse” foram sequenciadas (método de Sanger) pelo “DNA Facility of the Iowa State University Office of Biotechnology”. As sequências foram alinhadas utilizando o programa MEGA versão 7.0 e os números de alelos e tipo de sequência (ST) foram determinados através do site <http://pubmlst.org/spseudintermedius/> da Universidade de Oxford para *S. pseudintermedius*. Com base nos dados do alelo, a árvore de extensão mínima foi construída usando o algoritmo PHYLOViZ (<http://www.phyloviz.net/>) (FRANCISCO et al., 2012).

**Quadro 8.** Iniciadores e ciclos empregados para a amplificação por PCR dos sete *loci* para tipagem por MLST

Gene (Tamanho do fragmento)	Sequência dos iniciadores (5' – 3')	Referência*	Ciclo
<i>tuf</i> (500 pb)	CAA TGC CAC AAA CTC G GCT TCA GCG TAG TCT A	1	95 °C 2 min (95°C 1min, 55 °C 1 min, 72 °C 1 min) x 30 e 72 °C 7 min
<i>cpn60</i> (552 pb)	GCG ACT GTA CTT GCA CAA GCA AAC TGC AAC CGC TGT AAA TG		
<i>pta</i> (570 pb)	GTG CGT ATC GTA TTA CCA GA AGG GCA GAA CCT TTT GTT GAG AAG C		
<i>purA</i> (490 pb)	GAT TAC TTC CAA GGT ATG TTT TCG ATA GAG TTA ATA GAT AAG TC	2	95°C 1 min e 30 s (52°C 30 s, 72°C 1 min, 94°C 30 s) x 35, 52 °C 30 s e 72 °C 5 min
<i>fdh</i> (408 pb)	TGC GAT AAC AGG ATG TGC TT CTT CTC ATG ATT CAC CGG C		
<i>ack</i> (680 pb)	CAC CAC TTC ACA ACC CAG CAA ACT AAC CTT CTA ATA CAC GCG CAC GCA		
<i>sar</i> (521 pb)	GGA TTT AGT CCA GTT CAA AAT TT GAA CCA TTC GCC CCA TGA A		

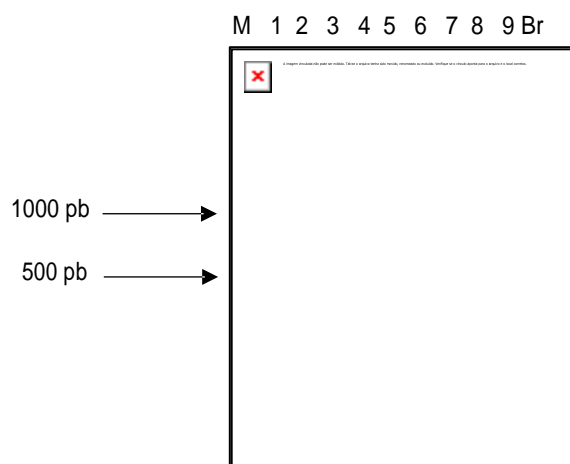
\*1. BANNOEHR et al., 2007; 2. SOLYMAN et al., 2013

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1. Identificação de *Staphylococcus pseudintermedius* e perfil das amostras clínicas

Das 169 amostras clínicas investigadas, 84,0% (142/169) eram oriundas de processos infecciosos em cães e 16,0% (27/169) em gatos. Das 164 amostras (164/169) enviadas ao Laboratório de Microbiologia do Programa de Residência em Microbiologia UFRRJ nos anos de 2014 e 2015, isolou-se 188 *Staphylococcus* spp. que foram preliminarmente identificados por espectrometria de massa MALDI-TOF no L IMM/UFRJ. Desses, 87 (46,7%; 87/188) eram pertencentes ao grupo SIG e foram selecionados para o presente estudo. Também foram estudados cinco *Staphylococcus* spp. oriundos de cinco amostras clínicas (5/169) de processos infecciosos em animais de companhia enviadas a um laboratório comercial na cidade do Rio de Janeiro no ano de 2017, totalizando 92 isolados investigados. Desses, 81 (88,0%; 81/92) eram provenientes de amostras de processos infecciosos em cães e 11 (12,0%; 11/92) em gatos.

Os 92 isolados foram confirmados quanto ao gênero e espécie através da técnica de PCR, ao amplificarem fragmentos de 756 pb do gene 16S rRNA e de 926 pb compatíveis com o esperado para o gene *nuc* de *S. pseudintermedius* (Figura 1).



**Figura 1.** Eletroforese em gel de agarose 2,0 % dos produtos de amplificação do gene *nuc* (926 pb). M: Marcador de tamanho molecular (Hi-Lo Dna Marker –□10.000 pb); 1: Controle positivo (*Staphylococcus pseudintermedius* CD93); 2 – 9: Isolados positivos (*Staphylococcus pseudintermedius*); Br: Branco.

A Tabela 1 detalha o número de amostras clínicas positivas para *S. pseudintermedius* por sítio de infecção e espécie animal afetada. Nota-se que a maioria das amostras caninas positivas para *S. pseudintermedius* (78,3%; 72/81) foi obtida de processos infecciosos em pele (45,7%; 42/81), ouvido (19,6%; 18/81) e trato urinário (13,0%; 12/81), em concordância com relatos que apontam esses como os principais sítios de infecção por *S. pseudintermedius* (WEESE; VAN DUIJKEREN, 2010; BANNOEHR; GUARDABASSI, 2012). Já a maioria das amostras felinas positivas para esse patógeno eram do trato urinário (90,9%; 10 /11) e essa diferença pode ser explicada pelo fato de processos infecciosos em pele e otite serem mais frequentes em caes que em gatos (MORRIS et al., 2006).

**Tabela 1.** Isolamento de *Staphylococcus pseudintermedius* por sítio de infecção e espécie animal

Sítio de infecção	Número de amostras (%)	Cães (%)	Gatos (%)
-------------------	------------------------	----------	-----------

<input checked="" type="checkbox"/>	Pele	43 (46,7)	42 (45,7)	1 (1,1)
<input checked="" type="checkbox"/>	Trato urinário	22 (23,9)	12 (13,0)	10 (10,9)
<input checked="" type="checkbox"/>	Ouvido	18 (19,6)	18 (19,6)	0 (0,0)
	Osso	3 (3,3)	3 (3,3)	0 (0,0)
	Vagina	2 (2,2)	2 (2,2)	0 (0,0)
	Útero	1 (1,1)	1 (1,1)	0 (0,0)
	Líquido sinovial	1 (1,1)	1 (1,1)	0 (0,0)
	Pulmão	1 (1,1)	1 (1,1)	0 (0,0)
	NI	1 (1,1)	1 (1,1)	0 (0,0)
	<b>Total</b>	<b>92 (100%)</b>	<b>81 (88%)</b>	<b>11 (12%)</b>

NI: Não informado.

## 5.2 Detecção da produção de “slime” em microplaca de poliestireno

A capacidade de formação de biofilme varia entre as espécies e em *S. pseudintermedius* não foi completamente caracterizada (SINGH et al., 2013). Buscando avaliar o potencial de produção de biofilme em *S. pseudintermedius*, os 87 isolados obtidos de amostras clínicas enviadas ao Laboratório de Microbiologia do Programa de Residência em Microbiologia foram submetidos ao ensaio de detecção fenotípica da produção desse fator em microplaca. Os cinco isolados obtidos de amostras clínicas enviadas ao laboratório comercial situado no Rio de Janeiro não foram avaliados. A Tabela 2 mostra os percentuais de produção de biofilme pelos isolados avaliados de acordo com o sítio de infecção.

**Tabela 2.** Produção de biofilme nos isolados de *Staphylococcus pseudintermedius* por sítio de infecção

Sítio de infecção	Número de produtores de biofilme (%)				
	Fracos	Fortes	Moderados	Não produtores	
<input checked="" type="checkbox"/>	Pele	24 (27,6)	12 (13,8)	4 (4,6)	3 (3,4)
<input checked="" type="checkbox"/>	Trato urinário	5 (5,7)	7 (8,0)	6 (6,9)	0 (0,0)
<input checked="" type="checkbox"/>	Ouvido	9 (10,3)	3 (3,4)	3 (3,4)	3 (3,4)
	Osso	3 (3,4)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)
	Vagina	0 (0,0)	0 (0,0)	1 (1,1)	1 (1,1)
	Útero	1 (1,1)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)
	Líquido sinovial	1 (1,1)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)
	Pulmão	1 (1,1)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)
	<b>Total = 87 (100%)</b>	<b>44 (50,6%)</b>	<b>22 (25,3%)</b>	<b>14 (16,1%)</b>	<b>7 (8,0%)</b>

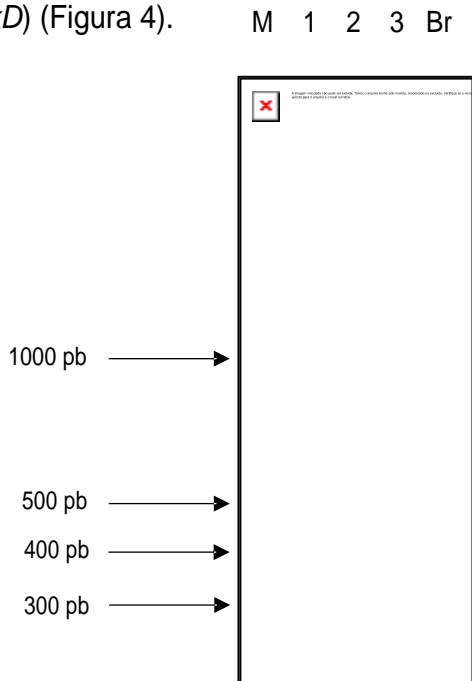
Foi possível determinar que a maioria dos isolados avaliados (93,0%; 81/87) produziu biofilme em diferentes intensidades. Em relação ao percentual de produção, houve semelhança com o reportado na literatura. Singh e colaboradores (2013) reportaram 96% de positividade ao avaliarem a capacidade de formação de biofilme em 140 cepas canadenses e americanas de *S. pseudintermedius* suscetíveis (MSSP) e resistentes (MRSP) à metilicina. Semelhantemente, Bardiau e colaboradores (2013) encontraram 100% (200/200) de produção de biofilme dentre cepas MSSP e MRSP oriundas do Japão. Osland e colaboradores (2012), ao avaliarem cepas MRSP da Noruega, encontraram 100% (23/23) de produção de biofilme. Em outro estudo, com cepas

polonesas de *S. pseudintermedius* oriundas de cães saudáveis e infectados, Garbacz e colaboradores (2013) também encontraram 100% (123/123) de produção de biofilme. A habilidade de *S. pseudintermedius*, especialmente MRSP, em produzir biofilme já foi associada à maior persistência e disseminação dessas cepas (OSLAND et al., 2012)

Quanto à intensidade, a maior parte dos isolados avaliados foi classificada como fraco (50,6%) ou forte (25,3%) produtor de biofilme, o que difere da maioria dos relatos, que reportam produção predominantemente forte ou moderada entre *S. pseudintermedius* (OSLAND et al., 2012; BARDIAU et al., 2013; SINGH et al., 2013; GARBACZ et al., 2013). Isso pode ser explicado pela diferença entre as metodologias utilizadas, uma vez que, no presente estudo, o ensaio empregado foi padronizado para a detecção em *S. aureus* (MARQUES et al., 2013). Visando a uma detecção mais adequada para *S. pseudintermedius*, os isolados serão, em etapa futura, submetidos à avaliação da formação de biofilme de acordo com metodologia e critérios de interpretação descritos por Stepanovic e colaboradores (2007).

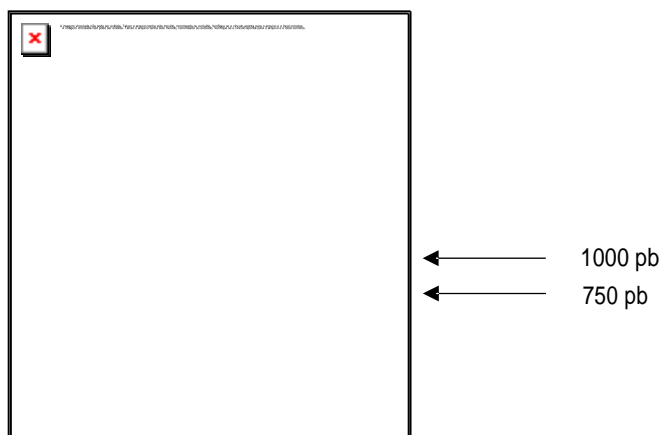
### 5.3 Detecção genotípica de fatores de virulência

Os 92 isolados foram submetidos a reações de PCR para detecção dos genes codificadores dos diferentes fatores de virulência de *S. pseudintermedius*. Dentre os genes de virulência pesquisados, 97,8% (90/92) dos isolados amplificaram o gene *siet* (Figura 2), que codifica uma toxina esfoliativa de *S. pseudintermedius*, 87,0% (80/92) o gene *se-int* (Figura 3), relacionado à produção de enterotoxina, e 12,0% (11/92) o gene que codifica o bicomponente da leucotoxina LukE-LukD (*lukE-lukD*) (Figura 4).

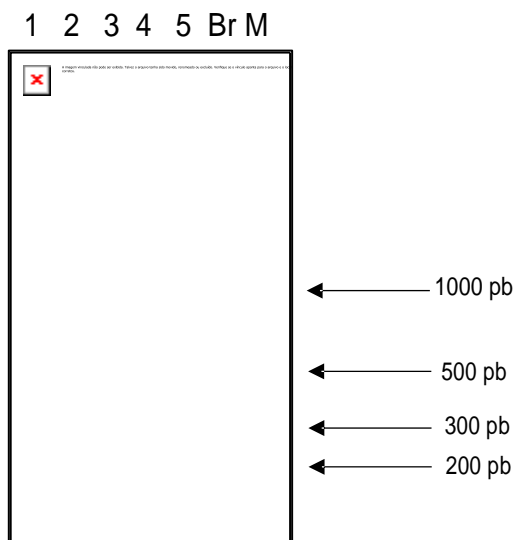


**Figura 2.** Eletroforese em gel de agarose 2,0 % dos produtos de amplificação do gene *siet* (359 pb). M: Marcador de tamanho molecular (Bionexus™ Hi-Lo DNA Marker □ – 10.000 pb); 1 – 3: *Staphylococcus pseudintermedius* positivos para o gene *siet*; Br: Branco.

Br 1 2 3 M



**Figura 3.** Eletroforese em gel de agarose 2,0 % dos produtos de amplificação do gene *se-int* (874 pb). Br: Branco; 1 – 3: *Staphylococcus pseudintermedius* positivos para o gene *se-int*; M: Marcador de tamanho molecular (Bionexus™ Hi-Lo DNA Marker □ 10.000 pb).



**Figura 4.** Eletroforese em gel de agarose 2,0 % dos produtos de amplificação do gene *lukE/D* (269 pb). 1 – 3: *Staphylococcus pseudintermedius* positivos para o gene *lukE/D*; 4 e 5: *Staphylococcus pseudintermedius* negativos para o gene *lukE/D*; Br: Branco; M: Marcador de tamanho molecular (Bionexus™ Hi-Lo DNA Marker □ 10.000 pb).

Além das tradicionais toxinas estafilocócicas (leucocidinas, hemolisinas e superantígenos) principalmente estudadas e relatadas em *S. aureus*, fatores de virulência específicos de *S. pseudintermedius*, como a leucotoxina LukI (análoga da leucocidina “Panton-Valentine”), as toxinas esfoliativas SIET e EXI, e algumas enterotoxinas (SE-int, SEC<sub>canine</sub>) têm sido estudadas (FITZGERALD, 2009; FUTAGAWA-SAITO et al., 2009).

A toxina exfoliativa de *S. pseudintermedius* (SIET) foi originalmente descoberta em isolados oriundos de piodermite canina e é sorologicamente distinta das outras toxinas esfoliativas estafilocócicas, como as encontradas em *S. aureus* (ETA, ETB e ETC) (TERAUCHI et al., 2003a). Lautz e colaboradores (2006) detectaram esse gene em aproximadamente metade dos 45 *S.*

*pseudintermedius* isolados de pele/infecções teciduais e otite externa. No presente estudo, foi possível detectar o gene *siet* em quase todos os isolados avaliados (90/92), em concordância com Yoon e colaboradores (2010), que relataram a presença desse gene no genoma de todos os 74 *S. pseudintermedius* investigados. Perreten e colaboradores (2010) também encontraram o gene *siet* em todos os 146 *S. pseudintermedius* estudados, bem como AnandaChitra e colaboradores (2016) em todos os 91 *S. pseudintermedius*. Não foi possível observar uma correlação entre o sítio de origem da amostra com a presença do gene *siet*, uma vez que apenas dois isolados, um de ouvido e outro de urina, foram negativos. O papel biológico e a relevância clínica desse fator de virulência ainda não foram completamente esclarecidos (BANNOEHR; GUARDABASSI, 2012; ANANDACHITRA et al., 2016)

Futagawa-Saito e colaboradores (2004) descreveram a presença do gene *se-int* e da enterotoxina SE-int em todos os isolados de *S. pseudintermedius* oriundos de cães negativos para o gene SEC e SEC<sub>canine</sub>. Demonstraram ainda significativa homologia entre essa proteína e as enterotoxinas estafilocócicas SEC (59– 61% de identidade) e SEB (56,6% de identidade). De modo similar, o presente estudo encontrou significativa prevalência (87,0%) do gene *se-int*, bem como a ausência dos genes das demais enterotoxinas testadas.

Onze isolados investigados (12,0%) amplificaram o gene *lukE/D*, que codifica o bicomponente da leucotoxina LukE-LukD, um importante fator de virulência envolvido na letalidade das infecções sanguíneas (bacteremia) por *S. aureus* (ALONZO et al., 2012). LukED age matando neutrófilos e facilitando a multiplicação bacteriana no sítio de infecção. Não foram encontrados dados na literatura acerca da detecção desse fator de virulência em isolados de *S. pseudintermedius*. Dentre os isolados de *S. pseudintermedius* avaliados por Gomez-Sanz e colaboradores (2011) e por Gharsa e colaboradores (2013), nenhum amplificou esse gene. Desse modo, até onde consta, esse é o primeiro relato da detecção do gene *lukE/D* na espécie estudada, o que requer uma análise de sequenciamento genético complementar.

Nenhum isolado amplificou os demais genes de virulência pesquisados (*sea*, *seb*, *sec*, *seC<sub>canine</sub>*, *sed*, *lukS/F*, *lukM*, *hla*, *hlb*, *hld*, *hlg*, *hlg<sub>v</sub>*, *eta*, *etb*, *etd* e *exi*) e outros estudos também relatam a ausência desses em cepas de *S. pseudintermedius*. Yoon e colaboradores (2010), também não encontraram os genes *sea*, *seb*, *sec*, *sed* e *see*, codificadores de toxinas estafilocócicas, bem como o gene *tst*, responsável pela toxina da síndrome do choque tóxico, TSST-1. Gomez-Sanz e colaboradores (2011), não detectaram os genes *seC<sub>canine</sub>* e *exi*, tampouco nenhum outro gene relacionado à produção de toxinas e somente duas cepas carregavam o gene *hlg<sub>v</sub>*.

É notória a necessidade de mais pesquisas a fim de identificar e caracterizar melhor os fatores de virulência presentes em *S. pseudintermedius*, buscando determinar a prevalência e o papel biológico que desempenham na patogênese das doenças.

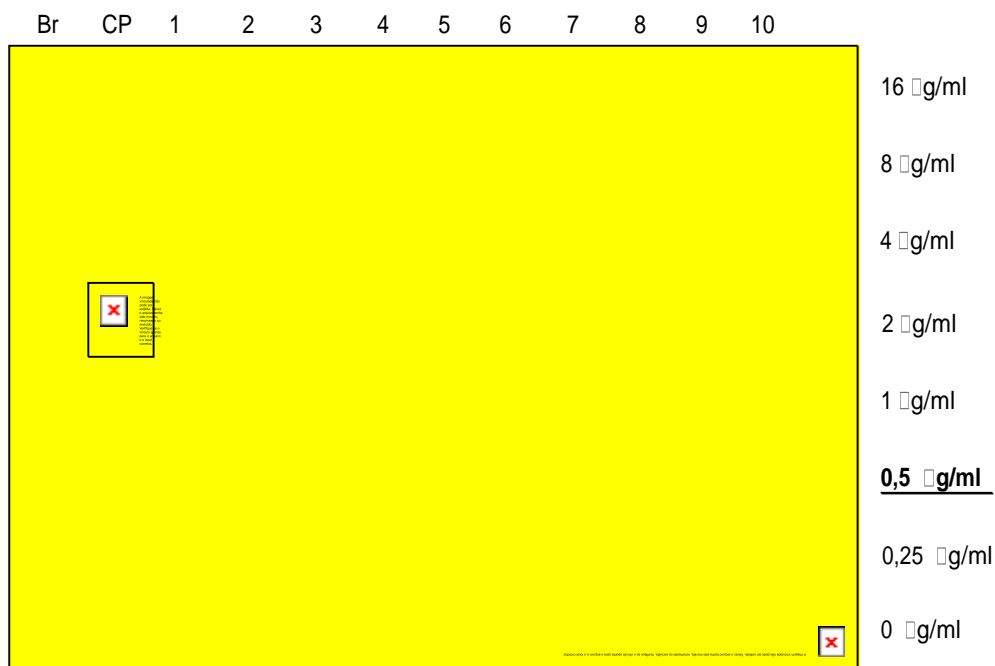
## 5.4 Detecção da resistência aos antimicrobianos

### 5.4.1 Detecção fenotípica da resistência à meticilina

Dos 92 *S. pseudintermedius* submetidos à detecção fenotípica da resistência à meticilina através do teste de difusão em disco (DD) de oxacilina, 23,9% (22/92) foram resistentes a esse antimicrobiano (Figura 5) e em seguida submetidos ao ensaio de microdiluição em caldo para determinação da CIM (Figura 6). Desses, 77,3% (17/22) apresentaram CIM maior ou igual a 512 µg/ml, 18,2% (4/22) CIM de 0,5 µg/ml e 4,5% (1/22) CIM de 128 µg/ml.



**Figura 5.** Ensaio de difusão em disco (DD) de oxacilina (1 µg). Isolado *Staphylococcus pseudintermedius* resistente.



**Figura 6.** Ensaio de microdiluição em caldo para determinação da CIM. Br: Branco (água mili-Q); CP: Controle Positivo (*Staphylococcus aureus* subsp. *aureus* ATCC<sup>®</sup> 33591<sup>TM</sup>); 1-10: Isolados *S. pseudintermedius* resistentes à oxacilina (diferentes concentrações).

#### 5.4.2 Detecção do gene *mecA* e caracterização dos cassetes *SCCmec*

A presença de um gene não é necessariamente acompanhada por sua expressão fenotípica, assim, todos os 92 *S. pseudintermedius* estudados, independente do resultado fenotípico, foram submetidos à PCR para detecção dos genes *mecA* e *mecC*. O gene *mecA* foi encontrado em todos os 22 isolados (100%) fenotipicamente resistentes à meticilina e não era carregado por isolados sensíveis. Tal observação é corroborada por dados semelhantes reportados em outros estudos (BEMIS et al., 2006; BOTONI et al., 2016; WORTHING et al., 2018), o que aponta para uma

expressiva correlação fenogenotípica nessa espécie, sugerindo que em cepas MRSP não existem variantes gênicas que impliquem na não-deteção do gene *mecA*. Tal hipótese é suportada pela não-deteção da variante ao utilizar os iniciadores desenvolvidos por Melo e colaboradores (2014).

Como esperado, o gene *mecC* não foi detectado em nenhum dos 92 isolados testados. O gene *mecC* (*mecALGA251*), um homólogo do gene *mecA*, foi descrito em 2011 em linhagens de *S. aureus* associadas a bovinos (GARCIA-ALVAREZ et al., 2011). Esse gene, que compartilha 70% de homologia com o gene *mecA* e foi encontrado em um novo SCC*mec* (tipo XI), estava presente em isolados *S. aureus* fenotipicamente resistentes aos beta-lactâmicos porém sem o gene *mecA* (GARCIA-ALVAREZ et al., 2011).

Buscando uma identificação molecular ainda mais acurada, os 22 isolados resistentes foram submetidos à identificação pelo MALDI-TOF MS no Laboratório do Dr. Qijing Zhang (Veterinary Microbiology & Preventive Medicine, College of Veterinary Medicine, Iowa State University – ISU, EUA), que também os identificou como pertencentes à espécie *S. pseudintermedius*. A partir desse resultado, esses isolados foram confirmados como *S. pseudintermedius* metilina-resistentes (MRSP) e submetidos ao protocolo de tipificação do cassete SCC*mec*, que revelou que o tipo II-III foi o predominantemente identificado (81,8%; 18/22).

O percentual de SCC*mec* II-III encontrado neste estudo está em concordância com a literatura, que relata prevalência desse tipo de cassete em cepas MRSP, especialmente as pertencentes ao complexo clonal (CC)/sequência tipo (ST) 71 (VAN DUIJKEREN et al., 2011; DOS SANTOS et al., 2016; KIZERWETTER-SWIDA et al., 2017). Neste estudo, 13,6% (3/22) dos MRSP apresentaram SCC*mec* não-tipável e 4,5% (1/22) o tipo IV. Elementos SCC*mec* não tipáveis têm sido relatados em cepas MRSP (SASAKI et al., 2007a; BLACK et al., 2009; PERRETEN et al., 2010; RUSCHER et al., 2010; KANG et al., 2017). SCC*mec* tipo IV também tem sido reportado e é significativamente associado ao CC258 (DOS SANTOS et al., 2016) e a seis STs diferentes (71, 106, 111, 112, 113, 116, 265) (PERRETEN et al., 2010; DOS SANTOS et al., 2016).

Cabe ressaltar o elevado nível de resistência encontrado (CIM  $\geq 8 \mu\text{g/ml}$ ) em associação ao SCC*mec* II-III. Sasaki e colaboradores (2007) também relataram alto nível de resistência à oxacilina (CIM  $\geq 8 \mu\text{g/ml}$ ) em 15 das 18 cepas MRSP estudadas e dessas, 10 possuíam o SCC*mec* III e em cinco o SCC*mec* não pode ser tipificado (NT). Apesar desse relato, não foram encontrados outros estudos relacionando o alto nível de resistência à oxacilina a um determinado tipo de SCC*mec* em cepas MRSP. Sabe-se que os genes reguladores *mecI* e *mecRI*, quando intactos, regulam a expressão do gene *mecA* e consequente produção da PBP2a em *Staphylococcus* spp. (HIRAMATSU et al. 2014). No entanto, em cepas MRSA, a variação no nível de resistência entre clones não pode ser explicada somente pela regulação transcricional do gene *mecA* através da atividade dos elementos regulatórios *mecI* e *mecRI* ou *blaI* e *blaRI*, mas também pela ocorrência de mutações em diferentes genes, como os relacionados à divisão celular e os associados a diferentes aspectos do metabolismo intermediário (DORDEL et al., 2014). Esses diferentes *loci* constituem um conjunto adicional de determinantes genéticos essenciais para a expressão de elevados níveis de resistência em subpopulações de estafilococos e mutações nesses determinantes poderiam desencadear um mecanismo de resposta bacteriana ao estresse (“stringent stress response”), promovendo o aumento da transcrição e tradução de PBP2a (KIM et al., 2013; DORDEL et al., 2014; KIM et al., 2017; PARDOS DE LA GANDARA et al., 2018).

Os escores obtidos pela identificação proteômica, o perfil de resistência à metilina e os tipos de SCC*mec* encontrados para cada MRSP encontram-se descritos na Tabela 3.

**Tabela 3.** Identificação por MALDI-TOF MS, perfil de resistência à metilina e tipos de SCC*mec*



Cepa	MALDI-TOF MS / Escore	DDS OXA	CIM OXA (µg/ml)	mecA	SCC <sub>mec</sub>
C11	<i>Staphylococcus pseudintermedius</i> 1.97	R	□ □□□	+	II-III
C33	<i>Staphylococcus pseudintermedius</i> 2.25	R	□ □□□	+	II-III
C55	<i>Staphylococcus pseudintermedius</i> 2.17	R	□ □□□	+	II-III
C56	<i>Staphylococcus pseudintermedius</i> 2.07	R	□ □□□	+	II-III
C85	<i>Staphylococcus pseudintermedius</i> 2.22	R	□ □□□	+	II-III
C86	<i>Staphylococcus pseudintermedius</i> 2.07	R	□ □□□	+	II-III
C97	<i>Staphylococcus pseudintermedius</i> 2.14	R	□ □□□	+	II-III
C110	<i>Staphylococcus pseudintermedius</i> 2.21	R	□ □□□	+	II-III
C111	<i>Staphylococcus pseudintermedius</i> 2.10	R	□ □□□	+	II-III
C128	<i>Staphylococcus pseudintermedius</i> 1.80	R	□ □□□	+	II-III
C140	<i>Staphylococcus pseudintermedius</i> 1.81	R	□ □□□	+	II-III
C156	<i>Staphylococcus pseudintermedius</i> 2.04	R	□ □□□	+	II-III
VA1	<i>Staphylococcus pseudintermedius</i> 1.97	R	□ □□□	+	II-III
VA2	<i>Staphylococcus pseudintermedius</i> 1.93	R	□ □□□	+	II-III
VA6	<i>Staphylococcus pseudintermedius</i> 2.00	R	□ □□□	+	II-III
VA15	<i>Staphylococcus pseudintermedius</i> 2.03	R	□ □□□	+	II-III
VA27	<i>Staphylococcus pseudintermedius</i> 1.95	R	□ □□□	+	II-III
C57	<i>Staphylococcus pseudintermedius</i> 2.01	R	128	+	II-III
C25	<i>Staphylococcus pseudintermedius</i> 2.07	R	0,5	+	IV
C27	<i>Staphylococcus pseudintermedius</i> 2.04	R	0,5	+	NT
C46	<i>Staphylococcus pseudintermedius</i> 2.21	R	0,5	+	NT
C81	<i>Staphylococcus pseudintermedius</i> 2.02	R	0,5	+	NT

DDS OXA: Difusão em disco simples de oxacilina; CIM OXA: Concentração inibitória mínima de oxacilina; R: Resistente; NT: não-tipável.

### 5.4.3 Detecção de multirresistência nas cepas MRSP

Todas as cepas MRSP isoladas no presente estudo (100%, 22/22) exibiram perfis de multirresistência, sendo resistentes aos antimicrobianos ciprofloxacina, eritromicina, gentamicina, kanamicina, lincomicina, penicilina e tetraciclina. Além da resistência a esses antimicrobianos, 90,9% (20/22) foram também resistentes ao cloranfenicol e 9,1% (2/22) foram incluídas na categoria intermediária.

Estudos anteriores desmontaram que cepas MRSP podem exibir resistência a várias classes de antimicrobianos (DESCLOUX et al., 2008; SCHWARZ et al., 2008; WETTSTEIN et al., 2008; DOS SANTOS et al., 2016). O padrão de multirresistência encontrado neste estudo foi resistência a seis diferentes categorias: aminoglicosídeos, fluoroquinolonas, lincosamidas, macrolídeos, fenicóis e tetraciclinas. De modo semelhante, Penna e colaboradores (2013) encontraram percentual considerável de multirresistência em cepas MRSP oriundas de lesões de pele (piodermite) e otite em cães do Rio de Janeiro. Esses achados são preocupantes, pois mostram a provável disseminação de MRSP em animais de companhia, especialmente cães, reduzindo drasticamente as opções terapêuticas disponíveis para o tratamento dessas infecções.

Quanto à suscetibilidade aos demais antimicrobianos testados (daptomicina, linezolida, nitrofurantoína, tigeciclina, quinupristina/dalfopristina e vancomicina), 100% (22/22) das cepas MRSP foram sensíveis. As 22 cepas MRSP também foram submetidas à detecção de resistência

ou redução da suscetibilidade à vancomicina através do Ágar “Screen” e todos (100%; 22/22) foram classificadas como sensíveis, uma vez que não foram observadas colônias ou crescimento em filme na superfície do ágar. As características das 22 cepas MRSP encontram-se resumidas na Tabela 4.

**Tabela 4.** Tipo de SCCmec e perfil de resistência das 22 cepas MRSP investigadas

Cepa	Origem	Tipo de amostra	SCCmec	Fenótipo de multirresistência
C11	Cão	“Swab” cutaneo	II-III	CLO, CIP, ERI, GEN, KAN, LIN, PEN, TET
C33	Gato	Urina	II-III	CLO, CIP, ERI, GEN, KAN, LIN, PEN, TET
C55	Cão	“Swab” cutaneo	II-III	CLO, CIP, ERI, GEN, KAN, LIN, PEN, TET
C56	Cão	“Swab” cutaneo	II-III	CLO, CIP, ERI, GEN, KAN, LIN, PEN, TET
C57	Gato	Urina	II-III	CLO, CIP, ERI, GEN, KAN, LIN, PEN, TET
C85	Cão	“Swab” cutaneo	II-III	CLO, CIP, ERI, GEN, KAN, LIN, PEN, TET
C86	Cão	“Swab” cutaneo	II-III	CLO, CIP, ERI, GEN, KAN, LIN, PEN, TET
C97	Cão	“Swab” de abscesso	II-III	CLO, CIP, ERI, GEN, KAN, LIN, PEN, TET
C110	Cão	“Swab” cutaneo	II-III	CLO, CIP, ERI, GEN, KAN, LIN, PEN, TET
C111	Gato	Urina	II-III	CLO, CIP, ERI, GEN, KAN, LIN, PEN, TET
C128	Gato	Urina	II-III	CLO, CIP, ERI, GEN, KAN, LIN, PEN, TET
C140	Cão	“Swab” otologico	II-III	CLO, CIP, ERI, GEN, KAN, LIN, PEN, TET
C156	Cão	Fragmento cutâneo e linfonodo	II-III	CLO, CIP, ERI, GEN, KAN, LIN, PEN, TET
VA1	Gato	Urina	II-III	CLO <sup>b</sup> , CIP, ERI, GEN, KAN, LIN, PEN, TET
VA2	Cão	Urina	II-III	CLO, CIP, ERI, GEN, KAN, LIN, PEN, TET
VA6	Cão	Urina	II-III	CLO, CIP, ERI, GEN, KAN, LIN, PEN, TET
VA15	Gato	Urina	II-III	CLO, CIP, ERI, GEN, KAN, LIN, PEN, TET
VA27	Cão	“Swab” <sup>a</sup>	II-III	CLO <sup>b</sup> , CIP, ERI, GEN, KAN, LIN, PEN, TET
C27	Cão	“Swab” cutaneo	NT	CLO, CIP, ERI, GEN, KAN, LIN, PEN, TET
C46	Cão	“Swab” cutaneo	NT	CLO, CIP, ERI, GEN, KAN, LIN, PEN, TET
C81	Cão	“Swab” cutaneo	NT	CLO, CIP, ERI, GEN, KAN, LIN, PEN, TET
C25	Cão	“Swab” cutaneo	IV	CLO, CIP, ERI, GEN, KAN, LIN, PEN, TET

<sup>a</sup> Sítio de infecção não informado.

<sup>b</sup> Resistência intermediária ao cloranfenicol.

CLO: cloranfenicol, CIP: ciprofloxacina, ERI: eritromicina, GEN: gentamicina, KAN: kanamicina, PEN: penicilina; LIN: lincomicina, TET: tetraciclina, NT: não-tipável.

## 5.5 Estudo da diversidade das cepas MRSP

### 5.5.1 Tipagem do gene *spa*

As 22 cepas MRSP isoladas no presente estudo, além da MRSP S231 isolada de leite bovino, foram submetidas à tipagem molecular através da amplificação, sequenciamento e análise do gene *spa*. Dessas, seis (6/23) não puderam ser analisadas devido à baixa qualidade das sequências obtidas, totalizando 17 cepas (n=17) investigadas quanto ao perfil do gene *spa*.

Através dessa análise foi possível detectar quatro tipos diferentes de *spa* utilizando os iniciadores desenhados por Moodley e colaboradores (2009) cujo tipo 2 (t02) foi o predominantemente encontrado (76,5%; 13/17). Quanto às demais cepas analisadas, 11,8% (2/17) possuíam o gene *spa* do tipo 15 (t15), 5,9% (1/17) o do tipo 5 (t05) e 5,9% (1/17) o do tipo 6 (t06). A Tabela 5 resume os tipos de *spa* detectados nas cepas avaliadas. No Anexo B, encontram-se as

sequências obtidas e alinhadas pelo programa BioEdit versão 7.2 contendo as sequências de repetições de 30 pb que determinam o tipo de *spa*.

**Tabela 5.** Origem e tipos de *spa* das cepas avaliadas

Cepa	Origem	Tipo de amostra	<i>spa</i>	Repetições
C11	Cão	“Swab” cutaneo	t02	r01 r02 r03 r03 r03 r06 r05
C33	Gato	Urina	t02	r01 r02 r03 r03 r03 r06 r05
C55	Cão	“Swab” cutâneo	t02	r01 r02 r03 r03 r03 r06 r05
C56	Cão	Secreção purulenta de joelho	t02	r01 r02 r03 r03 r03 r06 r05
C57	Gato	Urina	t02	r01 r02 r03 r03 r03 r06 r05
C85	Cão	“Swab” cutaneo	t02	r01 r02 r03 r03 r03 r06 r05
C86	Cão	“Swab” cutaneo	t02	r01 r02 r03 r03 r03 r06 r05
C111	Gato	Urina	t02	r01 r02 r03 r03 r03 r06 r05
C128	Gato	Urina	t02	r01 r02 r03 r03 r03 r06 r05
C156	Cão	Fragmento cutâneo e linfonodo	t02	r01 r02 r03 r03 r03 r06 r05
VA1	Gato	Urina	t02	r01 r02 r03 r03 r03 r06 r05
VA15	Gato	Urina	t02	r01 r02 r03 r03 r03 r06 r05
S231	Vaca	Leite	t02	r01 r02 r03 r03 r03 r06 r05
C27	Cão	“Swab” cutaneo	t15	r01 r02 r03 r03 r03 r03 r03 r06 r05
C81	Cão	“Swab” cutaneo	t15	r01 r02 r03 r03 r03 r03 r03 r06 r05
C46	Cão	“Swab” cutaneo	t05	r01 r02 r03 r03 r03 r03 r06 r05
VA27	Cão	“Swab” *	t06	r01 r02 r03 r03 r06 r05
C25	Cão	“Swab” cutaneo	NT	-
C97	Cão	“Swab” de abscesso	NT	-
C110	Cão	“Swab” cutaneo	NT	-
C140	Cão	“Swab” otologico	NT	-
VA2	Cão	Urina	NT	-
VA6	Cão	Urina	NT	-

\*Sítio de infecção não informado.

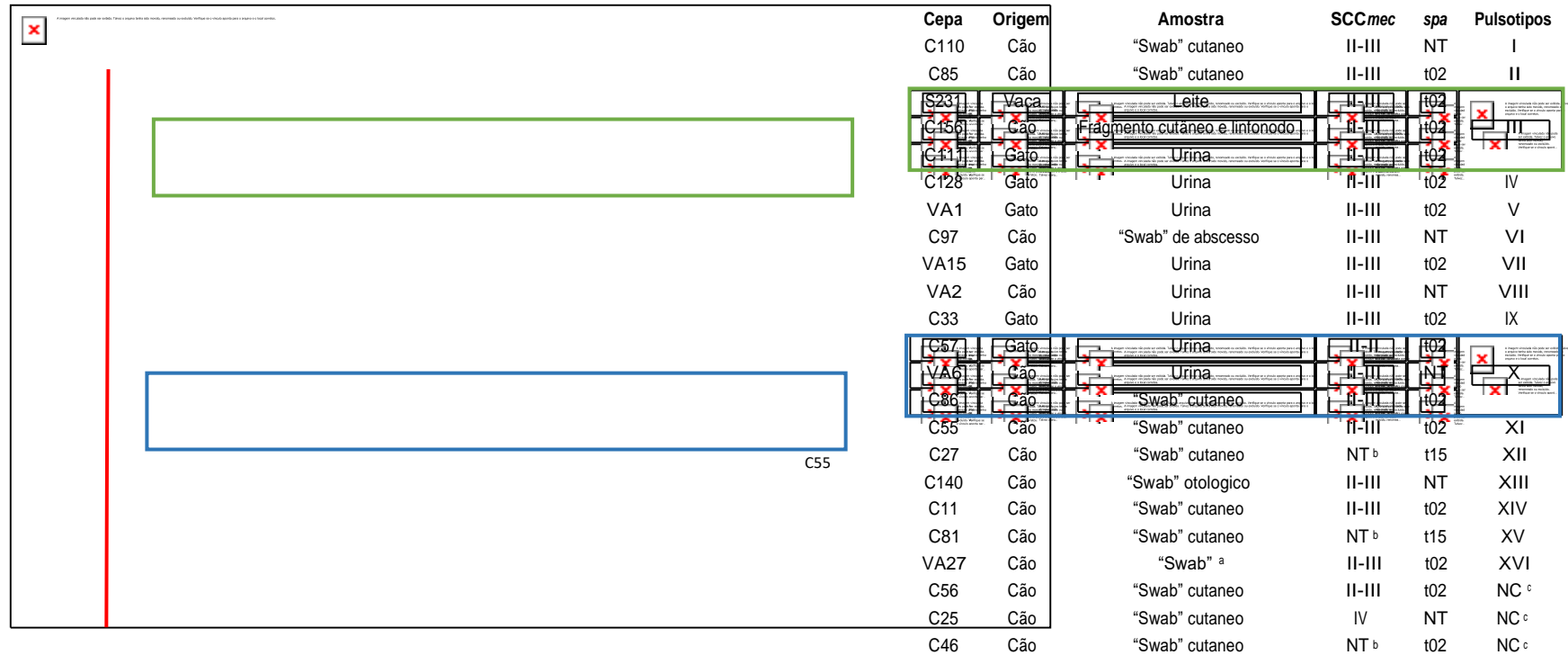
NT: não-tipável.

Estudos relatam que o *spa* t02 é frequentemente associado a cepas MRSP da linhagem europeia ST71 mundialmente disseminada (PERRETEN et al., 2010; FENG et al., 2012; MOODLEY et al., 2013; HAENNI et al., 2014; WORTHING et al., 2018). A presença de padrões similares de repetição entre os tipos t02, t05, t06 e t15 estes são intimamente relacionados, visto que diferem apenas quanto ao número total de repetições r03 (RUSCHER et al., 2010; MOODLEY et al., 2013; WORTHING et al., 2018).

### 5.5.2 Eletroforese em Campo Pulsado (“Pulsed-field Gel Electrophoresis” – PFGE)

Vinte e três cepas (n = 23), incluindo a MRSP S231, foram submetidas a tipagem através da técnica de PFGE. Como os eventos relacionados a ocorrência de surtos não foram investigados pelo presente estudo, a análise por PFGE concentrou-se na identificação de isolados geneticamente relacionados.

Das 23 cepas, três (MRSP C25, C46 e C56) não foram clivadas pela enzima *Sma*I. Metilação dos sítios de restrição no DNA é comumente reportada como razão para a falha na digestão por certas endonucleases (BENS et al., 2006; BOSCH et al., 2010; GÓMEZ-SANZ et al., 2010). Através da técnica de PFGE foi possível observar a considerável heterogeneidade genética e agrupamento em 16 grupos (Figura 7).



**Figura 7.** Dendrograma de similaridade gerado a partir da técnica de PFGE através do método UPGMA e complemento do índice de Dice (Bionumerics, Versão 6.6 Applied Math®, Austin, TX; 1% de tolerância e otimização de 0,5%). Ponto de corte ao nível de 85% de similaridade genética (linha de cor vermelha). Tipos de SCCmec, spa e agrupamentos gerados a partir dos padrões de restrição enzimática. a Sítio de infecção não informado; b não-tipável; c cepa não clivada pela enzima *SmaI*.

As cepas MRSP S231 (isolada de amostra de leite bovino), C156 (fragmento cutâneo de um cão) e C111 (urina de um gato) geraram pulsotipos (padrões de restrição) com similaridade de no mínimo 85% e foram agrupadas no grupo III. MRSP S231 e C156 apresentaram ainda 90% de similaridade. As três cepas, que possuem os mesmos tipos de *SCCmec* II-III, *spa* t02 e perfil de multirresistência, diferem em três fragmentos e são consideradas intimamente relacionadas. A diferença quanto à espécie hospedeira denota o potencial de disseminação de MRSP em populações animais distintas.

As cepas MRSP C57 (isolada de amostra de urina de um cão), VA6 (urina de um gato) e C86 (“swab” cutâneo de um cão) geraram pulsotipos com similaridade superior a 85%, sendo então agrupadas em X. MRSP C57 e VA6 apresentaram o pulsotipo indistinguível (100% de similaridade) e são consideradas idênticas. Ambas possuem o mesmo tipo de *SCCmec* II-III e o mesmo perfil de multirresistência, no entanto, o tipo de *spa* da cepa VA6 não pôde ser determinado. Já MRSP C86 (de *SCCmec* II-III; *spa* t02) é intimamente relacionada às cepas C57 e VA6, uma vez que difere em apenas um fragmento (TENOVER et al., 1995).

### 5.5.3 Tipagem da Sequência Multilocus (“Multilocus Sequence Typing” – MLST)

Através da tipagem pela técnica MLST foi possível detectar cinco tipos diferentes de ST/CC (Tabela 7), sendo a maioria das cepas (86,2%; 19/23) pertencentes ao ST/CC 71, seguido dos STs 265 (4,3%; 1/23) e 282 (4,3%; 1/23). Uma cepa (4,3%; 1/23) não pôde ter o ST determinado, uma vez que as sequências dos *loci pta* e *purA* apresentaram baixa qualidade de sequenciamento e não puderam ser analisadas.

A linhagem de MRSP frequentemente encontrada neste estudo foi a ST71 (CC71), o que é consistente com relatos em outros países (WORTHING et al., 2018; COUTO et al., 2016; DAMBORG et al., 2016; HAENNI et al., 2014; BARDIAU et al., 2013; PERRETEN et al., 2010). MRSP-ST71 foi primeiramente detectada em 2007 na Alemanha (LOEFFLER et al., 2007) e rapidamente tornou-se uma linhagem prevalente em países europeus (PERRETEN et al., 2010). Desde então, espalhou-se por outros países, sendo o clone de MRSP mais amplamente disseminado e tendo sido isolado em 14 países diferentes na Europa, América do Norte e do Sul e Ásia (DOS SANTOS et al., 2016). No Brasil, a Quitoco e colaboradores (2013), relataram a colonização por MRSP-ST71 em um cão na cidade do Rio de Janeiro e, até o momento, o presente estudo é o único no Brasil que avalia a ocorrência de MRSP-ST71 em amostras oriundas de diferentes processos infecciosos de animais de companhia.

A linhagem ST265 (CC258) já foi detectada em cães na Dinamarca (DAMBORG et al., 2016) e Holanda (DUIM et al., 2016), mas nunca fora do continente Europeu (DOS SANTOS et al., 2016). Já a linhagem ST282 (CC45) foi relatada em mais de um continente (DOS SANTOS et al., 2016) e, recentemente, foi detectada na Ásia (DUIM et al., 2018). Frente a esse contexto, a detecção de duas cepas MRSP pertencentes ao ST265 e ST282 pelo presente estudo também indicam um achado inédito no Brasil e, talvez, na América do Sul, sugerindo a disseminação global de clones MRSP.

Para a cepa C27 (4,3%; 1/23), não foi possível atribuir um ST. Na busca por combinações próximas, pôde-se observar que a cepa C27 variava em dois (*ack* e *purA*) dos sete *loci* do ST649. Tendo em vista essa observação, as sequências dos sete *loci* serão cuidadosamente verificadas em relação à diferenciação alélica para que sejam submetidas ao curador da base do banco de dados do MLST (<https://pubmlst.org/spseudintermedius/>) e possa gerar um novo ST (NST). A Tabela 6 detalha os tipos de sequência para os diferentes *loci* e os STs obtidos.

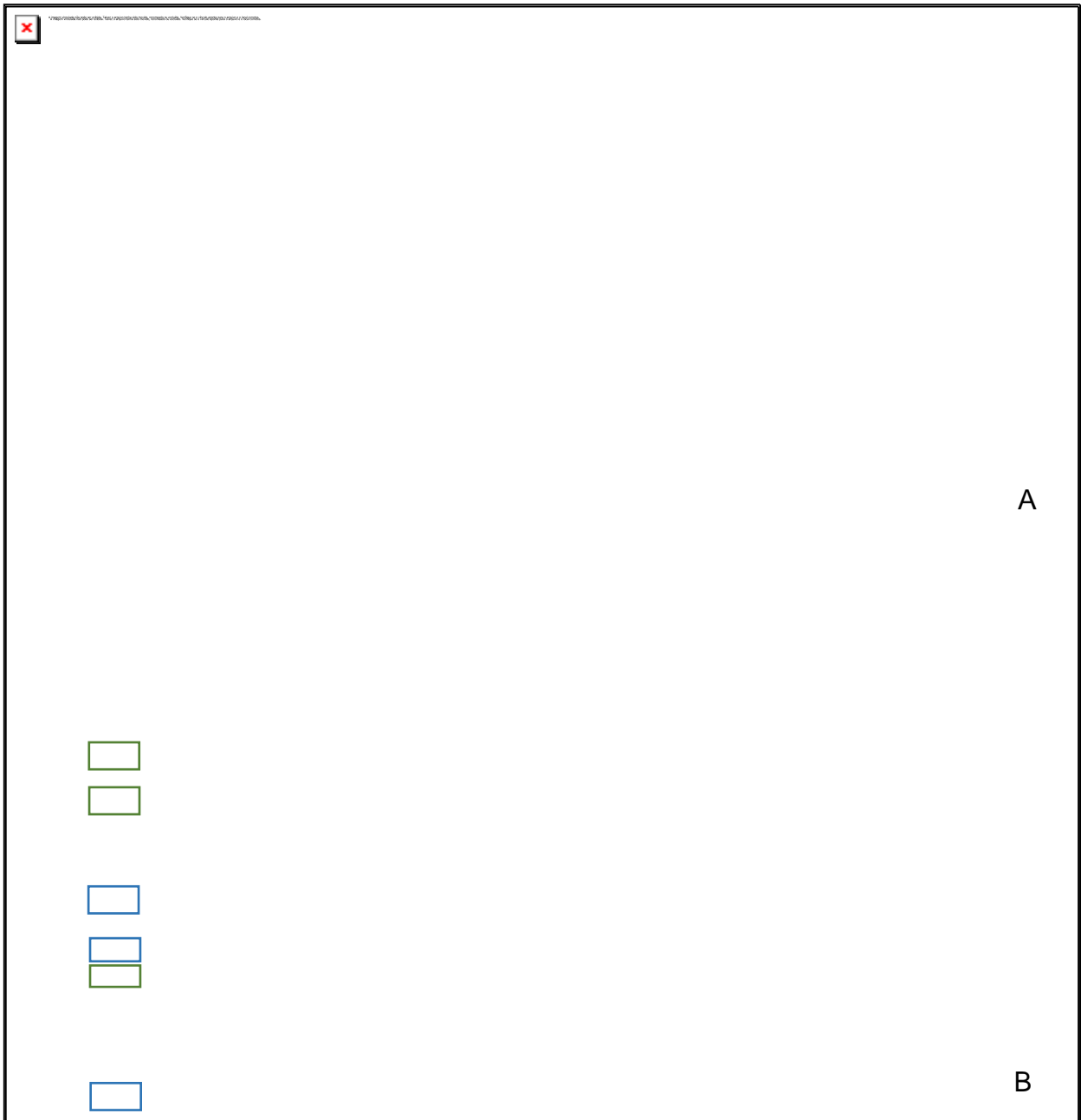
**Tabela 6.** Perfil alélico gerado através da tipagem por MLST

Cepa	Origem	Amostra	<i>tuf</i>	<i>cpn60</i>	<i>pta</i>	<i>purA</i>	<i>fdh</i>	<i>ack</i>	<i>sar</i>	ST
C11	Cão	"Swab" cutaneo	1	9	2	1	1	3	2	71
C33	Gato	Urina	1	9	2	1	1	3	2	71
C55	Cão	"Swab" cutaneo	1	9	2	1	1	3	2	71
C56	Cão	"Swab" cutaneo	1	9	2	1	1	3	2	71
C57	Gato	Urina	1	9	2	1	1	3	2	71
C85	Cão	"Swab" cutaneo	1	9	2	1	1	3	2	71
C86	Cão	"Swab" cutaneo	1	9	2	1	1	3	2	71
C111	Gato	Urina	1	9	2	1	1	3	2	71
C156	Cão	Fragmento cutâneo e linfonodo	1	9	2	1	1	3	2	71
VA1	Gato	Urina	1	9	2	1	1	3	2	71
VA2	Cão	Urina	1	9	2	1	1	3	2	71
VA6	Cão	Urina	1	9	2	1	1	3	2	71
VA15	Gato	Urina	1	9	2	1	1	3	2	71
VA27	Cão	"Swab" *	1	9	2	1	1	3	2	71
S231	Vaca	Leite	1	9	2	1	1	3	2	71
C97	Cão	"Swab" de abscesso	3	9	2	1	1	3	2	CC71
C110	Cão	"Swab" cutaneo	1	9	2	1	1	-	2	CC71
C128	Gato	Urina	1	9	2	1	1	-	2	CC71
C140	Cão	"Swab" otologico	1	9	1	1	1	3	2	CC71
C25	Cão	"Swab" cutaneo	2	13	1	3	4	5	1	265
C46	Cão	"Swab" cutaneo	1	2	4	2	2	3	1	282
C27	Cão	"Swab" cutaneo	2	3	4	7	5	1	1	NST
C81	Cão	"Swab" cutaneo	2	3	-	-	5	1	1	NT

\*Sítio de infecção não informado.

NST: Novo ST; NT: não tipável

A Figura 8 ilustra a estrutura populacional das cepas avaliadas pela técnica de MLST, com base na construção de uma árvore filogenética. Dos 19 MRSP que foram caracterizados com o mesmo ST/CC71, a cepa C97 apresentava variação em um *locus* (*tuf*) e por esse motivo foi alocada em um nodo (ou nó) diferente das demais. O mesmo foi observado para a cepa C140, que apresentava variação em um *locus* (*pta*). Para as cepas C110 e C128, as sequências do *locus ack* apresentavam baixa qualidade e não puderam ser utilizadas para a obtenção de um número de alelo e consequente determinação do ST, sendo classificadas como pertencentes ao CC71 pela combinação dos números de alelo obtidos para os demais *loci*.



**Figura 8.** (A) Gráfico de torta representando os tipos de sequência (STs) das cepas MRSP avaliadas. (B) Aplicação do algoritmo PHILoViZ, mostrando a estrutura populacional e retratando a distribuição clonal das cepas MRSP investigadas. Cada tipo de sequência é representado por um círculo e dentro de cada um estão inseridas as cepas representantes. Os retângulos na cor verde destacam as cepas do grupo III e os retângulos na cor azul destacam as do grupo X, de acordo com o padrão de restrição obtido com a técnica de PFGE. As cepas que não puderam ter o ST determinado e deverão gerar novos STs (NST) foram demonstradas com por única cor (azul claro) e as que apresentaram combinações exatas foram representadas pelo círculo azul escuro.



#### **5.5.4 Análise comparativa dos perfis genéticos gerados pelas técnicas de tipagem molecular**

As 23 cepas estudadas foram divididas em três perfis genéticos de virulência, três tipos de *SCCmec* (incluindo NT), quatro tipos de *spa*, 16 pulsotipos (PFGE) e quatro STs/CC, incluindo um novo ST (NST). A Tabela 7 detalha os resultados das técnicas de tipagem para cada cepa avaliada.

**Tabela 7.** Origem, perfis de virulência, resistência e tipagem molecular das 24 cepas de *Staphylococcus pseudintermedius* investigadas

Cepas	Origem	Amostra	VIRULÊNCIA			RESISTÊNCIA		TIPAGEM MOLECULAR			
			se-int	siet	Perfil genético de virulência	Fenótipo de Resistência		SCCmec	spa	PFGE	MLST
C25	Cão	"Swab" cutaneo	+	+	1	CLO, CIP, ERI, GEN, KAN, LIN, PEN, TET		IV	NT	NC	ST265
C27	Cão	"Swab" cutaneo	+	+	1	CLO, CIP, ERI, GEN, KAN, LIN, PEN, TET		NT	t15	XII	NST
C33	Gato	Urina	+	+	1	CLO, CIP, ERI, GEN, KAN, LIN, PEN, TET		II-III	t02	IX	ST71
C46	Cão	"Swab" cutaneo	+	+	1	CLO, CIP, ERI, GEN, KAN, LIN, PEN, TET		NT	t05	NC	ST282
C55	Cão	"Swab" cutaneo	+	+	1	CLO, CIP, ERI, GEN, KAN, LIN, PEN, TET		II-III	t02	XI	ST71
C56	Cão	"Swab" cutaneo	+	+	1	CLO, CIP, ERI, GEN, KAN, LIN, PEN, TET		II-III	t02	NC	ST71
<del>C57</del>	<del>Gato</del>	<del>Urina</del>	<del>+</del>	<del>+</del>	<del>1</del>	<del>CLO, CIP, ERI, GEN, KAN, LIN, PEN, TET</del>	<del>II-III</del>	<del>t02</del>	<del>X</del>	<del>ST71</del>	
C81	Cão	"Swab" cutaneo	+	+	1	CLO, CIP, ERI, GEN, KAN, LIN, PEN, TET		NT	t15	XV	NT
C85	Cão	"Swab" cutaneo	+	+	1	CLO, CIP, ERI, GEN, KAN, LIN, PEN, TET		II-III	t02	II	ST71
<del>C86</del>	<del>Cão</del>	<del>"Swab" cutaneo</del>	<del>+</del>	<del>+</del>	<del>1</del>	<del>CLO, CIP, ERI, GEN, KAN, LIN, PEN, TET</del>	<del>II-III</del>	<del>t02</del>	<del>X</del>	<del>ST71</del>	
C97	Cão	"Swab" de abscesso	+	+	1	CLO, CIP, ERI, GEN, KAN, LIN, PEN, TET		II-III	NT	VI	CC71
C110	Cão	"Swab" cutaneo	+	+	1	CLO, CIP, ERI, GEN, KAN, LIN, PEN, TET		II-III	NT	I	CC71
C128	Gato	Urina	+	+	1	CLO, CIP, ERI, GEN, KAN, LIN, PEN, TET		II-III	t02	IV	CC71
<del>C156</del>	<del>Cão</del>	<del>Fragmento cutâneo e linfonodo</del>	<del>+</del>	<del>+</del>	<del>1</del>	<del>CLO, CIP, ERI, GEN, KAN, LIN, PEN, TET</del>	<del>II-III</del>	<del>t02</del>	<del>III</del>	<del>ST71</del>	
VA2	Cão	Urina	+	+	1	CLO, CIP, ERI, GEN, KAN, LIN, PEN, TET		II-III	NT	VIII	ST71
C11	Cão	"Swab" cutaneo	-	+	2	CLO, CIP, ERI, GEN, KAN, LIN, PEN, TET		II-III	t02	XIV	ST71
<del>C111</del>	<del>Gato</del>	<del>Urina</del>	<del>+</del>	<del>+</del>	<del>2</del>	<del>CLO, CIP, ERI, GEN, KAN, LIN, PEN, TET</del>	<del>II-III</del>	<del>t02</del>	<del>III</del>	<del>ST71</del>	
VA1	Gato	Urina	-	+	2	CLO <sup>b</sup> , CIP, ERI, GEN, KAN, LIN, PEN, TET		II-III	t02	V	ST71
<del>VA6</del>	<del>Cão</del>	<del>Urina</del>	<del>+</del>	<del>+</del>	<del>2</del>	<del>CLO, CIP, ERI, GEN, KAN, LIN, PEN, TET</del>	<del>II-III</del>	<del>NT</del>	<del>X</del>	<del>ST71</del>	
VA15	Gato	Urina	-	+	2	CLO, CIP, ERI, GEN, KAN, LIN, PEN, TET		II-III	t02	VII	ST71
VA27	Cão	"Swab" <sup>a</sup>	-	+	2	CLO, CIP, ERI, GEN, KAN, LIN, PEN, TET		II-III	t06	XVI	ST71
<del>S231</del>	<del>Vaca</del>	<del>Leite</del>	<del>+</del>	<del>+</del>	<del>2</del>	<del>CLO<sup>b</sup>, CIP, ERI, GEN, KAN, LIN, PEN, TET</del>	<del>II-III</del>	<del>t02</del>	<del>III</del>	<del>ST71</del>	
C140	Cão	"Swab" otológico	-	-	3	CLO, CIP, ERI, GEN, KAN, LIN, PEN, TET		II-III	NT	XIII	CC71

<sup>a</sup> Sítio de infecção não informado.

<sup>b</sup> Resistência intermediária ao cloranfenicol.

F: Forte, FR: Fraco, M: Moderado, NT: não tipável; NA: Não avaliado.

CLO: cloranfenicol, CIP: ciprofloxacina, ERI: eritromicina, GEN: gentamicina, KAN: kanamicina, PEN: penicilina; LIN: lincomicina, TET: tetraciclina.

O agrupamento das cepas de acordo com a distribuição dos genes de virulência produziu três perfis distintos. O perfil 1 foi o predominantemente detectado (69,6%; 15/23) dentre as cepas avaliadas e todas possuem o mesmo perfil de multirresistência. No entanto, apresentam diferenças quanto ao hospedeiro, intensidade de produção de biofilme, tipos de SCC*mec*, pulsotipos e STs. O perfil 2 foi detectado em sete cepas (29,2%; 7/24), que possuem o mesmo SCC*mec* do tipo II-III e o mesmo ST/CC71. Já o perfil 3 foi detectado somente na cepa C140 (4,2%; 1/24). (definir esses perfis). Em *S. pseudintermedius*, independentemente do “background” genético ou do perfil resistência, uma variedade de fatores de virulência tem sido detectada (GHARSA et al., 2013). A diferença quanto à presença ou não de genes de virulência dentro de um mesmo ST/CC poderia ser explicada pelo fato dessas cepas estarem sob diferentes pressões ambientais, fato que já foi observado em cepas de *S. aureus* (MELLES et al., 2004).

Quanto à tipagem do *spa*, foram detectados quatro diferentes tipos. O *spa* t02 foi o predominantemente encontrado (76,5%; 13/17) e todas as cepas que possuem esse tipo, possuem também o SCC*mec* II-III e fazem parte do ST/CC71. Esse achado está em concordância com a literatura que relata o *spa* t02 e o SCC*mec* II-III frequentemente associados a cepas da linhagem mundialmente disseminada MRSP-ST71 (PERRETEN et al., 2010; VAN DUIJKEREN et al., 2011; FENG et al., 2012; MOODLEY et al., 2013; HAENNI et al., 2014; DOS SANTOS et al., 2016; KIZERWETTER-SWIDA et al., 2017; WORTHING et al., 2018). As duas cepas que possuem o *spa* t15 não puderam ter seus SCC*mec* determinados (NT) pela metodologia utilizada. Dessas, a cepa MRSP C27 também não pôde ter o seu ST determinado, visto que varia em dois *loci* do ST649 e, provavelmente, pertence a um novo ST (NST) que será depositado. Já a cepa C81 também não pôde ser atribuída a nenhum ST/CC, devendo ser submetida novamente ao protocolo de tipificação por MLST. Os *spa* t05 e t06 foram observados em duas cepas MRSP: C46 (SCC*mec* NT, ST282) e VA27 (SCC*mec* II-III, ST71), respectivamente. Estudos sugerem que os tipos t02, t05, t06 e t15 são intimamente relacionados, uma vez que diferem somente quanto ao número total de repetições r03 (RUSCHER et al., 2010; MOODLEY et al., 2013; WORTHING et al., 2018). Além disso, o mesmo tipo de *spa* pode estar presente em STs e pulsotipos não relacionados (PERRETEN et al., 2010), o que já foi reportado em MRSA e pode ser resultado de evolução convergente e recombinação genética (STROMMINGER et al., 2008; GUARDABASSI et al., 2009).

A técnica de PFGE gerou perfis distintos e revelou a heterogeneidade das cepas MRSP avaliadas, em concordância com estudos prévios (SASAKI et al., 2007; BLACK et al., 2009; NORSTRÖM et al., 2009; FENG et al., 2012; GRONTHAL et al., 2015; VENTRELLA et al., 2017). Eventos genéticos como mutações pontuais, inserções e/ou deleções de DNA podem resultar em diferenças no padrão de restrição no PFGE (TENOVER et al., 1995; ABOU-ELNAGA, 2017). As cepas MRSP C57 e VA6 (grupo X) são idênticas pois apresentaram o mesmo pulsotipo. Além disso, ambas possuem os mesmos SCC*mec* II-III, ST71 e perfil de multirresistência, diferindo apenas quanto ao hospedeiro e perfil de genes de virulência. Cabe ressaltar que essas cepas foram isoladas de dois animais diferentes, atendidos em locais diferentes (HVPA/UFRRJ em Seropédica e clínica veterinária no Rio de Janeiro). Ainda nesse grupo, C86 é intimamente relacionada a C57 e VA6, diferindo em apenas um fragmento, o que pode ser resultado de um evento genético como mutação ou inserção/deleção de DNA (TENOVER et al., 1995). Essa relação é evidenciada pelo fato dessas três cepas possuírem os mesmos SCC*mec* II-III, *spa* t02, ST71 e basicamente o mesmo perfil de multirresistência. MRSP S231, C156 e C111 fazem parte do grupo III e são intimamente relacionadas, diferindo em três fragmentos. A cepa S231 (grupo III) é oriunda de amostra de leite bovino e sabe-se que *S. pseudintermedius* não é a espécie de *Staphylococcus* spp. associada à patologia das mastites (ROBBERSON et al., 1996), sendo *S. aureus* o agente frequentemente

relatado (SAEI, 2012). No entanto, o único relato de *S. pseudintermedius* como causador de mastite bovina caracterizou a cepa envolvida como MRSP-ST71, *spa* t02 e SCC*mec* II-III (PILLA et al., 2013), curiosamente, os mesmos tipos de ST, *spa* e SCC*mec* caracterizados para S231. Esse achado sugere o potencial de disseminação das cepas MRSP e a possível adaptação a diferentes hospedeiros animais. Além disso, a presença de animais estranhos ao ambiente de ordenha, como cães e gatos, pode contribuir para disseminação de *S. pseudintermedius* em bovinos.

Através da análise por MLST, detectou-se três diferentes tipos de ST/CC, além de um NST. O ST/CC71 foi encontrado em 86,2% (19/23) das cepas e todas possuem o SCC*mec* do tipo II-III, confirmando a conhecida associação entre esse cassete e o ST71 (DAMBORG et al., 2016). De modo geral, as cepas apresentam o mesmo perfil de multirresistência e tipo de *spa* (t02), mas diferem quanto ao hospedeiro, intensidade de produção de biofilme e perfil de virulência. A cepa MRSP C25 (SCC*mec* IV) pertence ao ST265, cujo complexo clonal 258 (CC258) é significativamente associado ao tipo de cassete encontrado neste estudo (DOS SANTOS et al., 2016). A cepa MRSP C46 (ST282/CC45, *spa* t05) não pôde ter o SCC*mec* tipificado pela metodologia utilizada. É interessante ressaltar que um novo tipo de SCC*mec* ( $\psi$ SCC*mec*<sub>57395</sub>) foi descrito especificamente em cepas MRSP (PERRETEN et al., 2013), sendo significativamente associado ao CC45 (DOS SANTOS et al., 2016), de modo que a caracterização desse cassete por metodologia adequada a sua detecção deverá ser realizada em etapa futura.

De todas as cepas MRSP oriundas de processos infecciosos em cães e gatos avaliadas, 56,5% (13/23) compartilham o mesmo ST71-*spat*02-SCC*mec*II-III e o mesmo perfil de multirresistência, indicando que, assim como em outros países, essa é uma importante linhagem de MRSP que pode estar presente nas populações de cães e gatos do Brasil. Além disso, sugere que essas cepas podem ter evoluído de um ancestral comum. Em menor proporção, dois outros STs/CCs foram encontrados. O CC258 tem sido frequentemente reportado na Europa e foi demonstrado, através do MLST e agrupamento por eBURST, que esse CC pode estar substituindo o CC71 em certos países europeus (DUIM et al., 2016; DOS SANTOS et al., 2016). Já CC45 é um clone bem disseminado na Ásia (DOS SANTOS et al., 2016), o qual é associado ao  $\psi$ SCC*mec*<sub>57395</sub> (PERRETEN et al., 2013). A inédita detecção desses STs/CCs no Brasil sugere que essas cepas podem ter sido introduzidas a partir de outros países. Entretanto, mais estudos são necessários para inferir a dinâmica populacional e a prevalência desses e de outros CCs em cepas MRSP brasileiras.

As técnicas PFGE e MLST não tiveram uma boa correlação e esses resultados refletem que a escolha do método de tipagem depende do tipo de estudo epidemiológico. Parte dessa não correlação entre resultados de PFGE e MLST pode ser explicada pela diferença conceitual do termo “clone”. De acordo com Tenover e colaboradores (1995), esse termo refere-se a isolados relacionados, que são geneticamente indistinguíveis ou são tão similares que se presume que derivam de um mesmo ancestral. Já pela técnica de MLST, um clone é definido com base no tipo de sequência, portanto um isolado é definido como clone caso compartilhe o mesmo ST, permitindo assim a identificação de linhagens genéticas que compartilham o mesmo ancestral (SOARES, 2017). Com base nessa definição, os clones incluem isolados com o mesmo tipo de sequência, mas que não são necessariamente geneticamente idênticos (SPRATT, 2004). A diversificação do genoma ancestral em decorrência de elevadas taxas de mutação e recombinação genética, bem como o ganho ou a perda de elementos genéticos móveis pode resultar em um genoma altamente variável, dificultando a definição de clone para esses microrganismos. Nesse sentido, a técnica de PFGE permite a detecção de alterações genômicas mais frequentes e evidencia a diversidade entre as cepas que partilham o mesmo ST (MURCHAN et al., 2003). A melhor compreensão do modo como esses processos de evolução clonal contribui para a estruturação populacional pode ser alcançada através de técnicas como o Sequenciamento Total do Genoma (“Whole Genome

Sequence” – WGS), que permite a investigação, em larga escala, dos mecanismos genéticos que contribuem para a expansão clonal de certas linhagens de *S. pseudintermedius* (RILEY, 2016). No entanto, deve-se ressaltar que para a realização de um estudo populacional, convém a combinação de diferentes técnicas de tipagem.

A elevada prevalência de multirresistência (100%; 22/22) reportada neste e em outros estudos (PERRETEN et al., 2010; BEN ZAKOUR et al., 2011; KADLEC et al., 2012 ; DUIM et al., 2016; DOS SANTOS et al., 2016; VIDELA et al., 2017) evidencia que resistência a outras classes de antimicrobianos é frequentemente encontrada em cepas MRSP. De modo geral, MRSP exibem resistência à eritromicina, clindamicina, tetraciclina, sulfametoxazol + trimetoprim, enrofloxacina, gentamicina, cloranfenicol e amicacina, mas com significativas diferenças quanto à prevalência entre CCs diferentes, conforme demonstrado por dos Santos e colaboradores (2016). Esses pesquisadores revelaram que MRSP-CC258 possui perfil de resistência diferente do que é observado para cepas MRSP-CC71 e CC45. No entanto, no presente estudo, não foram observadas variações nos perfis de resistência entre os STs/CCs detectados, sugerindo que a população MRSP pode estar evoluindo para um perfil de resistência às mais variadas classes, restringindo ainda mais as opções terapêuticas disponíveis. A rápida emergência de multirresistência tem sido associada ao limitado número de elementos genéticos móveis e à pressão de seleção decorrente do uso de inúmeras classes de antimicrobianos (MCCARTHY et al., 2015). Além dos impactos gerados para o tratamento das infecções causadas por esses agentes, a emergência mundial de cepas MRSP multirresistentes é uma preocupação para a saúde pública, seja pelos casos de infecção humana resultantes da exposição a esses patógenos ou pela potencial transferência de elementos genéticos entre espécies de *Staphylococcus* spp. de origem animal e humana (VIDELA et al., 2017).

MRSP é um patógeno nosocomial em ambientes veterinários de maneira comparável às linhagens de MRSA adquiridas em hospitais na medicina humana (PERRETEN et al., 2010) e embora um número considerável de estudos busque a compreensão da dinâmica populacional de *S. pseudintermedius*, pouco se sabe sobre a distribuição de padrões clonais em cepas MRSP brasileiras. Os resultados apresentados revelam a ocorrência de importantes linhagens de MRSP e as principais características fenogenotípicas observadas que podem contribuir para sua expansão clonal. Além disso, o perfil de multirresistência encontrado em STs não relacionados ressalta a necessidade de vigilância epidemiológica contínua buscando determinar a prevalência de populações clonais de MRSP e rastrear o surgimento de novas.

## 6 CONCLUSÕES

- *Staphylococcus pseudintermedius* são importantes produtores de biofilme.
- O elevado número de *S. pseudintermedius* portadores dos genes de virulência *siet* e *se-int* reforça a necessidade de mais estudos para a melhor caracterização desses e de outros genes de virulência presentes nessa espécie de estafilococo.
- A ocorrência de multirresistência a antimicrobianos em cepas MRSP estudadas é considerável e o tipo de cassete *SCCmec* predominantemente encontrado foi o II-III.
- Quatro tipos de *spa* intimamente relacionados foram detectados, com predominância do t02.
- Dois clones foram identificados pela técnica de PFGE, além de quatro cepas intimamente relacionadas (grupos III e X).
- A tipagem por MLST revelou a presença de três STs/CCs (ST/CC71, ST265/CC258 e ST282/CC45) nunca antes reportados em cepas MRSP brasileiras oriundas de processos infecciosos em cães e gatos, com predominância da linhagem mundialmente disseminada ST/CC71-*spat02-SCCmecII-III*.
- A análise comparativa dos métodos de tipagem utilizados revela a importância da combinação de técnicas para uma compreensão mais ampla acerca da diversidade genética de MRSP.

## 7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABRAHAM, J. L.; MORRIS, D. O.; GRIFFETH, G. C.; SHOFER, F. S.; RANKIN, S. C. Surveillance of healthy cats and cats with inflammatory skin disease for colonization of the skin by methicillin-resistant coagulase-positive staphylococci and *Staphylococcus schleiferi* ssp. *schleiferi*. *Veterinary Dermatology*, v. 18, p. 252–259, 2007.

ABOU-ELNAGA, Y. S. *Comparative genotypic characterization of Methicillin-resistant and-susceptible Staphylococcus pseudintermedius of feline and canine origin in Germany*. 2017. Tese (Doutorado), Aus dem Institut für Mikrobiologie und Tierseuchen des Fachbereichs Veterinärmedizin, Freien Universität Berlin, Alemanha. Disponível em [http://www.diss.fu-berlin.de/diss/receive/FUDISS\\_thesis\\_000000106232](http://www.diss.fu-berlin.de/diss/receive/FUDISS_thesis_000000106232)

ALATOOM, A. A.; CUNNINGHAM, S. A.; IHDE, S. M.; MANDREKAR, J.; PATEL, R. Comparison of direct colony method versus extraction method for identification of gram- positive cocci by use of Bruker Biotyper Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization–Time of Flight Mass Spectrometry. *Journal of Clinical Microbiology*, v. 49, p. 2868–2873, 2011.

ALONZO, F.; BENSON, M. A.; CHEN, J.; NOVICK, R. P.; SHOPSIN, B.; TORRES, V. J. *Staphylococcus aureus* leukocidin ED contributes to systemic infection by targeting neutrophils and promoting bacterial growth *in vivo*. *Molecular Microbiology*, v. 83, n. 2, p. 423–435, 2012.

AL-TALIB, H.; YEAN, C. Y.; AL-KHATEEB, A.; HASSAN, H.; SINGH, K. K.; AL-JASHAMY, K. A pentaplex PCR assay for the rapid detection of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and Panton-Valentine Leucocidin. *BMC Microbiology*, v. 9, p. 113- 120, 2009.

AN, Y. H.; FRIEDMAN, R. J. Concise review of mechanisms of bacterial adhesion to biomaterial surfaces. *Journal of Biomedical Materials Research*, v. 43, p. 338–348, 1998.

ANANDACHITRA, M.; JAYANTHY, C.; NAGARAJAN, B. Virulence Genes Detection and Antimicrobial Susceptibility of *Staphylococcus pseudintermedius* Isolates from Canine Skin Infection in Chennai, India. *Proceedings of the National Academy of Sciences, India Section B: Biological Sciences*, doi: 10.1007/s40011-016-0760-9, 2016.

ANDREI, A., & ZERVOS, M. J. The application of molecular techniques to the study of hospital infection. *Archives of Pathology & Laboratory Medicine*, n.130, v.5, p.662-668, 2006.

ARCIOLA, C. R; CAMPOCCIA, D.; RAVAIOLI, S.; MONTANARO, L. Polysaccharide intercellular adhesin in biofilm: structural and regulatory aspects. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, v. 5, n. 7, doi: 10.3389/fcimb.2015.00007, 2015.

ATALAY, B.; ERGIN, F.; CEKINMEZ, M.; CANER, H.; ALTINORS, N. Brain abscess caused by *Staphylococcus intermedius*. *Acta Neurochirurgica*, v. 147, p. 347– 348, 2005.

BANNOEHR J.; BEN ZAKOUR, N. L.; WALLER, A. S.; GUARDABASSI, L.; THODAY, K. L.; VAN DEN BROEK, A. H. M.; FITZGERALD, J. R. Population genetic structure of the *Staphylococcus intermedius* group: insights into *agr* diversification and the emergence of methicillin-resistant strains. *Journal of Bacteriology*, v. 189, p. 8685–8692, 2007.

BANNOEHR, J.; FRANCO, A.; IURESCIA, M.; BATTISTI, A.; FITZGERALD, J. R. Molecular diagnostic identification of *Staphylococcus pseudintermedius*. *Journal of Clinical Microbiology*, v. 47, p. 469–471, 2009.

BANNOEHR, J.; BROWN, J. K., SHAW, D. J.; FITZGERALD, R. J.; VAN DEN BROEK, A. H.; THODAY, K. L. *Staphylococcus pseudintermedius* surface proteins SpsD and SpsO mediate adherence to *ex vivo* canine corneocytes. *Veterinary Dermatology*, v. 23, p. 119–124, e26, 2011a.

BANNOEHR, J.; BEN ZAKOUR, N. L.; REGLINSKI, M.; INGLIS, N. F.; PRABHAKARAN, S.; FOSSUM, E.; SMITH, D. G.; WILSON, G. J.; CARTWRIGHT, R. A.; HAAS, J., HOOK, M. VAN DEN BROEK, A. H.; THODAY, K. L.; FITZGERALD, J. R. Genomic and surface proteomic analysis of the canine pathogen *Staphylococcus pseudintermedius* reveals proteins that mediate adherence to the extracellular matrix. *Infection and Immunity*, v. 79, p. 3074–3086, 2011b.

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

BARNHAM, M.; HOLMES, B. Isolation of CDC group M-5 and *Staphylococcus intermedius* from infected dog bites. *Journal of Infection*, v. 25, p. 332–334, 1992.

BAPTISTE, K.E.; WILLIAMS, K.; WILLIAMS, N.J.; WATTRET, A.; CLEGG, P.D.; DAWSON, S.; CORKILL, J.E.; O'NEILL, T.; HART, C.A. Methicillin-resistant staphylococci in companion animals. *Emerging Infectious Diseases*, v. 11, p. 1942-1944, 2005.

BARBUDDHE, S.B.; MAIER, T.; SCHWARZ, G. Rapid identification and typing of listeria species by matrix-assisted laser desorption ionization time of flight mass spectrometry. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 74, p. 5402–5407, 2008.

BARDIAU M.; YAMAZAKI, K.; OTE, I; MISAWA, N.; MAINIL, J. G. Characterization of methicillin-resistant *Staphylococcus pseudintermedius* isolated from dogs and cats. *Microbiology and Immunology*, v. 57, p. 496–501, 2013.

BARROS, E. M.; ÍORIO, N. L. P.; BASTOS, M. C. F.; SANTOS, K. R. N.; GIAMBIAGI-deMARVAL, M. Species-level identification of clinical staphylococcal isolates based on polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism analysis of a partial *groEL* gene sequence. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, v. 59, p. 251-257, 2007.

BEMIS, D. A.; JONES, R. D; HIATT, L. E. et al. Comparison of Tests to Detect Oxacillin Resistance in *Staphylococcus intermedius*, *Staphylococcus schleiferi*, and *Staphylococcus aureus* Isolates from Canine Hosts. *Journal of Clinical Microbiology*, v.44, n.9, p.3374-3376, 2006.



BEN ZAKOUR, N.L.; BANNOEHR, J.; VAN DEN BROEK, A. H.; THODAY, K. L.; FITZGERALD, J. R. Complete genome sequence of the canine pathogen *Staphylococcus pseudintermedius*. *Journal of Bacteriology*, v. 193, p. 2363–2364, 2011.

BENS, C. C.; VOSS, A.; KLAASSEN, C. H. Presence of a novel DNA methylation enzyme in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates associated with pig farming leads to uninterpretable results in standard pulsed-field gel electrophoresis analysis. *Journal of Clinical Microbiology*, v. 44, n. 5, p. 1875-6, 2006.

BEXLEY, J.; NUTTALL, T. J.; HAMMERBERG, B.; FITZGERALD, J. R.; HALLIWELL, R. E. Serum anti-*Staphylococcus pseudintermedius* IgE and IgG antibodies in dogs with atopic dermatitis and nonatopic dogs. *Veterinary Dermatology*, v. 24, p. 19–e6, 2013.

BIZZINI, A.; GREUB, G. MALDI-TOF MS, a revolution in clinical microbial identification. *Clinical Microbiology and Infectious Diseases*, v. 16, p. 1614–1619, 2010.

BLACK, J.G. *Microbiologia: Fundamentos e Perspectivas*. 4a ed., Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, p.370-419, 2002.

BLACK, C. C.; SOLYMAN, S. M.; EBERLEIN, L. C.; BEMIS, D. A.; WORON, A. M.; KANIA, S. A. Identification of a predominant multilocus sequence type, pulsed-field gel electrophoresis cluster, and novel staphylococcal chromosomal cassette in clinical isolates of *mecA*-containing, methicillin-resistant *Staphylococcus pseudintermedius*. *Veterinary Microbiology*, v. 139, p. 333–338, 2009.

BLAIOTTA, G.; FUSCO, V.; ERCOLINI, D.; PEPE, O.; COPPOLA, S. Diversity of *Staphylococcus* species strains based on partial *kat* (catalase) gene sequences and design of a PCR-Restriction Fragment Length Polymorphism assay for identification and differentiation of coagulase-positive species (*S. aureus*, *S. delphini*, *S. hyicus*, *S. intermedius*, *S. pseudintermedius*, and *S. schleiferi* subsp. *coagulans*). *Journal of Clinical Microbiology*, v. 48, n. 1, p. 192-201, 2010.

BODE, L. G.; VAN WUNNIK, P.; VAESSEN, N.; SAVELKOUL, P. H.; SMEETS, L. C. Rapid detection of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in screening samples by relative quantification between the *mecA* gene and the SA442 gene. *Journal of Microbiological Methods*, v. 89, p.129-132, 2012.

BOSCH, T., DE NEELING, A. J.; SCHOULS, L. M.; VAN DER ZWALUW, K. W.; KLUYTMANS, J. A.; GRUNDMANN, H.; HUIJSDENS, X. W. PFGE diversity within the methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clonal lineage ST398. *BMC Microbiology*, 10:40, doi:10.1186/1471-2180-10-40, 2010.

BOTONI, L. S.; SCHERER, C. B.; SILVA, R. O.; COURA, F. M.; HEINEMANN, M. B. PAES-LEME, F. O. COSTA-VAL, A. P. Prevalence and in vitro susceptibility of methicillin-resistant *Staphylococcus pseudintermedius* (MRSP) from skin and nostrils of dogs with superficial pyoderma. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, v. 36, n. 12:1178-1180, 2016.

CARBONNELLE, E.; MESQUITA, C.; BILLE, E.; DAY, N.; DAUPHIN, B.; BERETTI, J. L.; FERRONI, A.; GUTMANN, L.; NASSIF, X. MALDI-TOF mass spectrometry tools for bacterial identification in clinical microbiology laboratory. *Clinical Biochemistry*, v. 44, p. 104–109, 2011.

CAMPBELL, S. J.; DESHMUKH, H. S.; NELSON, C. L.; BAE, I. -G; STRYJEWSKI, M. E; FEDERSPIEL, J. J.; TONTHAT, G. T.; RUDE, T. H; BARRIERE, S. L.; COREY, R.; FOWLER, V. G. Genotypic Characteristics of *Staphylococcus aureus* Isolates from a Multinational Trial of Complicated Skin and Skin Structure Infections. *Journal of Clinical Microbiology*, v. 46, n. 2, p. 674–684, 2008.

CHANCHAITHONG, P.; PRAPASARAKUL, N.; PERRETEN, V.; SCHWENDENER, S. Characterization of a novel composite staphylococcal cassette chromosome *mec* in methicillin-resistant *Staphylococcus pseudintermedius* from Thailand. *Antimicrobial Agents Chemotherapy*, v. 60, p. 1153–1157, 2016.

CHERKAOUI, A.; HIBBS, J.; EMONET, S. Comparison of two matrix assisted laser desorption ionization–time of flight mass spectrometry methods with conventional phenotypic identification for routine bacterial speciation. *Journal of Clinical Microbiology*, v. 48, p. 1169–1175, 2010.

CHUANG, C. Y.; YANG, Y. L.; HSUEH, P. R.; LEE, P. I. Catheter-related bacteremia caused by *Staphylococcus pseudintermedius* refractory to antibiotic-lock therapy in a hemophilic child with dog exposure. *Journal of Clinical Microbiology*, v. 48, p. 1497–1498, 2010.

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 (CLSI). Performance Standards for Antimicrobial Disk and Dilution Susceptibility Tests for Bacteria Isolated from Animals. 3rd ed. CLSI supplement VET01S (ISBN 1-56238-908-4 [Electronic]). Clinical and Laboratory Standards Institute; 950 West Valley Road, Suite 2500, Wayne, Pennsylvania 19087 USA, 2015.

Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing. 27th ed. CLSI supplement M100 (ISBN 1-56238-804-5 [Print]; ISBN 1-56238-805-3 [Electronic]). Clinical and Laboratory Standards Barbara L. Zimmer, PhD Institute, 950 West Valley Road, Suite 2500, Wayne, Pennsylvania 19087 USA, 2017.

COUTO, N.; BELAS, A.; COUTO, I.; PERRETEN, V.; POMBA, C. Genetic relatedness, antimicrobial and biocide susceptibility comparative analysis of methicillin-resistant and -susceptible *Staphylococcus pseudintermedius* from Portugal. *Microbial Drug Resistance*, v. 20, p. 364–371, 2014.

COX, H.U.; NEWMAN, S.S.; ROY, A.F.; HOSKINS, J.D. Species of *Staphylococcus* isolated from animal infections. *Cornell Veterinarian*, v. 74, p. 124–135, 1984.

- DAMBORG, P.; MOODLEY, A.; AALBÆK, B.; VENTRELLA, G.; PIRES DOS SANTOS, T.; GUARDABASSI, L. High genotypic diversity among methicillin-resistant *Staphylococcus pseudintermedius* isolated from canine infections in Denmark. *BMC Veterinary Research*, v. 12, n. 131, doi: 10.1186/s12917-016-0756-y, 2016.
- DECRISTOPHORIS, P.; FASOLA, A.; BENAGLI, C.; TONOLLA, M.; PETRINI, O. Identification of *Staphylococcus intermedius* Group by MALDI-TOF MS. *Systematic and Applied Microbiology*, v. 34, p. 45–51, 2011.
- DESCLOUX, S.; ROSSANO, A.; PERRETEN, V. Characterization of new staphylococcal cassette chromosome *mec* (SCC*mec*) and topoisomerase genes in fluoroquinolone and methicillin-resistant *Staphylococcus pseudintermedius*. *Journal of Clinical Microbiology*, v. 46, p. 1818–1823, 2008
- DEURENBERG, R., VLAYEN, J., GUILLO, S., OLIVER, T. K., FERVERS, B., & BURGERS, J. Standardization of search methods for guideline development: an international survey of evidence-based guideline development groups. *Health Information & Libraries Journal*, v. 25, n. 1, p. 23-30, 2008.
- DEVRIESE, L. A; VANDAMME, L. R.; FAMEREE, L. Methicillin (cloxacillin)-resistant *Staphylococcus aureus* strains isolated from bovine mastitis cases. *Zentralblatt für Veterinärmedizin Reihe*, v.9, n. 7, p.598–605, 1972.
- DEVRIESE, L.; VANCANNEY, M.; BAELE, M.; VANEECHOUTTE, M.; DE GRAEF, E.; SNAUWAERT, C.; CLEENWERCK, I.; DAWYNDT, P.; SWINGS, J.; DECOSTERE, A.; HAESBROUCK, F. *Staphylococcus pseudintermedius* sp. nov., a coagulase-positive species from animals. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, v. 55, p. 1569-1573, 2005.
- DEVRIESE, L.A.; HERMANS, K.; BAELE, M.; HAESBROUCK, F. *Staphylococcus pseudintermedius* versus *Staphylococcus intermedius*. *Veterinary Microbiology*, v. 133, p. 206–207, 2009.
- DORDEL, J.; KIM, C.; CHUNG, M.; PARDOS DE LA GANDARA, M.; HOLDEN, M. T.; PARKHILL, J.; DE LENCASTRE, H.; BENTLEY, S. D.; TOMASZ, A. Novel determinants of antibiotic resistance: identification of mutated loci in highly methicillin-resistant subpopulations of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *mBio*, 5:e01000, 2014.
- DOS SANTOS, T. P.; DAMBORG, P.; MOODLEY, A.; GUARDABASSI, L. Systematic Review on Global Epidemiology of Methicillin-Resistant *Staphylococcus pseudintermedius*: Inference of Population Structure from Multilocus Sequence Typing Data. *Frontiers in Microbiology*, v. 7, 1599, 2016.
- DUBIN, G.; KOZIEL, J.; PYRC, K.; WLADYKA, B.; POTEMPA, J. Bacterial proteases in disease – role in intracellular survival, evasion of coagulation/fibrinolysis innate defenses, toxicoses and viral infections. *Current Pharmaceutical Design*, v. 19, 1090–1113, 2013.

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

DUIM, B.; VERSTAPPEN, K. M.H.W.; KALUPAHANA, R. S.; RANATHUNGA, L.; FLUIT, A. C.; WAGENAAR, J. A. Methicillin-resistant *Staphylococcus pseudintermedius* among dogs in the description of novel SCCmec variants. *Veterinary Microbiology*, v. 213, p. 136–141, 2018.

EDWARDS, V.M.; DERINGER, J.R.; CALLANTINE, S.D.; DEOBALD, C.F.; BERGER, P.H.; KAPUR, V.; STAUFFACHER, C.V.; BOHACH, G.A. Characterization of the canine type C enterotoxin produced by *Staphylococcus intermedius* pyoderma isolates. *Infection and Immunity*, v. 65, p. 2346–2352, 1997.

EL-SAYED, A.; ALBER, J.; LAMMER, C.; JAGER, S.; WOLTER, W.; VÁZQUEZ, H.C. Comparative study on genotypic properties of *Staphylococcus aureus* isolated from clinical and subclinical mastitis in Mexico. *Vet. Méx.*, v.37, n.2, p.165-179, 2006.

FAZAKERLEY, J.; NUTTALL, T.; SALES, D.; SCHMIDT, V.; CARTER, S. D.; HART, C. A.; MCEWAN, N. A. Staphylococcal colonization of mucosal and lesional skin sites in atopic and healthy dogs. *Veterinary Dermatology*, v. 20, p. 179–184, 2009.

FAZAKERLEY, J. WILLIAMS, N.; CARTER, S.; MCEWAN, N. A.; NUTTALL, T. Heterogeneity of *Staphylococcus pseudintermedius* isolates from atopic and healthy dogs. *Veterinary Dermatology*, v. 21, p. 578–585, 2010.

FEIL, E. J.; COOPER, J. E.; GRUNDMANN, H.; ROBINSON, D. A.; ENRIGHT, M. C.; BERENDT, T.; PEACOCK, S. J.; SMITH, J. M.; MURPHY, M.; SPRATT, B. G.; MOORE, C. E.; DAY, N. P. J. How clonal is *Staphylococcus aureus*? *Journal of Bacteriology*, v. 185, p. 3307–3316, 2003.

FEIL, E. J.; LI, B. C.; AANENSEN, D. M.; HANAGE, W. P.; SPRATT, B. G. eBURST: inferring patterns of evolutionary descent among clusters of related bacterial genotypes from multilocus sequence typing data. *Journal of Bacteriology*, v. 186, p. 1518–1530, 2004.

FENG, Y.; TIAN, W.; LIN, D.; LUO, Q.; ZHOU, Y.; YANG, T.; Deng, Y.; Liu, Y. -H.; Liu, J. -H. Prevalence and characterization of methicillin-resistant *Staphylococcus pseudintermedius* in pets from South China. *Veterinary Microbiology*, v. 160, p. 517–524., 2012.

FESSLER, A. T., KADLEC, K., HASSEL, M., HAUSCHILD, T., EIDAM, C., EHRLICH, R., & SCHWARZ, S. Characterization of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates from food and food products of poultry origin in Germany. *Applied and Environmental Microbiology*, v.77, n.20, p.7151-7157, 2011.

FITZGERALD, J. R.; PENADÉS, J. R. Staphylococci of animals, In J. A. Lindsay (ed.), *Staphylococcus: molecular genetics*. Caister Academic Press, Norfolk, United Kingdom. p. 255–269, 2008.

FITZGERALD, J. R. The *Staphylococcus intermedius* group of bacterial pathogens: species re-classification, pathogenesis and the emergence of meticillin resistance. *Veterinary Dermatology*, v. 20, p. 490–5, 2009.

FOSTER, T. J. Colonization and infection of the human host by staphylococci: adhesion, survival and immune evasion. *Veterinary Dermatology*, v. 20, 456–470, 2009.

FRANCISCO, A. P., VAZ, C., MONTEIRO, P. T., MELO-CRISTINO, J., RAMIREZ, M., & CARRIÇO, J. A. PHYLOViZ: phylogenetic inference and data visualization for sequence based typing methods. *BMC Bioinformatics*, v.13, n.1, p.1, 2012.

FRANK, L. A.; KANIA, S. A.; HNILICA, K. A.; WILKES, R. P.; BEMIS, D. A. Isolation of *Staphylococcus schleiferi* from dogs with pyoderma. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, v. 222, p. 451–454, 2003.

FRANK, L. A.; KANIA, S. A.; KIRZEDER, E. M.; EBERLEIN, L. C.; BEMIS, D. A. Risk of colonization or gene transfer to owners of dogs with meticillin-resistant *Staphylococcus pseudintermedius*. *Veterinary Dermatology*, v. 20, p. 496–501, 2009.

FRENEY, J.; KLOOS, W. E.; HAJEK, V.; WEBSTER, J. A. Recommended minimal standards for description of new staphylococcal species. *International Journal of Systematic Bacteriology*, v. 49, p. 489–502, 1999.

FRIEDRICH, C.; RODLOFF, A. C.; CHHATWAL, G. S.; SCHELLENBERGER, W.; ESCHRICH, K. Rapid identification of viridans streptococci by mass spectrometric discrimination. *Journal of Clinical Microbiology*, v. 45, p. 2392–2397, 2007.

FURIANI N, SCARAMPELLA F, MARTINO PA, PANZINI, I.; FABBRI, E.; ORDEIX, L. Evaluation of the bacterial microflora of the conjunctival sac of healthy dogs and dogs with atopic dermatitis. *Veterinary Dermatology*, v. 22, p. 490–496, 2011.

FUTAGAWA-SAITO, K.; SUZUKI, M.; OHSAWA, M.; OHSHIMA, S.; SAKURAI, N.; BA-THEIN, W.; FUKUYASU, T. Identification and prevalence of an enterotoxin-related gene, *se-int*, in *Staphylococcus intermedius* isolates from dogs and pigeons. *Journal of Applied Microbiology*, 96: 1361–1366, 2004.

FUTAGAWA-SAITO, K.; BA-THEIN, W.; SAKURAI, N.; FUKUYASU, T. Prevalence of virulence factors in *Staphylococcus intermedius* isolates from dogs and pigeons. *BMC Veterinary Research*, v. 2, n. 4, p. 1–5, 2006.

FUTAGAWA-SAITO, K.; MAKINO, S.; SUNAGA, F.; KATO, Y.; SAKURAI-KOMADA, N.; BA-THEIN, W.; FUKUYASU, T. Identification of first exfoliative toxin in *Staphylococcus pseudintermedius*. *FEMS Microbiology Letters*, v. 301, p. 176-180, 2009.

GARBACZ, K.; ZARNOWSKA, S.; PIECHOWICZ, L. HARAS, K. Pathogenicity potential of *Staphylococcus pseudintermedius* strains isolated from canine carriers and from dogs with infection signs. *Virulence*, v. 4, n. 3, p. 255–259, 2013.

GARCÍA-ÁLVAREZ, L., HOLDEN, M. T., LINDSAY, H., WEBB, C. R., BROWN, D. F., CURRAN, M. D., PARKHILL, J. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* with a novel *mecA* homologue in human and bovine populations in the UK and Denmark: a descriptive study. *The Lancet Infectious Diseases*, n.8, v.11, p. 595–603, 2011.

GEOGHEGAN, J. A.; SMITH, E. J.; SPEZIALE, P.; FOSTER, T. J. *Staphylococcus pseudintermedius* expresses surface proteins that closely resemble those from *Staphylococcus aureus*. *Veterinary Microbiology*, v. 138, p. 345–352, 2009.

GERSTADT, K.; DALY, J. S.; MITCHELL, M.; WESSOLOSSKY, M.; CHEESEMAN, S. H. Methicillin-resistant *Staphylococcus intermedius* pneumonia following coronary artery bypass grafting. *Clinical of Infectious Diseases*, v. 29, p. 218–219, 1999.

GHARSA, H.; SLAMA, K. B.; GÓMEZ-SANZ, E.; LOZANO, C.; KLIBI, N.; JOUINI, A.; MESSADI, L.; BOUDABOUS, A.; TORRES, C. Antimicrobial Resistance, Virulence Genes, and Genetic Lineages of *Staphylococcus pseudintermedius* in Healthy Dogs in Tunisia. *Microbial Ecology*, v. 66, p. 363–368, 2013.

GHEBREMEDHIN, B.; LAYER, F.; KÖNIG, W.; KÖNIG, B. Genetic classification and distinguishing of *Staphylococcus* species based on different partial gap, 16S rRNA, hsp60, rpoB, sodA, and tuf gene sequences. *Journal of Clinical Microbiology*, v. 46, p. 1019–1025, 2008.

GOERING, R. V. Pulsed field gel electrophoresis: a review of application and interpretation in the molecular epidemiology of infectious disease. *Infection, Genetics and Evolution*, n.7, v.10, p.866-875, 2010.

GÓMEZ-SANZ, E.; TORRES, C.; LOZANO, C.; FERNÁNDEZ-PÉREZ, R.; ASPIROZ, C.; RUIZ-LARREA, F.; ZARAZAGA, M. Detection, molecular characterization, and clonal diversity of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* CC398 and CC97 in Spanish slaughter pigs of different age groups. *Foodborne Pathogen Disease*, v. 7, n. 10, p. 1269-77, 2010.

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

GRIFFETH, G. C.; MORRIS, D. O.; ABRAHAM, J. L.; SHOFER, S. F.; RANKIN, S. C. Screening for skin carriage of methicillin-resistant coagulase-positive staphylococci and *Staphylococcus schleiferi* in dogs with healthy and inflamed skin. *Veterinary Dermatology*, v. 19, p. 142–149, 2008.

GRONTHAL, T.; OLLILAINEN, M.; EKLUND, M.; PIIPARINEN, H.; GINDONIS, V.; JUNNILA, J.; SAIJONMAA-KOULUMIES, L.; LIIMATAINEN, R.; RANTALA, M. Epidemiology of methicillin resistant *Staphylococcus pseudintermedius* in guide dogs in Finland. *Acta Veterinar Scandinavica*, v. 57:37, doi: 10.1186/s13028-015-0129-8, 2015.

GUARDABASSI, L.; O'DONOGHUE, M.; MOODLEY, A.; HO, J.; BOOST, M. Novel lineage of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Emerging Infectious Disease*, v. 15, p. 1998 – 2000, 2009.

GUARDABASSI, L.; DAMBORG, P.; STAMM, I.; KOPP, P. A; BROENS, E. M; TOUTAIN, P. -L. Diagnostic microbiology in veterinary dermatology: present and future. *Veterinary Dermatology*, v. 28, p. 146–e30, 2017.

HAENNI, M.; ALVES DE MORAES, N.; CHÂTRE, P.; MÉDAILLE, C.; MOODLEY, A.; MADEC, J. Y. Characterisation of clinical canine methicillin-resistant and methicillin-susceptible *Staphylococcus pseudintermedius* in France. *Journal of Global Antimicrobial Resistance*, v. 2, p. 119–123, 2014.

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

HAVERI, M.; HOVINEN, M.; ROSLOF, A.; PYORALA, S. Molecular Types and Genetic Profiles of *Staphylococcus aureus* Strains Isolated from Bovine Intramammary Infections and Extramammary Sites. *Journal of Clinical Microbiology*, v.46, n.11, p. 3728–3735, 2008.

HEILMANN, C.; PETERS, G. Biology and pathogenicity of *S. epidermidis*. In: Fischetti V.A.; Novick R. P.; Ferreti J. J.; Portnoy D. A.; Rood J. I. Gram-positive pathogens. Washington, D.C.: ASM Press, p. 442-449, 2000.

HIRAMATSU, K.; KATAYAMA, Y.; MATSUO, M.; SASAKI, T.; MORIMOTO, Y.; SEKIGUCHI, A.; BABA, T. Multi-drug-resistant *Staphylococcus aureus* and future chemotherapy. *Journal of Infectious Chemotherapy*, v. 20, n. 10, p. 593-601, 2014.

ILINA, E. N.; BOROVSKEYA, A. D.; MALAKHOVA, M. M. Direct bacterial profiling by matrix-assisted laser desorption-ionization time-of-flight mass spectrometry for identification of pathogenic *Neisseria*. *Journal of Molecular Diagnostics*, v. 11, p. 75–86, 2009.

International Working Group on the Staphylococcal Cassette Chromosome Elements (IWG-SCC). Classification of Staphylococcal Cassette Chromosome *mec* (SCC*mec*): Guidelines for Reporting Novel SCC*mec* Element. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v. 53, n. 12, p. 4961–4967, 2009.

International Working Group on the Staphylococcal Cassette Chromosome Elements (IWG-SCC). Disponível em [http://www.sccmec.org/Pages/SCC\\_aboutIWG-SCCEN.html](http://www.sccmec.org/Pages/SCC_aboutIWG-SCCEN.html). Acesso: Fev. 2018.

ISHIHARA, K.; SHIMOKUBO, N.; SAKAGAMI, A.; UENO, H.; MURAMATSU, Y.; KADOSAWA, T.; YANAGISAWA, C.; HANAOKI, H.; NAKAJIMA, C.; SUZUKI, Y.;

TAMURA, Y. Occurrence and molecular characteristics of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and methicillin-resistant *Staphylococcus pseudintermedius* in an academic veterinary hospital. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 76, p. 5165–5174, 2010.

ITO T; KATAYAMA Y.; ASADA K.; MORI N.; TSUTSUMIMOTO K.; TIENSASITORN C.; HIRAMATSU K. Structural comparison of three types of staphylococcal cassette chromosome *mec* integrated in the chromosome in methicillin-resistant *S. aureus*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v. 45, p. 1323-1336, 2001.

IYORI, K.; FUTAGAWA-SAITO, K.; HISATSUNE, J; YAMAMOTO, M.; SEKIGUCHI, M.; IDE, K.; SON, W. -G; OLIVRY, T.; SUGAI, M.; FUKUYASU, T.; IWASAKI, T.; NISHIFUJI, K. *Staphylococcus pseudintermedius* exfoliative toxin EX1 selectively digests canine desmoglein 1 and causes subcorneal clefts in canine epidermis. *Veterinary Dermatology*, v. 22, p. 319–326, 2011.

JARRAUD, S.; MOUGEL, C.; THIOULOUSE, J.; LINA, G.; MEUGNIER, H.; FOREY, F.; NESME, X.; ETIENNE, J.; VANDENESCH, F. Relationships between *Staphylococcus aureus* Genetic Background. *Infection and Immunity*, v. 70, n. 2, p. 631–641, 2002.

JEVONS, M. P. “Celbenin”- resistant staphylococci. *British Medical Journal*, v.124, p.124- 125, 1961.

KADLEC, K.; SCHWARZ, S.; PERRETEN, V.; ANDERSSON, U. G.; FINN, M.; GREKO, C.; MOODLEY, A.; KANIA, S. A.; FRANK, L. A.; BEMIS, D. A.; FRANCO, A.; IUCRESCIA, M.; BATTISTI, A.; DUJM, B.; WAGENAAR, J. A.; VAN DUJKEREN, E.; WEESE, J. S.; FITZGERALD, J. R.; ROSSANO, A.; GUARDABASSI, L. Molecular analysis of methicillin-resistant *Staphylococcus pseudintermedius* of feline origin from different European countries and North America. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, v. 65, n. 8, p. 1826–1828, 2010.

KADLEC, K.; SCHWARZ, S. Antimicrobial resistance of *Staphylococcus pseudintermedius*. *Veterinary Dermatology*, v. 23, p. 276–282, e255, 2012.

KANG, J. -H.; CHUNG, T. -H.; HWANG, C.-Y. CLONAL distribution of methicillin-resistant *Staphylococcus pseudintermedius* isolates from skin infection of dogs in Korea. *Veterinary Microbiology*, v. 210 (2017) 32–37, 2017.

KATAYAMA, Y.; ITO, T.; HIRAMATSU, K. Genetic organization of the chromosome region surrounding *mecA* in clinical staphylococcal strains: role of IS431-mediated *mecI* deletion in expression of resistance in *mecA*-carrying, low-level methicillin-resistant *Staphylococcus haemolyticus*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v. 45, n. 7, p. 1955-1963, 2001.

KELESIDIS, T.; TSIODRAS, S. *Staphylococcus intermedius* is not only a zoonotic pathogen, but may also cause skin abscesses in humans after exposure to saliva. *International Journal of Infectious Diseases*, v. 14, p. e838–e841, 2010.



KEMPKER, R.; MANGALAT, D.; KONGPHET-TRAN, T.; EATON, M. Beware of the pet dog: a case of *Staphylococcus intermedius* infection. *The American Journal of the Medical Sciences*, v. 338, p. 425–427, 2009.

KIKUCHI, K.; KARASAWA, T.; PIAO, C.; ITODA, I.; HIDAI, H.; YAMAURA, H.; MORIKAWA, T.; TAKAYAMA, M. Molecular confirmation of transmission route of *Staphylococcus intermedius* in mastoid cavity infection from dog saliva. *Journal of Infection and Chemotherapy*, v. 10, p. 46–48, 2004.

KIM, C.; MWANGI, M.; CHUNG, M.; MILHEIRIÇO, C.; DE LENCASTRE, H.; TOMASZ, A. The mechanism of heterogeneous beta-lactam resistance in MRSA: key role of the stringent stress response. *PLoS One*, 8:e82814, 2013.

KIM, C. K.; MILHEIRIÇO, C.; DE LENCASTRE, H.; TOMASZ, A. Antibiotic Resistance as a Stress Response: Recovery of High-Level Oxacillin Resistance in Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* "Auxiliary" (fem) Mutants by Induction of the Stringent Stress Response. *Antimicrobial Agents Chemotherapy*, v. 61, n. 8; e00313-17, 2017.

KIZERWETTER-SWIDA, M.; CHROBAK-CHMIEL, D.; RZEWUSKA, M.; BINEK, M. Changes in the population structure of canine methicillin-resistant *Staphylococcus pseudintermedius* in Poland. *Veterinary Microbiology*, v. 208, p. 106–109, 2017.

KONEMAN, E.W.; ALLEN, S.D.; JANDA, W.M.; SCHRECKENBERGER, P.C.; WINN, J.R. Diagnóstico Microbiológico. 6ª ed. Rio de Janeiro: Editora MEDS, 2008. 1760 p.

KONDO, Y.; ITO, T.; MA, X. X.; WATANABE, S.; KREISWIRTH, B. N.; ETIENNE, J.; HIRAMATSU, K. Combination of multiplex PCRs for staphylococcal cassette chromosome *mec* type assignment: rapid identification system for *mec*, *ccr*, and major differences in junkyard regions. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v. 51, p. 264–274, 2007.

LANGE, C.C.; BRITO, M.A.V.P; BRITO, J.R.F.; ARCURI, E.F.; SOUZA, G.N.; MACHADO, M.A.; DOMINGUES, R.; SALIMENA, A.P.S. Uso de PCR e sequenciamento do rDNA 16S para identificação de bactérias do gênero *Staphylococcus* isoladas de mastite bovina. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, v. 31, n. 1, p. 36-40, 2011.

LAUTZ, S.; KANBAR, T; ALBER, J. et al. Dissemination of the gene encoding exfoliative toxin of *Staphylococcus intermedius* among strains isolated from dogs during routine microbiological diagnostics. *Journal of Veterinary Medicine*, v. 53, p. 434–8, 2006.

LINA, G.; PIÉMONT, Y.; GODAIL-GAMOT, F.; BES, M.; PETER, M. -O.; GAUDUCHON, V.; VANDENESCH, F.; ETIENNE, J. Involvement of Pantone-Valentine Leukocidin-Producing *Staphylococcus aureus* in Primary Skin Infections and Pneumonia. *Clinical Infectious Diseases*, v. 25, n. 5, p. 1128–1132, 1999.

List of Prokaryotic Names with Standing in Nomenclature – Genus *Staphylococcus*. Disponível em <http://www.bacterio.net/staphylococcus.html>. Acesso em Jan 2014.

LEE J. *Staphylococcus intermedius* isolated from dog-bite wounds. *Journal of Infection*, v. 29, p. 105, 1994.

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

LEONARD F. C.; MARKEY B. K. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in animals: a review. *Veterinary Journal*, v.175, p.27–36, 2008.

LOEFFLER, A.; LINEK, M.; MOODLEY, A.; GUARDABASSIA, L.; SUNG, J. M. L.; WINKLER, M.; WEISS, R.; LLOYD, D. et al. First report of multiresistant, *mecA*-positive *Staphylococcus intermedius* in Europe: 12 cases from a veterinary dermatology referral clinic in Germany. *Veterinary Dermatology*, v. 18, p. 412–421, 2007.

LONGAUEROVA, A. Coagulase negative staphylococci and their participation in pathogenesis of human infections. *Bratislava Medical Journal*, v. 107, p. 448-452, 2006.

LOWY, F.D. Antimicrobial resistance: the example of *Staphylococcus aureus*. *Journal of Clinical Investigation*, v. 111, n. 9, p.1265-1273, 2003.

MCCARTHY, H.; RUDKIN, J. K.; BLACK, N. S; GALLAGHER, L.; O'NEILL, E.; O'GARA, J. P. Methicillin resistance and the biofilm phenotype in 84 *Staphylococcus aureus*. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, v. 5, 1, 2015.

MAGIORAKOS A.-P., SRINIVASAN A., CAREY R. B., CARMELI, Y., FALAGAS, M. E., GISKE, C. G., HARBARTH, S., HINDLER, J. F., KAHLMETER, G., OLSSON-LILJEQUIST, B., PATERSON, D. L., RICE, L. B., STELLING, J., STRUELENS, M. J., VATOPOULOS, A., WEBER, J. T., MONNET, D. L. Multidrug-resistant, extensively drug-resistant and pandrug-resistant bacteria: an international expert proposal for interim standard definitions for acquired resistance. *Clinical of Microbiology Infection*, v. 18, p. 268–281, 2012.

MAIDEN, M. C.; BYGRAVES, J. A.; FEIL, E.; MORELLI, G.; RUSSELL, J. E.; URWIN, R.; Multilocus sequence typing: a portable approach to the identification of clones within populations of pathogenic microorganisms. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, v.95, n.6, p.3140-5, 1998.

MARQUES, V, F. *Expressão gênica na formação do biofilme e resistência aos beta-lactâmicos em isolados de Staphylococcus aureus provenientes de leite mastítico bovino*. 2016. Tese (Doutorado em Ciências Veterinárias) – Instituto de Parasitologia Animal, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica. 2016.

MARQUES, V, F.; SOUZA, M. M. S.; MENDONÇA, E. C. L.; ALENCAR, T. A.; PRIBUL, B. R.; COELHO, S. M. O.; LASAGNO, M.; REINOSO, E. B. Análise fenotípica e genotípica da virulência em *Staphylococcus* spp. e de sua dispersão clonal como contribuição ao estudo da

mastite bovina em regiões do Estado do Rio de Janeiro. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, v. 33, n. 2, p. 161-170, 2013.

MARKEY, B. Clinical Veterinary Microbiology. In: MARKEY, B., LEONARD, F., ARCHAMBAULT, M., CULLINANE, A., MAGUIRE, D. (2nd ed.), *Mosby Elsevier*, London, pp. 105-119, 2013.

MAY, E. R.; HNILICA, K. A.; FRANK, L. A.; JONDX, R. D.; BEMIS, D. A. et al. Isolation of *Staphylococcus schleiferi* from healthy dogs and dogs with otitis, pyoderma, or both. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, v. 227, p. 928–931, 2005.

MELLES DC, GORKINK RFJ, BOELEN HAM, SNIJDERS SV, PEETERS JK, MOORHOUSE MJ, VAN DER SPEK PJ, VAN LEEUWEN WB, SIMONS G, VERBRUGH HA, VAN BELKUM A. Natural population dynamics and expansion of pathogenic clones of *Staphylococcus aureus*. *Journal of Clinical Investigation*, v.114, p.1732–1740, 2004.

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

MELTER, O.; SVEC, P.; TKADLEC, J.; DOSKAR, J.; KINSKA, H.; PANTUCEK, R. Characterisation of methicillin-susceptible *Staphylococcus pseudintermedius* isolates from canine infections and determination of virulence factors using multiplex PCR. *Veterinarni Medicina*, v. 62, p. 81–89, 2017.

MILHEIRIÇO, C.; OLIVEIRA, D. C.; DE LENCASTRE, H. Update to the Multiplex PCR Strategy for Assignment of *mec* Element Types in *Staphylococcus aureus*. *Antimicrobial Agents Chemotherapy*, v. 51, p. 3374–3377, 2007.

MOODLEY, A.; STEGGER, M.; ZAKOUR, N.L.B.; FITZGERALD, J.R.; GUARDABASSI, L. Tandem repeat sequence analysis of staphylococcal protein A (*spa*) gene in methicillin-resistant *Staphylococcus pseudintermedius*. *Veterinary Microbiology*, v. 135, p. 320-3226, 2009.

MORRIS, D.O.; ROOK, K.A.; SHOFER, F.S.; RANKIN, S.C. Screening of *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus intermedius* and *Staphylococcus schleiferi* isolates obtained from small companion animals for antimicrobial resistance: a retrospective review of 749 isolates (2003–04). *Veterinary Dermatology*, v. 17, p. 332–337, 2006.

MURUGAIYAN, J.; WALTHER, B.; STAMM, I.; ABOU-ELNAGA, Y.; BRUEGGEMANN-SCHWARZE, S.; VINCZE, S; WIELER, L. H.; LÜBKE-BECKE, A.; SEMMLER, T; ROESLER, U. et al. Species differentiation within the *Staphylococcus intermedius* group using a refined MALDI-TOF MS database. *Clinical Microbiology and Infection*, v. 20, p. 1007– 1015, 2014.

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

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

NORSTRÖM, M.; SUNDE, M.; THARALDSEN, H.; MØRK, T.; BERGSJØ, B.; KRUSE, H. Antimicrobial Resistance in *Staphylococcus pseudintermedius* in the Norwegian Dog Population. *Microbial Drug Resistance*, v. 15, n. 1, p. 55-59, 2009

NAGY, E.; MAIER, T.; URBAN, E.; TERHES, G.; KOSTRZEWA, M. Species identification of clinical isolates of bacteroides by matrix-assisted laserdesorption/ionization time-of-flight mass spectrometry. *Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases*, v. 15, p. 796–802, 2009.

OLIVEIRA, G. A.; FARIA, J. B.; LEVY, C. E.; LEVYAND, C. E.; MAMIZUKA, E. M. Characterization of the Brazilian endemic clone of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) from hospitals throughout Brazil. *Brazilian Journal of Infectious Disease*, v. 5, p. 163–170, 2001.

OSLAND, A. M.; VESTBY, L. K.; FANUELSEN, H.; SLETTEMEAS, J. S.; SUNDE, M. Clonal diversity and biofilm-forming ability of methicillin-resistant *Staphylococcus pseudintermedius*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, v. 67, p. 841–848, 2012.

OTTO, M. Staphylococcal infections: mechanisms of biofilm maturation and detachment as critical determinants of pathogenicity. *Annual Review of Medicine*, v. 64, p.175–88, 2013.

PANTOSTI, A. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* associated with animals and its relevance to human health. *Frontiers in Microbiology*, v. 3, p. 127, 2012.

PARDOS DE LA GANDARA, M.; BORGES, V.; CHUNG, M.; MILHEIRIÇO, C.; GOMES, J. P.; DE LENCASTRE, H.; TOMASZ, A. Genetic determinants of high-level oxacillin resistance in MRSA. *Antimicrobial Agents Chemotherapy*, AAC Accepted Manuscript Posted Online 19 March, doi:10.1128/AAC.00206-18, 2018.

PEHLIVANOGLU, F.; YARDIMCI, H. Detection of methicillin and vancomycin resistance in *Staphylococcus* strains isolated from bovine milk samples with mastitis. *Kafkas Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, v. 18, n. 5, p.849-855, 2012.

PENNA, B.; MENDES, W.; RABELLO, R. F.; LILENBAUM, W. Isolation of methicillin-resistant staphylococci in canine skin infections in Rio de Janeiro, Brazil. *Veterinary Dermatology*, v. 1, p. n/a, 2013.

PÉREZ-LOSADA, M., CABEZAS, P., CASTRO-NALLAR, E.; CRANDALL, K. A. Pathogen typing in the genomics era: MLST and the future of molecular epidemiology. *Infection, Genetics and Evolution*, v.16, p.38-53, 2013.

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

PERRETEEN, V.; CHANCHAITHONG, P.; PRAPASARAKUL, N.; ROSSANO, A.; BLUM, S. E.; ELAD, D.; SCHWENDENER, S. Novel pseudo-staphylococcal cassette chromosome *mec* element ( $\psi$ SCC*mec*57395) in methicillin-resistant *Staphylococcus pseudintermedius* CC45. *Antimicrobial Agents Chemotherapy*, v. 57, p. 5509–5515, 2013.

PIETROCOLA, G.; GIANOTTI, V.; RICHARDS, A.; NOBILE, G.; GEOGHEGAN, J. A.; RINDI, S.; MONK, I. R.; C BORDT, A. S.; FOSTER, T. J.; FITZGERALD, R.; SPEZIALE, P. Fibronectin Binding Proteins SpsD and SpsL Both Support Invasion of Canine Epithelial Cells by *Staphylococcus pseudintermedius*. *Infection and Immunity*, v. 83, p. 4093–4102

PIGNONE, M.; GRETH, K. M.; COOPER, J.; EMERSON, D.; TANG, J. Identification of mycobacteria by matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry. *Journal of Clinical Microbiology*, v. 44, p. 1963–1970, 2006.

PILLA, R.; BONURA, C.; MALVISI, M.; SNEL, G. G. M.; PICCININI, R. Methicillin-resistant *Staphylococcus pseudintermedius* as causative agent of dairy cow mastitis. *Veterinary Record*, v. 173, n. 1, p. 19, doi: 10.1136/vr.101485, 2013.

POMBA, C.; COUTO, N.; MOODLEY, A. Treatment of a lower urinary tract infection in a cat caused by a multi-drug methicillin-resistant *Staphylococcus pseudintermedius* and *Enterococcus faecalis*. *J. Feline Medicine Surgery*, v. 12, 802–806, 2010.

POMBA, C.; RANTALA, M.; GREKO, C.; BAPTISTE, K. E.; CATRY, B.; VAN DUIJKEREN, E.; MATEUS, A.; MORENO, M. A.; PYORÄLÄ, S.; RUŽAUSKAS, M.; SANDERS, P.; TEALE, C.; THRELFALL, E. J.; KUNSAGI, Z.; TORRENEDO, J.; JUKES, H.; TÖRNEKE, K. Public Health Risk of Antimicrobial Resistance Transfer from Companion Animals. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, v. 72, n. 4, p. 957–968, 2017.

POMPILIO, A.; DE NICOLA, S.; CROCETTA, V.; GUARNIERI, S.; SAVINI, V.; CARRETTO, E.; DI BONAVENTURA, G. New insights in *Staphylococcus pseudintermedius* pathogenicity: antibiotic-resistant biofilm formation by a human wound-associated strain. *BMC Microbiology*, 15:109, 2015.

POTTUMARTHY, S.; SCHAPIRO, J. M.; PRENTICE, J. L.; HOUZE, Y. B.; SWANZY, S. R., FANG, F. C.; COOKSON, B. T. Clinical isolates of *Staphylococcus intermedius* masquerading as methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Journal of Clinical Microbiology*, v. 42, p. 5881–5884, 2004.

QUITOCO, I. M. Z.; RAMUNDO, M. S.; SILVA-CARVALHO, M. C.; SOUZA, R. R.; BELTRAME, C. O.; DE OLIVEIRA, T. F.; ARAÚJO, R.; DEL PELOSO, P. F.; COELHO, L. R.; FIGUEIREDO, A. M. (2013). First report in South America of companion animal colonization by the USA1100 clone of community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (ST30) and by the European clone of methicillin-resistant *Staphylococcus pseudintermedius* (ST71). *BMC Research Notes*, 6:336, doi: 10.1186/1756-0500-6-336, 2013.

RANJBAR, R., KARAMI, A., FARSHAD, S., GIAMMANCO, G. M., & MAMMINA, C. Typing methods used in the molecular epidemiology of microbial pathogens: a how-to guide. *The new microbiologica*, v.1, n.37, p.1-15, 2014.

RAUS, J.; LOVE, D. N. Characterization of coagulase-positive *Staphylococcus intermedius* and *Staphylococcus aureus* isolated from veterinary clinical specimens. *Journal of Clinical Microbiology*, v. 18, p. 789–792, 1983.

RIEGEL, P.; JESEL-MOREL, L.; LAVENTIE, B.; BOISSET, S.; VANDENESCH, F.; PRÉVOST, G. Coagulase-positive *Staphylococcus pseudintermedius* from animals causing human endocarditis. *International Journal of Medical Microbiology*, v. 301, p. 237–239, 2011.

RILEY, M. C. *Whole Genome Sequencing as a Tool for Identifying Phenotypic Properties and Underlying Genetic Mechanisms in Staphylococcus pseudintermedius*. 2016. Tese (Doutorado), University of Tennessee, EUA. Disponível em: [http://trace.tennessee.edu/utk\\_graddiss/4110](http://trace.tennessee.edu/utk_graddiss/4110)

REISCHL, U.; FRICK, J.; HOERMANSDORFER, S.; MELZL, H.; BOLLWEIN, M.; LINDE, H. J.; BECKER, K.; KÖCK, R.; TUSCHAK, C.; BUSCH, U.; SING, A. Single- nucleotide polymorphism in the *SCCmec-orfX* junction distinguishes between livestock- associated MRSA CC398 and human epidemic MRSA strains. *Euro Surveillace*, v. 49, p. 11-18, 2009.

ROBERTS MC. Update on macrolide-lincosamide-streptogramin, ketolide, and oxazolidinone resistance genes. *FEMS Microbiology Letters*, v. 282, p. 147–59, 2008.

RUSCHER, C; A, LUBKE-BECKER, A; SEMMLER, T.; WLEKLINSKI, C.-G.; PAASCH, A.; SOBA, A.; STAMM, I.; KOPP, P.; WIELER, L. H.; WALTHER, B. Widespread rapid emergence of a distinct methicillin- and multidrug-resistant *Staphylococcus pseudintermedius* (MRSP) genetic lineage in Europe. *Veterinary Microbiology*, v. 144, p. 340–346, 2010.

SALGADO, B. A. B. *Identificação molecular e caracterização da resistência à mupirocina de cepas de Staphylococcus spp. de origem canina*. 2013. Dissertação (Mestrado em Ciências – Microbiologia) – Instituto de Microbiologia Paulo de Góes, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro. 2013.

SASAKI, T.; KIKUCHI, K.; TANAKA, Y; TAKAHASHI, N.; KAMATA, S.; HIRAMATSU, K. Methicillin-resistant *Staphylococcus pseudintermedius* in a veterinary teaching hospital. *Journal of Clinical Microbiology*, v. 45, p. 1118–1125, 2007a.

SASAKI, T.; KIKUCHI, K.; TANAKA, Y.; TAKAHASHI, N.; KAMATA, S.; HIRAMATSU, K. Reclassification of phenotypically identified *Staphylococcus intermedius* strains. *Journal of Clinical Microbiology*, v. 45, p. 2770–2778, 2007b.

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.

SCHWARZ, S.; KADLEC, K.; STROMMENGER, B. Methicillin- resistant *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus pseudintermedius* detected in the BfT-GermVet monitoring programme 2004-2006 in Germany. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, v. 61, p. 282–285, 2008.

SCHWARTZ, D. C., & CANTOR, C. R. Separation of yeast chromosome-sized DNAs by pulsed field gradient gel electrophoresis. *Cell*, n.1, v.37, p.67-75, 1984.

SINGH, A.; WALKER, M.; ROUSSEAU, J.; WEESE, J. S. Characterization of the biofilm forming ability of *Staphylococcus pseudintermedius* from dogs. *BMC Veterinary Research*, v. 9, n. 93, p. 1–6, 2013.

SOARES, L. C.; PEREIRA, I. A.; COELHO, S. M. O.; CUNHA, C. M. M.; OLIVEIRA, D. F. B.; MIRANDA, A. F.; SOUZA, M. M. S. Caracterização fenotípica da resistência a antimicrobianos e detecção do gene *mecA* em *Staphylococcus* spp. coagulase-negativos isolados de amostras animais e humanas. *Ciência Rural*, v. 38, n. 5, p. 1346-1350, 2008.

SOARES, L.C. *Correlação entre marcadores fenotípicos e genotípicos de virulência e resistência à oxacilina em Staphylococcus spp. coagulase-negativos isolados a partir de mastite bovina*. 2010. Tese (Doutorado em Ciências Veterinárias). Instituto de Veterinária, Departamento de Parasitologia Animal, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2010.

SOARES, L.C. *Aplicação de técnicas moleculares para o monitoramento da diversidade genética de Staphylococcus aureus em ambientes de produção leiteira*. 2017. Tese (Doutorado em Ciências Veterinárias). Instituto de Veterinária, Departamento de Parasitologia Animal, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2017.

SOLYMAN, S. M.; BLACK, C. C.; DUIM, B.; PERRETEN, V.; VAN DUIJKEREN, E.; WAGENAAR, J. A.; EBERLEIN, L. C.; SADEGHI, L. N.; VIDELA, R.; BEMIS, D. A.; KANIA, S. A. Multilocus Sequence Typing for Characterization of *Staphylococcus pseudintermedius*. *Journal of Clinical Microbiology*, v. 51, n. 1, p. 306–310, 2013.

SOMAYAJI, R.; RUBIN, J. E.; PRIYANTHA, M. A. R.; CHURCH, D. Exploring *Staphylococcus pseudintermedius*: an emerging zoonotic pathogen? *Future Microbiology*, v. 11, n. 11, ISSN 1746-0913, 2016.

SPOOR, L. E.; MCADAM, P. R.; WEINERT, L. A.; RAMBAUT, A.; HASMAN, H.; AARESTRUP, F. M.; KEARNS, A. M. Livestock origin for a human pandemic clone of community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Mbio*, v. 4, n. 4, p.1-6, 2013.

SPRATT, B. G. Exploring the concept of clonality in bacteria. *Genomics, Proteomics, and Clinical Bacteriology: Methods and Reviews*, p. 323-352, 2004.

STEGGER, M.; ANDERSEN, P. S.; KEARNS, A.; PICHON, B.; HOLMES, M. A.; EDWARDS, G.; LAURENT, F.; TEALE, C.; SKOV, R.; LARSEN, A. R. Rapid detection, differentiation and typing of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* harbouring either *mecA* or the new *mecA* homologue *mecA<sub>LGA251</sub>*. *Clinical Microbiology and Infection*, v. 18, p. 395–400, 2011.

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

STEPANOVIC, S.; VUKOVIC, D.; HOLA, V.; BONAVENTURA, G.; DJUKIC, S.; IRKOVIC, I.C.; RUZICKA, F. Quantification of biofilm in microtiter plates: overview of testing conditions and practical recommendations for assessment of biofilm production by staphylococci. *APMIS*, v. 71, n. 5, p. 687-690, 2007.

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.

STROMMENGER, B.; BRAULKE, C.; HEUCK, D.; SCHMIDT, C.; PASEMANN, B.; NÜBEL, U.; WITTE, W. *spa* typing of *Staphylococcus aureus* as a frontline tool in epidemiological typing. *Journal of Clinical Microbiology*, v. 46, p. 574–81, 2008.

TALAN, D. A.; GOLDSTEIN, E. J.; STAATZ, D.; OVERTURF, G. D. *Staphylococcus intermedius*: clinical presentation of a new human dog bite pathogen. *Annals of Emergency Medicine*, V. 18, p. 410–413, 1989.

TAPONEN, S.; SUPRÉ, K.; PIESSENS, V. VAN COILLIE, E.; DE VLIEDHER, S.; KOORT, J. M. K. *Staphylococcus agnetis* sp. nov., a coagulase variable species from bovine subclinical and mild clinical mastites. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, v. 62, p. 61-65, 2012.

TANNER, M. A.; EVERETT, C. L.; YOUVAN, D. C. Molecular phylogenetic evidence for noninvasive zoonotic transmission of *Staphylococcus intermedius* from a canine pet to a human. *Journal of Clinical Microbiology*, v. 38, p. 1628–1631, 2000.

TENOVER, F. C.; ARBEIT, R. D.; GOERING, R. V.; MICKELSEN, P. A.; MURRAY, B. E.; PERSING, D. H.; SWAMINATHAN, B. Interpreting Chromosomal DNA Restriction Patterns Produced by Pulsed-Field Gel Electrophoresis: Criteria for Bacterial Strain Typing. *Journal of Clinical Microbiology*, v. 33, n. 9, pp. 2233–2239, 1995.



TENOVER, F. C., ARBEIT, R. D., & GOERING, R. V. How to select and interpret molecular strain typing methods for epidemiological studies of bacterial infections a review for healthcare epidemiologists. *Infection Control & Hospital Epidemiology*, n.6, v.18, p.426-439, 1997.

TERAUCHI, R.; SATO, H.; HASEGAWA, T.; YAMAGUCHI, T.; AIZAWA, C.; MAEHARA, N. Isolation of exfoliative toxin from *Staphylococcus intermedius* and its local toxicity in dogs. *Veterinary Microbiology*, v. 94, p. 19–29, 2003a.

TERAUCHI, R.; SATO, H.; ENDO, Y.; AIZAWA, C.; MAEHARA, N. Cloning of the gene coding for *Staphylococcus intermedius* exfoliative toxin and its expression in *Escherichia coli*. *Veterinary Microbiology*, v. 94, p. 31–38, 2003b.

TURLEJ, A; HRYNIEWICZ, W.; EMPEL, J. Staphylococcal Cassette Chromosome *mec* (SCC*mec*) Classification and Typing Methods: an Overview. *Polish Journal of Microbiology*, v. 60, n. 2, p. 95–103, 2011.

VANDENESCH, F.; CELARD, M.; ARPIN, D.; BES, M.; GREENLAND, T.; ETIENNE, J. et al. Catheter-related bacteremia associated with coagulase-positive *Staphylococcus intermedius*. *Journal of Clinical Microbiology*, v. 33, p. 2508–2510, 1995.

VAN HOOVELS L.; VANKEERBERGHEN, A.; BOEL, A.; VAN VAERENBERGH, K.; DE BEENHOUWER, H. First case of *Staphylococcus pseudintermedius* infection in a human. *Journal of Clinical Microbiology*, v. 44, p. 4609–4612, 2006.

VELASCO, V.; BUYUKCANGAZ, E.; SHERWOOD, J.S.; STEPAN, R.M.; KOSLOFSKY, R.J.; LOGUE, C.M. Characterization of *Staphylococcus aureus* from Humans and a Comparison with Isolates of Animal Origin, in North Dakota, United States. *PLoS ONE*, 10(10): e0140497. doi:10.1371/journal.pone.0140497, 2015.

VENGUST, M.; ANDERSON, M.E.; ROUSSEAU, J.; WEESE, J.S. Methicillin-resistant staphylococcal colonization in clinically normal dogs and horses in the community. *Letters in Applied Microbiology*, v. 43, p. 602–606, 2006.

VENTOLA, C. L. The Antibiotic Resistance Crisis Part 1: Causes and Threats. *Pharmacy and Therapeutics*, v. 40, n. 4, p. 277–283, 2015.

VIDELA, R.; SOLYMAN, S. M.; BRAHMBHATT, A.; SADEGHI, L.; BEMIS, D. A.; KANIA, S. A. Clonal Complexes and Antimicrobial Susceptibility Profiles of *Staphylococcus pseudintermedius* Isolates from Dogs in the United States. *Microbial Drug Resistance*, v. 00, n. 00, doi: 10.1089/mdr.2016.0250, 2017.

VON EIFF, C.; JANSEN, B.; KOHNENE, W.; BECKER, K. Infections associated with medical devices, pathogenesis, management and prophylaxis. *Drugs*, v. 65, p. 179–214, 2005.

VOS, M.; DIDELOT, X. A comparison of homologous recombination rates in bacteria and archaea. *The ISME Journal*, v. 3, p. 199–208, 2009.

VOYTENKO, A. V.; KANBAR, T.; ALBER, J.; LÄMMLER, C.; WEISS, R.; PRENGER-BERMINGHOFF, E.; ZSCHÖCK, M.; AKINEDEN, Ö.; HASSAN, A. A.; DMITRENKO, O. A. Identification of *Staphylococcus hyicus* by polymerase chain reaction mediated amplification of species specific sequences of superoxide dismutase A encoding gene sodA. *Veterinary Microbiology*, v. 116, p. 211-216, 2006.

WALTHER, B.; HERMES, J.; CUNY, C.; WIELER, L.H.; VINCZE, S.; ABOU ELNAGA, Y.; STAMM, I.; KOPP, P. A.; KOHN, B.; WITTE, W.; JANSEN, A.; CONRATHS, F. J.; SEMMLER, T.; ECKMANNS, T.; LUEBKE-BECKER, A. Sharing more than friendship – nasal colonization with coagulase-positive staphylococci (CPS) and co-habitation aspects of dogs and their owners. *PLoS One*, v. 7, e35197, 2012.

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

WEESE, J. S. Staphylococcal control in the veterinary hospital. *Veterinary Dermatology*, v. 23, p. 292-e58, 2012.

WETTSTEIN, K.; DESCLOUX, S.; ROSSANO, A.; PERRETEN, V. Emergence of methicillin-resistant *Staphylococcus pseudintermedius* in Switzerland: three cases of urinary tract infections in cats. *Schweizer Archiv Fur Tierheilkunde*, v. 150, p. 339–43, 2008.

WLADYKA, B.; BISTA, M.; SABAT, A. J.; BONAR, E.; GRZESZCZUK, S.; HRYNIEWICZ, W.; DUBIN, A. A novel member of the thermolysin family, cloning and biochemical characterization of metalloprotease from *Staphylococcus pseudintermedius*. *Acta Biochimica Polonica*, v. 55, p. 525–536, 2008.

WORTHING, K. A.; ABRAHAMB, S.; COOMBS, G. W.; PANG, S.; SAPUTRA, S.; JORDAN, D.; TROTT, D. J.; NORRIS, J. M. Clonal diversity and geographic distribution of methicillin-resistant *Staphylococcus pseudintermedius* from Australian animals: Discovery of novel sequence types. *Veterinary Microbiology*, v. 213, p. 58–65, 2018.

YAMAGUCHI, T.; NISHIFUJI, K.; SASAKI, M.; FUDABA, Y.; AEPFELBACHER, M.; TAKATA, T.; OHARA, M.; KOMATSUZAWA, H.; AMAGAI, M.; SUGAI, M. Identification of the *Staphylococcus aureus* etd Pathogenicity Island Which Encodes a Novel Exfoliative Toxin, ETD, and EDIN-B. *Infection and Immunity*, v. 70, n. 10, p. 5835–5845, 2002.

YOON, J. W.; LEE, G. -J.; LEE, S. -Y.; PARK, C.; YOO, J. -H.; PARK, H. -M. Prevalence of genes for enterotoxins, toxic shock syndrome toxin 1 and exfoliative toxin among clinical isolates of *Staphylococcus pseudintermedius* from canine origin. *Veterinary Dermatology*, v. 21, p. 484–489, 2010.

ZADOKS, R. N.; WATTS, J. L. Species identification of coagulase-negative staphylococci: Genotyping is superior to phenotyping. *Veterinary Microbiology*, v. 134, p. 20–28, 2009.

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.

ZHANG, K.; MCCLURE, J. A.; ELSAYED, S.; LOUIE, T.; CONLY, J. M. Novel multiplex PCR assay for characterization and concomitant subtyping of staphylococcal cassette chromosome *mec* types I to V in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Journal of Clinical Microbiology*, v. 43, p. 5026–5033, 2005.

## ANEXOS

### ANEXO A – Código, origem dos isolados, sítios de infecção e tipos de amostras.

Código do Isolado (UFRRJ)	Código do Isolado (ISU)	Origem	Espécie	Raça	Sexo	Idade	Sítio de infecção	Amostra
C6	8.61.3	HVPA/UFRRJ	Cão	Pinscher	F	NI	Osso	Fragmento ósseo
C8	8.61.5	HVPA/UFRRJ	Cão	Pastor Alemão	F	11 anos	Líquido sinovial	Líquido sinovial
C9	8.61.6	HVPA/UFRRJ	Gato	PCB	M	6 anos	Trato urinário	Urina
C10	8.61.7	HVPA/UFRRJ	Cão	NI	NI	NI	Trato urinário	Urina
C11	8.61.8	HVPA/UFRRJ	Cão	Poodle	F	11 anos	Pele	“Swab” cutâneo
C14	8.61.9	HVPA/UFRRJ	Cão	SRD	M	4 anos	Ouvido	“Swab” otológico
C16	8.61.10	HVPA/UFRRJ	Cão	SRD	F	2 anos	Osso	Swab de foco de fratura
C17p	8.61.11	HVPA/UFRRJ	Cão	Poodle	F	11 anos	Ouvido	“Swab” otológico
C19	8.61.13	HVPA/UFRRJ	Gato	NI	F	2 meses	Trato urinário	Urina
C20	8.61.14	HVPA/UFRRJ	Cão	NI	M	1 mês	Pele	“Swab” cutâneo
C21	8.61.15	HVPA/UFRRJ	Gato	SRD	NI	NI	Pele	Fragmento cutâneo
C22	8.61.16	HVPA/UFRRJ	Cão	Poodle	F	NI	Útero	Punção uterina
C24	8.61.17	HVPA/UFRRJ	Cão	Cocker Spaniel	F	9 anos	Ouvido	“Swab” otológico
C25	8.61.18	HVPA/UFRRJ	Cão	Pitt Bull	F	4 meses	Pele	“Swab” cutâneo
C27	8.61.19	HVPA/UFRRJ	Cão	Poodle	M	5 anos	Pele	“Swab” cutâneo
C28	8.61.20	HVPA/UFRRJ	Cão	Labrador	F	3 anos	Pele	“Swab” cutâneo
C29	8.61.21	HVPA/UFRRJ	Cão	Beagle	F	NI	Pele	Fragmento cutâneo
C33	8.61.22	HVPA/UFRRJ	Gato	SRD	M	3 anos	Trato urinário	Urina
C34	8.61.23	HVPA/UFRRJ	Cão	Pug	F	9 meses	Pele	“Swab” cutâneo
C35	8.61.24	HVPA/UFRRJ	Cão	Sharpei	F	2 meses	Vagina	“Swab” vaginal
C36	8.61.25	HVPA/UFRRJ	Cão	SRD	F	10 anos	Pele	“Swab” cutâneo
C37	8.61.26	HVPA/UFRRJ	Cão	Pug	F	4 anos e 6 meses	Ouvido	“Swab” otológico
C38	8.61.27	HVPA/UFRRJ	Cão	Pinscher	M	10 anos	Pele	“Swab” cutâneo
C40	8.61.28	HVPA/UFRRJ	Cão	Boxer	F	4 anos	Pele	“Swab” cutâneo

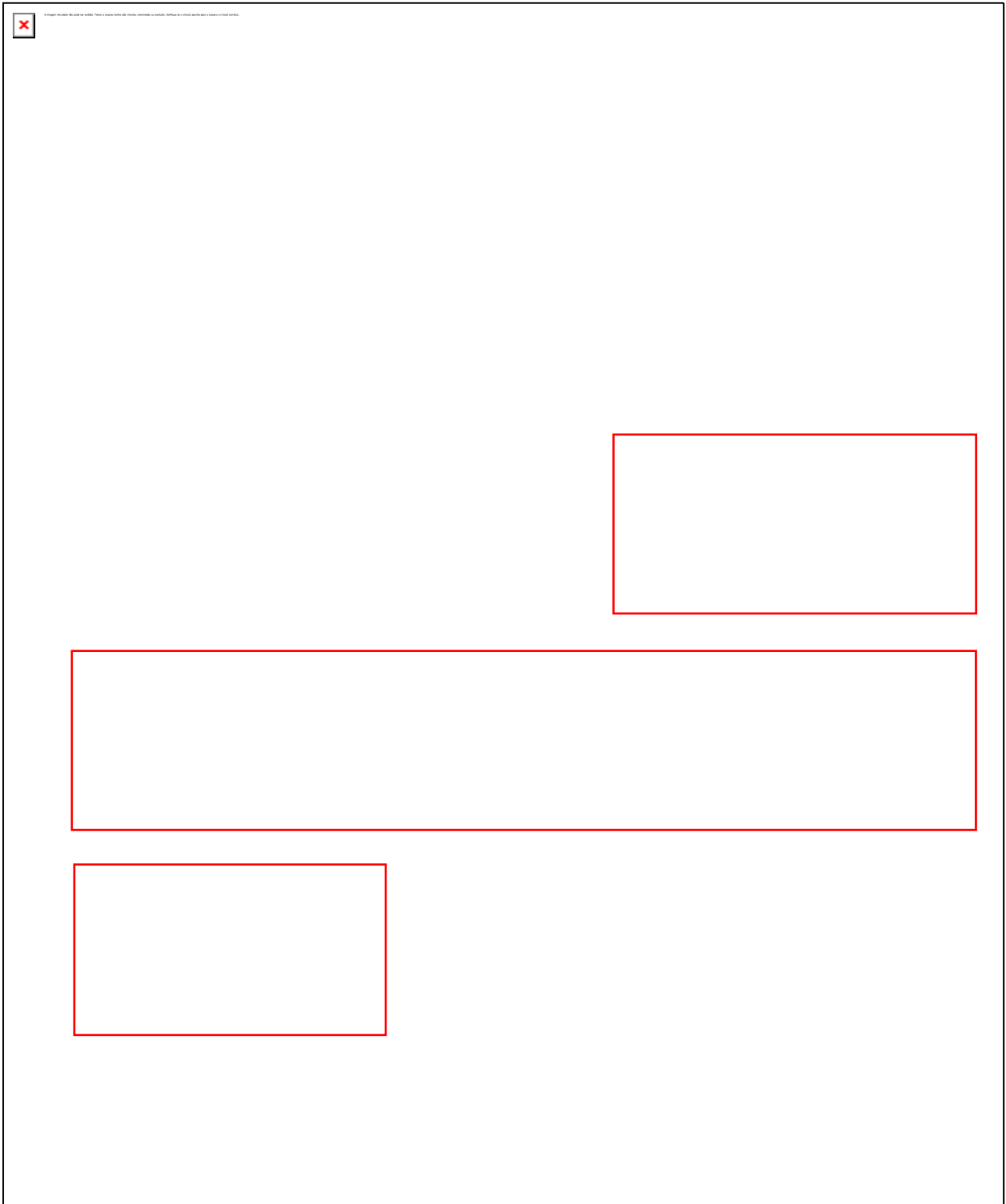
C41	8.61.29	HVPA/UFRRJ	Cão	Pug	F	1 ano e 7 meses	Pele	"Swab" cutaneo
C44	8.61.30	HVPA/UFRRJ	Cão	SRD	F	6 anos	Pele	Abscesso
C45	8.61.31	HVPA/UFRRJ	Cão	Bulldog Francês	F	2 anos	Pele	"Swab" cutaneo
C46	8.61.32	HVPA/UFRRJ	Cão	Teckel	M	2 anos	Pele	"Swab" cutaneo
C47	8.61.33	HVPA/UFRRJ	Cão	SRD	F	5 anos	Pele	"Swab" cutaneo
C48	8.61.34	HVPA/UFRRJ	Cão	Pitt Bull	F	9 anos	Pele	Fragmento cutâneo
C50	8.61.35	HVPA/UFRRJ	Cão	Poodle	F	5 anos	Pele	"Swab" cutaneo
C52	8.61.36	HVPA/UFRRJ	Cão	Bulldog Inglês	F	7 anos	Pele	"Swab" cutâneo
C55	8.61.37	HVPA/UFRRJ	Cão	Bulldog Francês	F	2 anos	Pele	"Swab" cutaneo
C56	8.61.38	HVPA/UFRRJ	Cão	Bulldog	F	10 anos	Pele	Secreção purulenta de joelho
C57	8.61.39	HVPA/UFRRJ	Gato	PCB	M	4 anos	Trato urinário	Urina
C58	8.61.40	HVPA/UFRRJ	Cão	Pitt Bull	M	11 anos	Fragmento de nódulo	Fragmento de nódulo
C59	8.62.1	HVPA/UFRRJ	Cão	Golden Retriever	F	5 anos	Pele	"Swab" cutaneo
C60	8.62.2	HVPA/UFRRJ	Cão	Bulldog	F	10 anos	Pele	"Swab" de ferida
C61	8.62.3	HVPA/UFRRJ	Gato	SRD	M	1 ano e 3 meses	Trato urinário	Urina e coágulo
C63	8.62.4	HVPA/UFRRJ	Cão	NI	F	6 anos	Ouvido	"Swab" otologico
C65	8.62.5	HVPA/UFRRJ	Cão	Pastor Alemão	M	3 meses	Pulmão	Secreção pulmonar
C66	8.62.6	HVPA/UFRRJ	Cão	SRD	M	11 anos	Ouvido	"Swab" otológico
C67	8.62.7	HVPA/UFRRJ	Cão	Golden Retriever	F	5 anos	Pele	"Swab" cutaneo
C70	8.62.8	HVPA/UFRRJ	Gato	SRD	F	8 meses	Trato urinário	Urina
C72	8.62.9	HVPA/UFRRJ	Cão	SRD	M	13 anos	Ouvido	"Swab" otologico
C73	8.62.10	HVPA/UFRRJ	Cão	Poodle	F	13 anos	Pele	"Swab" cutaneo
C80	8.62.11	HVPA/UFRRJ	Cão	Pinscher	M	11 anos	Trato urinário	Urina
C81	8.62.12	HVPA/UFRRJ	Cão	Poodle	M	4 anos	Pele	"Swab" cutaneo
C83	8.62.13	HVPA/UFRRJ	Cão	SRD	F	3 anos	Ouvido	"Swab" otologico
C85	8.62.14	HVPA/UFRRJ	Cão	Chow-Chow	F	10 anos	Pele	"Swab" cutaneo
C86	8.62.15	HVPA/UFRRJ	Cão	Pitbull	F	9 meses	Pele	"Swab" cutaneo
C87	8.62.16	HVPA/UFRRJ	Cão	SRD	F	3 anos	Pele	"Swab" de lesao
C93	8.62.18	HVPA/UFRRJ	Cão	Pinscher	F	11 anos	Trato urinário	Urina

C97	8.62.19	HVPA/UFRRJ	Cão	SRD	M	NI	Pele	"Swab" de abscesso
C99	8.63.1	HVPA/UFRRJ	Cão	SRD	M	1 ano	Pele	"Swab" cutaneo
C100	8.62.20	HVPA/UFRRJ	Cão	Chowchow	F	1 ano	Ouvindo	"Swab" otologico
C102	8.62.21	HVPA/UFRRJ	Cão	SRD	F	13 anos	Osso	"Swab" foco de fratura
C103	8.62.22	HVPA/UFRRJ	Cão	Labrador	M	12 anos	Pele	"Swab" cutaneo
C104	8.62.23	HVPA/UFRRJ	Cão	Scooby	M	3 anos	Pele	"Swab" de lesao
C105	8.63.2	HVPA/UFRRJ	Cão	Collie	F	9 anos	Pele	"Swab" cutaneo
C106	8.62.24	HVPA/UFRRJ	Cão	SRD	M	9 anos	Pele	Punção de abscesso
C110	8.62.25	HVPA/UFRRJ	Cão	Rottweiler	M	4 meses	Pele	"Swab" cutaneo
C111	8.62.26	HVPA/UFRRJ	Gato	PCB	F	2 anos	Trato urinário	Urina
C113	8.62.27	HVPA/UFRRJ	Cão	Pitt Bull	M	1 ano	Ouvindo	"Swab" otologico
C122	8.62.28	HVPA/UFRRJ	Cão	São Bernardo	M	7 anos	Trato urinário	Urina
C125	8.62.29	HVPA/UFRRJ	Cão	Shih-Tzu	F	5 anos	Ouvindo	"Swab" otologico
C127	8.62.30	HVPA/UFRRJ	Cão	Yorkshire	F	5 anos	Trato urinário	Urina
C128	8.62.31	HVPA/UFRRJ	Gato	SRD	F	2 anos	Trato urinário	Urina
C130	8.62.32	HVPA/UFRRJ	Cão	Yorkshire Terrier	F	3 anos	Trato urinário	Urina
C131	8.62.33	HVPA/UFRRJ	Cão	SRD	M	9 anos	Trato urinário	Urina
C132	8.62.34	HVPA/UFRRJ	Cão	SRD	M	7 anos	Ouvindo	"Swab" otologico
C133	8.62.35	HVPA/UFRRJ	Cão	Cane Corso	F	1 ano 3 meses	Vagina	"Swab" vaginal
C134	8.62.36	HVPA/UFRRJ	Cão	SRD	F	13 anos	Pele	"Swab" cutaneo
C135	8.62.37	HVPA/UFRRJ	Cão	Beagle	M	2 meses	Trato urinário	Urina
C137	8.62.38	HVPA/UFRRJ	Cão	SRD	M	15 anos	Trato urinário	Urina
C140	8.62.39	HVPA/UFRRJ	Cão	SRD	M	10 anos	Ouvindo	"Swab" otologico
C141	8.62.40	HVPA/UFRRJ	Cão	SRD	M	3 anos	Ouvindo	"Swab" otologico
C142	8.63.3	HVPA/UFRRJ	Cão	SRD	M	6 anos	Ouvindo	"Swab" otologico
C144	8.63.4	HVPA/UFRRJ	Cão	SRD	F	9 anos	Pele	Secreção de abscesso
C145 CR	8.63.5	HVPA/UFRRJ	Cão	SRD	M	5 anos	Pele	"Swab" cutaneo
C149	8.63.6	HVPA/UFRRJ	Cão	SRD	M	5 anos	Trato urinário	Urina
C150	8.63.7	HVPA/UFRRJ	Cão	SRD	F	1 ano 7 meses	Ouvindo	"Swab" otologico

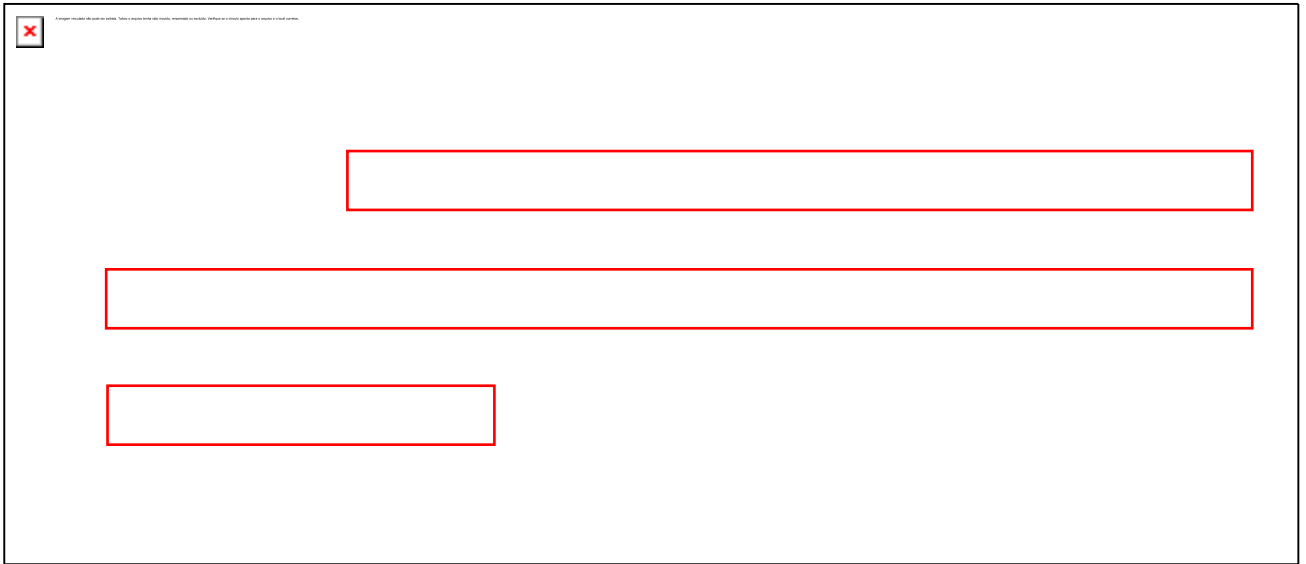
C154	8.63.8	HVPA/UFRRJ	Cão	SRD	M	8 anos	Ouvido	"Swab" otológico
C156	8.63.9	HVPA/UFRRJ	Cão	Pit Bull	F	8 anos	Pele	Fragmento cutâneo e linfonodo
C157	8.63.10	HVPA/UFRRJ	Cão	SRD	F	4 anos	Pele	Fragmento de cutâneo
C159	8.63.12	HVPA/UFRRJ	Cão	SRD	M	10 anos	Ouvido	"Swab" otológico
C160	8.63.13	HVPA/UFRRJ	Cão	Labrador	M	9 anos	Pele	Fragmento cutâneo
VA1	8.63.18	Laboratório Privado	Gato	Persa	M	11 meses	Trato urinário	Urina
VA2	8.63.19	Laboratório Privado	Cão	SRD	F	16 anos	Trato urinário	Urina
VA6	8.63.23	Laboratório Privado	Cão	Beagle	M	NI	Trato urinário	Urina
VA15	8.63.32	Laboratório Privado	Gato	PCB	M	3 anos	Trato urinário	Urina
VA27	8.64.4	Laboratório Privado	Cão	SRD	M	NI	NI	"Swab"

PCB: Pelo Curto Brasileiro; SRD: Sem Raça Definida; F: Fêmea; M: Macho; NI: Não informado

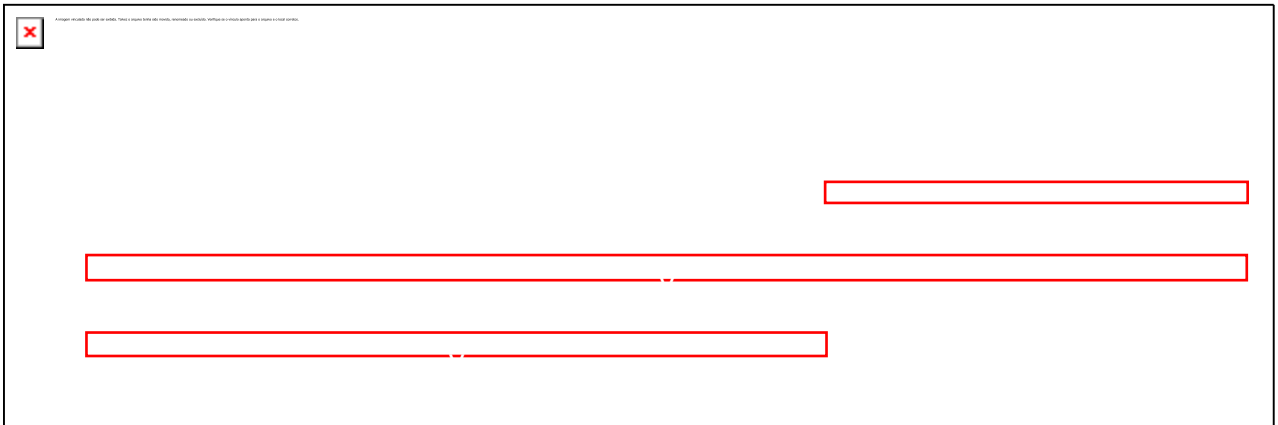
**ANEXO B** – Alinhamento das sequências (BioEdit versão 7.2) do gene *spa* amplificado através dos iniciadores descritos por Moodley e colaboradores (2009). Em destaque encontram-se as sequências de repetições de 30 pb que determinam o tipo de *spa*.







**Legenda:** Em destaque a sequência de repetições para o spa tipo 15.



**Legenda:** Em destaque a sequência de repetições para o spa tipo 05.

<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
	<input type="checkbox"/>	
	<input type="checkbox"/>	
	<input type="checkbox"/>	
	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
	<input type="checkbox"/>	