

UFRRJ
INSTITUTO DE VETERINÁRIA
PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS
VETERINÁRIAS

DISSERTAÇÃO

Levantamento e perfil de resistência à meticilina em bactérias do gênero *Staphylococcus* spp. isoladas a partir de cães do Setor de Acolhimento e Monitoramento Animal da UFRRJ

CAIO NUNES CHRISTOFFE SIMÕES

2024



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

**Levantamento e perfil de resistência à meticilina em bactérias do gênero
Staphylococcus spp. isoladas a partir de cães do Setor de Acolhimento e Monitoramento
Animal da UFRRJ**

CAIO NUNES CHRISTOFFE SIMÕES

Sob a Orientação da Professora

Miliane Moreira Soares de Souza

e Coorientação das Professoras

Dayanne Araújo de Mello

Irene da Silva Coelho

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

Seropédica, RJ Setembro de 2024

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

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

S593
1 SIMÕES, Caio Nunes Christoffe, 1995-
Levantamento e perfil de resistência à meticilina
em bactérias do gênero Staphylococcus spp. isoladas a
partir de cães do Setor de Acolhimento e
Monitoramento Animal da UFRRJ / Caio Nunes Christoffe
SIMÕES. - Rio de Janeiro, 2024.
56 f.

Orientadora: Miliane Moreira Soares de SOUZA.
Coorientadora: Dayanne Araújo de MELLO.
Coorientadora: Irene da Silva COELHO.
Dissertação(Mestrado). -- Universidade Federal
Rural do Rio de Janeiro, PPGCV, 2024.

1. Bacteriologia Veterinária. 2. Saúde Única. 3.
Staphylococcus spp.. 4. Antibióticos em medicina
veterinária. 5. Resistência a antimicrobianos. I.
SOUZA, Miliane Moreira Soares de , 1970-, orient. II.
MELLO, Dayanne Araújo de , 1989-, coorient. III.
COELHO, Irene da Silva, -, coorient. IV Universidade
Federal Rural do Rio de Janeiro. PPGCV. V. Título.



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS



ATA Nº 4317/2024 - PPGCV (12.28.01.00.00.00.50)

Nº do Protocolo: 23083.051607/2024-66

Seropédica-RJ, 20 de setembro de 2024.

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

CAIO NUNES CHRISTOFFE SIMÕES

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

DISSERTAÇÃO APROVADA EM 20/09/2024

(Assinado digitalmente em 23/09/2024 15:50)

MILIANE MOREIRA SOARES DE SOUZA

PROFESSOR DO MAGISTERIO SUPERIOR

PROGEP (12.28.01.09)

Matrícula: ###124#8

(Assinado digitalmente em 04/10/2024 17:48)

CÁSSIA COUTO DA MOTTA

ASSINANTE EXTERNO

CPF: ###.###.237-##

(Assinado digitalmente em 23/09/2024 18:32)

THERESSE CAMILLE NASCIMENTO HOLMSTROM

ASSINANTE EXTERNO

CPF: ###.###.417-##

Visualize o documento original em <https://sipac.ufrj.br/public/documentos/index.jsp> informando seu número: **4317**, ano: **2024**,
tipo: **ATA**, data de emissão: **20/09/2024** e o código de verificação: **7c87ee2fe4**

Agradecimentos

À minha querida mãe **Miriã da Silva Nunes**, por sempre me ensinar a cultivar os estudos, por me encorajar a ser curioso e a questionar o mundo ao meu redor. Sua garra e coragem me inspiram.

À minha avó **Marlene da Silva Nunes**, por ser a rocha sobre a qual se assenta nossa família. Suas orações me trouxeram até aqui, obrigado pelo carinho incondicional.

À minha companheira, **Beatriz Pereira Leite**, pela compreensão, paciência e suporte em todos os momentos difíceis que vencemos até hoje. Sua presença é um sopro de alegria e beleza em minha vida, seu sorriso me revigora.

À minha Orientadora Profa. Dra. **Miliane Soares de Souza**, por ter me aberto as portas para um novo mundo de conhecimentos. Sua liderança, empenho e profissionalismo são exemplos para todos que te cercam. Obrigado pela paciência e generosidade.

A todos os colegas pós-graduandos e estagiários do **LaBacVet-UFRRJ** que me auxiliaram no desenvolvimento desta dissertação e muito me ensinaram.

À equipe do VetLab Análises Clínicas Ltda., em especial à **Dra. Mariana Cazaux**, pelo apoio, amizade e compreensão em todos os momentos.

Aos meus grandes amigos de toda a vida **Lucas V. Souza** e **Nitai R. Domingues** agradeço por poder contar com vocês em todos os momentos.

A todos os **professores, técnicos e trabalhadores terceirizados do Instituto de Veterinária** da UFRRJ agradeço pelo serviço prestado à formação e acolhimento de tantos jovens que buscam uma formação acadêmica de alta qualidade em medicina veterinária.

O presente trabalho foi realizado com o apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior-Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

SIMÕES, Caio Nunes Christoffe. Levantamento e perfil de resistência à meticilina em bactérias do gênero *Staphylococcus* spp. isoladas a partir de cães do Setor de Acolhimento e monitoramento animal da UFRRJ. 2024. 52p. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias). Instituto de Veterinária, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2024.

RESUMO

O gênero *Staphylococcus* spp. é formado por bactérias da pele de humanos e animais. Funcionalmente divididos em Estafilococos coagulase-positivos (ECP) e Estafilococos coagulase-negativos (ECN), esses microrganismos comensais podem, eventualmente, causar infecções oportunistas. *Staphylococcus pseudintermedius* resistente à meticilina (MRSP) e outras espécies de *Staphylococcus* spp. *meticilina-resistentes* (MRS) são espécies oportunistas que estão normalmente presentes na microbiota da pele, trato respiratório superior, trato gastrointestinal e cavidade oral de cães saudáveis. Os registros de infecções comunitárias relacionadas à assistência à saúde causadas por MRS, em especial *Staphylococcus aureus* resistente à meticilina (MRSA), aumentam anualmente e geram graves consequências à saúde pública. A adoção é uma prática que deve ser estimulada na aquisição de um cão de estimação por famílias de todos os estratos sociais. A convivência com animais resgatados enriquece a vida das famílias e contribui para o bem-estar dos próprios cães. Entretanto, o convívio domiciliar pode promover o intercâmbio de espécies bacterianas entre cão e tutor, e com elas genes de resistência a antimicrobianos. O presente trabalho buscou identificar e caracterizar o perfil de resistência a beta-lactâmicos em 83 isolados de *Staphylococcus* spp. de diversas espécies, obtidos a partir de *swabs* colhidos na superfície corporal de cães disponíveis para adoção no Setor de Acolhimento e Monitoramento Animal (AMA) da UFRRJ. Objetiva-se contribuir para o entendimento da distribuição do gene *mecA* entre as cepas estafilocócicas circulantes na população de cães do Setor AMA, e o papel de *Staphylococcus* spp. da microbiota canina como reservatórios para a epidemiologia deste gene. Em um espaço amostral de 65 amostras, foram obtidos 83 isolados de *Staphylococcus* spp., 50,6% identificados como ECP e 49,4% como ECN de 14 espécies distintas. 21,7% dos isolados apresentaram o gene *mecA*. A análise dos dados revelou a presença de isolados meticilina-resistentes entre ECN e ECP no ambiente do abrigo, suscitando a implementação de medidas de vigilância sanitária e destacando a sua importância do ponto de vista de Saúde Única.

Palavras chave: *Staphylococcus*, Resistência antimicrobiana, Saúde Única.

SIMÕES, Caio Nunes Christoffe. Survey and Antimicrobial Resistance Profile of *Staphylococcus* spp. Isolated from Dogs in the Animal Shelter and Monitoring Sector of UFRRJ. 2024. 55p. Dissertation (Master's in Veterinary Sciences). Veterinary Institute, Federal Rural University of Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2024.

ABSTRACT

The genus *Staphylococcus* consists of bacteria found on the skin of humans and animals. These commensal microorganisms are functionally categorized into Coagulase-Positive Staphylococci (CPS) and Coagulase-Negative Staphylococci (CNS), and can occasionally cause opportunistic infections. *Staphylococcus pseudintermedius* and other Methicillin-Resistant *Staphylococcus* species (MRSP, MRS) are commonly found in the microbiota of healthy dogs. The incidence of community-acquired and healthcare-associated infections caused by MRS, particularly Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA), is increasing annually. Adoption should be encouraged for families from all social strata when acquiring a pet dog. Living with rescued animals enriches family lives and contributes to the well-being of the dogs themselves. However, home environments can facilitate the exchange of bacterial species between dogs and their owners, along with antimicrobial resistance genes. Through the transfer of genetic elements, bacteria of public health concern may acquire resistance genes. This study aimed to identify and characterize the beta-lactam resistance profile in 83 *Staphylococcus* isolates from various species, obtained from swabs collected from the body surfaces of dogs available for adoption at the Animal Reception and Monitoring Sector (AMA) of UFRRJ. The goal was to enhance the understanding of *mecA* gene distribution among staphylococcal strains in the canine population at AMA and to investigate the role of *Staphylococcus* species as reservoirs of this gene in canine microbiota. From a sample of 65 specimens, 83 *Staphylococcus* isolates were obtained, with 50.6% identified as CPS and 49.4% as CNS, representing 14 distinct species. A total of 21.7% of the isolates harbored the *mecA* gene. Data analysis revealed the presence of methicillin-resistant isolates among CNS and CPS in the shelter environment, underscoring the need for sanitary surveillance measures and highlighting the importance of a One Health perspective.

Keywords: *Staphylococcus*, Antimicrobial resistance, One Health.

SUMÁRIO

1.	Introdução	1
2.	Revisão de literatura	3
2.1	Gênero <i>Staphylococcus</i> spp.	3
2.2	<i>Staphylococcus</i> spp. coagulase-positivos	4
2.3	<i>Staphylococcus</i> spp. coagulase-negativos	5
2.4	Resistência à metilina	6
2.6	Ambientes de abrigo para cães errantes	13
2.7	Setor de Acolhimento e Monitoramento Animal da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro: experiência de criação, implantação e estabelecimento do Projeto AMA no contexto da UFRRJ	13
2.8	Adoção e risco zoonótico de carregamento de genes de resistência à metilina 15	
3.	Objetivos	17
4.	Material e métodos	18
4.1	Coleta de amostras	18
4.2	Isolamento primário	18
4.3	Identificação fenotípica	18
4.3.a	Ágar Manitol Vermelho de Fenol	19
4.3.b	Prova da catalase	19
4.3.c	Fermentação dos açúcares manose e maltose	19
4.3.d	Prova da coagulase	20
4.3.e	Prova de Voges-Proskauer	20
4.3.f	Resistência intrínseca à bacitracina 0,04 UI	20
4.3.g	Identificação por MALDI-TOF MS	21
4.4	Identificação genotípica	21

4.4.b	Caracterização genotípica através da detecção do gene 16s estafilocócico	
		22
4.4.c	Detecção genotípica do gene <i>mecA</i> estafilocócico	22
4.5	Teste de sensibilidade aos antimicrobianos.....	23
5.	Resultados	24
6.	Discussão	28
7.	Conclusões.....	33
8.	Referências.....	34

1. Introdução

O contínuo aumento da população de animais de companhia é um fenômeno global. Segundo o relatório Índice de Abandono Brasil de 2023, o total de cães no Brasil era de 82,1 milhões. Desse total, aproximadamente 25%, ou cerca de 20,2 milhões, eram cães abandonados (20 milhões) ou estavam em abrigos para animais (177,6 mil) (MARS, 2024). A adoção de animais de rua é uma prática comum para famílias de todos os estratos sociais. Apesar do importante papel social da adoção de cães na mitigação do problema do abandono animal no Brasil, a introdução de um animal no ambiente doméstico pode representar um risco para a colonização e infecção zoonótica por bactérias potencialmente portadoras de genes de resistência.

O gênero *Staphylococcus* é composto por bactérias comensais encontradas na pele e mucosas de mamíferos e aves. Funcionalmente, são divididos em Estafilococos Coagulase-Positivos (ECP) e Estafilococos Coagulase-Negativos (ECN) e muitos desses microrganismos podem agir como patógenos oportunistas (MARKEY, 2013). Em cães, a foliculite bacteriana superficial é a manifestação clínica mais comum da piodermite canina, geralmente causada por *Staphylococcus pseudintermedius* e outros membros do mesmo gênero. Consequentemente, essa condição é a principal razão para o uso de antimicrobianos na clínica de animais de companhia (HILLIER *et al.*, 2014). Em saúde humana, *Staphylococcus aureus* é atualmente a segunda bactéria que mais contribui para mortes relacionadas à resistência antimicrobiana (RAM) globalmente, sendo a primeira entre as Gram-positivas. Além disso, é classificado como um patógeno prioritário pela Organização Mundial da Saúde (OMS, 2024). Os ECN são atualmente considerados patógenos nosocomiais e causadores de doenças transmitidas por alimentos. Além disso, índices alarmantes de RAM têm sido observados em ECN, com alguns casos apresentando níveis de resistência superiores aos encontrados em cepas de MRSA (JESUMIRHEWE *et al.*, 2024).

Os beta-lactâmicos, em especial as penicilinas semi-sintéticas associadas a inibidores de beta-lactamases e as cefalosporinas, são historicamente os fármacos de escolha para tratamento de infecções estafilocócicas. Entretanto, devido ao uso inadequado de antimicrobianos verifica-se um contínuo aumento da prevalência de *Staphylococcus* spp. resistentes à meticilina (MRS) em cães como comensais ou agentes infecciosos (MISZCZAK *et al.*, 2023). A administração sistemática e desnecessariamente prolongada dessas drogas,

especialmente quando não é baseada em cultura e testes de suscetibilidade, contribui para o aumento da pressão seletiva, favorecendo a disseminação de cepas resistentes. (HILLIER *et al.*, 2014; HORSMAN *et al.*, 2023)

Staphylococcus pseudintermedius meticilina-resistentes (MRSP) e diversas espécies de ECN meticilina-resistentes (ECN-MR) frequentemente estão presentes na microbiota de cães de forma assintomática (GUIMARÃES *et al.*, 2023). Essas bactérias provenientes de animais participam também do surgimento e dispersão de genes de resistência e de virulência. Através de transferências horizontais de elementos genéticos, bactérias de interesse para a saúde humana como *Staphylococcus aureus* também podem adquirir genes de resistência e virulência (MÉRIC *et al.*, 2015).

A resistência a beta-lactâmicos pode ocorrer, como no caso da resistência à penicilina, por ação de uma enzima beta-lactamase codificada a partir da sequência gênica *blaZ* ou por uma alteração estrutural das proteínas que são o alvo do mecanismo de ação dos beta-lactâmicos. O gene *mecA* está contido no SCC*mec* (cassete cromossômico estafilocócico *mec*), um elemento genético móvel que pode ser transferido horizontalmente entre bactérias e codifica a PBP2, uma PBP (*Penicilin-binding protein*, proteína ligante de penicilina) alterada com baixa afinidade aos beta-lactâmicos. Essa afinidade bioquímica reduzida impede o efeito de inibição competitiva durante a síntese das ligações cruzadas do peptidoglicano da parede, permitindo a continuidade da infecção mesmo frente ao antimicrobiano. (MLYNARCZYK-BONIKOWSKA *et al.*, 2022)

A transferência de estafilococos entre animais e humanos pode ser facilitada por práticas de manejo inadequadas, como a falta de higiene e a falta de controle de infecções em ambientes domésticos e abrigos para animais. A transmissão e colonização de estafilococos entre humanos e animais de companhia é uma questão de saúde pública relevante, dado o potencial infeccioso desses microrganismos e a sua diversidade em termos de espécies, mecanismo de virulência e resistência a antimicrobianos.

2. Revisão de literatura

2.1 Gênero *Staphylococcus* spp.

O gênero *Staphylococcus* está classificado na família Staphylococcaceae, ordem Bacillales, Classe Bacilli, filo Firmicutes (PARTE *et al.*, 2024). De maneira geral, apresentam-se microscopicamente como células bacterianas cocóides, pequenas, agrupadas em arranjos irregulares semelhantes a cachos de uva, tétrades, pares e células isoladas, sendo caracterizados como cocos Gram-positivos. São, em sua maioria, anaeróbios facultativos, imóveis, não produtores de esporos e produtores da enzima catalase (KONEMAN *et al.*, 2008; CARROLL *et al.*, 2019; MADHAIYAN *et al.*, 2020).

O gênero *Staphylococcus* pode ser encontrado na pele e na superfície das mucosas de animais e seres humanos e algumas espécies são reconhecidas como patógenos oportunistas importantes (MOSES; SANTOS; GALES, 2023). Por possuírem boa resistência ao dessecação e a substâncias desinfetantes, podem manter-se viáveis no ambiente por algum tempo, portanto, a transmissão por fômites pode ser relevante. O estabelecimento da infecção por *Staphylococcus* spp. geralmente depende de uma solução de continuidade. As infecções estafilocócicas costumam ser secundárias a outras afecções, que iniciam a quebra da barreira cutânea e permitem o estabelecimento da infecção (GREENE, 2015).

Em cães, é considerado o microrganismo mais abundante na microbiota da pele saudável. Outros gêneros bacterianos comensais permanentes ou transitórios da pele canina são *Corynebacterium* spp., *Kocuria* spp., *Micrococcus* spp., *Propionibacterium* spp., *Pseudomonas* spp. e *Streptococcus* spp. (HORSMAN, 2023). O trabalho de Bradley *et al.* (2016) utilizou o sequenciamento do gene 16s ribossomal bacteriano para fazer um levantamento comparativo entre a microbiota da superfície epidérmica de cães atópicos e saudáveis. Segundo os autores, os cães com dermatite atópica apresentaram redução na diversidade de gêneros bacterianos presentes na pele e, ao mesmo tempo, notou-se aumento nas populações relativas de estafilococos, como *Staphylococcus pseudintermedius* e de *Corynebacterium* spp. O tratamento resultou no restabelecimento da diversidade bacteriana normal e no desaparecimento progressivo dos sintomas, à medida que a colonização por *S. pseudintermedius* decrescia (BRADLEY *et al.* 2016).

Há amplos registros de isolamento de *Staphylococcus* spp. a partir de amostras diversas: gelo antártico, superfície corporal de animais homeotérmicos como esquilos, baleias, pinguins, elefantes e pecilotérmicos como peixes e insetos, amostras de alimentos e superfícies.

(VRBOVSKÁ *et al.*, 2020; LEGGIADRO *et al.*, 2009; BERTELLONI *et al.*, 2023; GOULD *et al.*, 2020).

2.2 *Staphylococcus* spp. coagulase-positivos

Dentre as espécies de *Staphylococcus* spp., sabe-se que o grupo dos coagulase-positivos (ECP) é o de maior relevância clínica. São caracterizados como os principais agentes etiológicos de afecções clínicas em humanos e, esporadicamente, também em animais de companhia, causando infecções cutâneas, endocardites, cistites, pneumonias e infecções de sítio cirúrgico. (ROBBINS, 2013).

Atualmente, o grupo dos ECP é formado pelas espécies *Staphylococcus aureus*, *S. coagulans* (anteriormente *S. schleiferi* subsp. *coagulans*), *S. hyicus* (coagulase-variável), *S. lutrae*, *S. agnetis* (coagulase-variável), *S. cornubiensis*, *S. intermedius*, *S. pseudintermedius* e *S. delphini*, que também pertencem ao Grupo *S. intermedius* (GSI) (FATEN BEN CHEHIDA *et al.*, 2024). A espécie *S. ursi*, descrita por pesquisadores em 2020 (PERRETEN, 2020) a partir de amostras coletadas em ursos negros nos Estados Unidos da América, foi inicialmente incluída no GSI, entretanto, sem adesão completa da comunidade científica até o momento da produção do presente trabalho (MACFADYEN; PATERSON, 2024).

A espécie mais relevante para a saúde humana é *Staphylococcus aureus*, em função de sua ampla gama de mecanismos de virulência e presença disseminada de cepas multidroga resistentes (MDR), em especial as cepas de *S. aureus* metilicina-resistentes (MRSA). *S. aureus* é o agente causador mais comum de infecções de pele e tecidos moles, e pode também provocar diversas outras infecções, como pneumonia, osteomielite, além de infecções potencialmente fatais, como sepse e endocardite infecciosa (YAMAZAKI *et al.*, 2024). Além disso, *S. aureus* pode contaminar alimentos e produzir exotoxinas e superantígenos que causam intoxicação alimentar grave (HENNEKINNE; DE BUYSER; DRAGACCI, 2012). Alguns mecanismos de virulência de *S. aureus* incluem: Presença de polissacarídeos capsulares que conferem a capacidade de formação biofilmes, presença de adesinas promotoras de adesão celular, produção de hemolisinas, leucocidinas (promovem respectivamente a lise eritrocitária e leucocitária, respectivamente) e toxinas esfoliativas estafilocócicas que causam a desorganização e destruição de tecidos epiteliais (CHEUNG; BAE; OTTO, 2021).

As espécies mais relevantes para humanos e animais são, respectivamente, *Staphylococcus aureus* e os isolados pertencentes ao Grupo *Staphylococcus intermedius* (GSI) (*S. intermedius*, *S. pseudintermedius*, *S. delphine*, *S. cornubiensis*) (MACFADYEN; PATERSON, 2024). Os membros do GSI *Staphylococcus intermedius* e *Staphylococcus*

pseudintermedius são os agentes etiológicos mais comuns de piodermite canina (BANNOEHR; GUARDABASSI, 2012). Nos últimos anos, o potencial zoonótico de *S. pseudintermedius* e *S. intermedius* foi evidenciado pelos diversos relatos de casos de colonização e infecção de seres humanos a partir de microrganismos provenientes do reservatório canino (CARROLL; BURNHAM; WESTBLADE, 2021; VAN HOOVELS *et al.*, 2006). No caso de médicos veterinários, é evidente que o contato diário com cães promove tal exposição que a colonização por MRSP e MRSA pode ser considerada um risco ocupacional (ADEBOWALE *et al.*, 2021). Estudos de coorte indicam um risco aumentado de colonização por MRSP também em crianças portadoras de dermatite atópica e idosos de 61 anos ou mais. (MOSES; SANTOS; GALES, 2023).

2.3 *Staphylococcus* spp. coagulase-negativos

A maioria dos estafilococos coagulase-negativos (ECN) eram, até pouco tempo atrás, considerados microrganismos saprofíticos. Em função disso, a identificação ao nível de espécie dos ECN e a compreensão dos processos ecológicos e evolutivos em que estão envolvidos foi por muitos anos negligenciada em laboratórios de microbiologia (MARKEY, 2013; IKHIMIUKOR *et al.*, 2023).

Contudo, com o advento de novas técnicas, a compreensão do envolvimento do grupo coagulase-negativo na gênese de quadros infecciosos em animais e seres humanos foi sensivelmente expandida, trazendo à luz a importância do estudo das características diagnósticas e patogênicas dessas espécies, além de suas relações filogenéticas. Os avanços tecnológicos na pesquisa em microbiologia como, por exemplo, a identificação proteômica por MALDI-TOF MS (*Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Time-Of-Flight Mass Spectrometry*), as metodologias baseadas na Reação em Cadeia da Polimerase (*Polymerase Chain Reaction – PCR*) e as técnicas de sequenciamento genético viabilizaram uma melhor compreensão do real envolvimento dos ECN em processos patológicos.

Os ECN estão amplamente distribuídos em variados nichos ecológicos. Podem ser encontrados como colonizantes da nasofaringe, pele e membranas mucosas de mamíferos e aves, e também de forma transitória no trato gastrointestinal (KONEMAN *et al.*, 2008). Muitas das infecções por este grupo de bactérias são causadas por comensais da microbiota do paciente. Entretanto, a capacidade de *Staphylococcus* spp. para resistir aos desafios ambientais, como, por exemplo, dessecação, alta salinidade e sanitizantes, favorece a transmissão indireta de cepas (CARROLL *et al.*, 2019). Os ECN são considerados hoje patógenos

nosocomiais e causadores de doenças transmitidas por alimentos. Além disso, índices de RAM alarmantes têm sido observados em ECN, em alguns casos maiores do que os observados em cepas de MRSA (JESUMIRHEWE *et al.*, 2024).

São considerados importantes reservatórios para fagos, plasmídeos e genes móveis de RAM, resistência a metais pesados e virulência. Fatores ecológicos, como a presença de moléculas antimicrobianas no meio e de localização espacial, como por exemplo proximidade com outros *Staphylococcus* spp. portadores de genes de RAM, determinam estímulos ambientais que promovem a frequente troca genética entre os ECNs. Apresentam também alta capacidade de recombinação gênica. Somada à alta capacidade de troca genética horizontal, a recombinação gênica frequente tem um impacto evolutivo muito importante. O surgimento acelerado de novas variantes genéticas parece ter influência direta da recombinação homóloga entre alelos de genes adquiridos e próprios. Essas mutações, que podem ser substitutivas ou aditivas, poderiam ser transferidas a outros *Staphylococcus* spp. na mesma área (IKHIMIUKOR *et al.*, 2023).

2.4 Resistência à meticilina

Em 1929, Alexander Fleming descobre a penicilina, revolucionando o tratamento de infecções bacterianas (UDDIN *et al.*, 2021). Por anos, a penicilina foi considerada um medicamento de eficácia clínica quase total, sendo amplamente prescrita no contexto de cuidados hospitalares e largamente utilizada na atenção a soldados feridos em batalhas da segunda guerra mundial. No entanto, apenas um ano após o início do uso clínico da penicilina, o surgimento de cepas bacterianas resistentes foi documentado. Em resposta, em 1959 foi introduzida ao mercado a meticilina, uma penicilina semissintética resistente às enzimas penicilinasas, para tratar as infecções causadas por *Staphylococcus aureus* resistentes. O advento da meticilina foi amplamente adotado para combater as infecções estafilocócicas da época. Contudo, durante a década de 1980 surgem cepas resistentes à meticilina em *Staphylococcus aureus* (MRSA) (UTSUI, Y. e YOKOTA, T., 1985). O primeiro relato de MRSA isolado a partir de uma amostra clínica já descrevia que *Staphylococcus* spp. meticilina-resistente haviam sido observados em pesquisas laboratoriais anteriores (CARROLL *et al.*, 2019).

Sabe-se que o efeito de antibiose consiste em uma relação ecológica de antagonismo bioquímico entre microrganismos (LARSSON e FLACH, 2021) e que mecanismos de resistência a antibióticos naturais, como as substâncias semelhantes à penicilina produzidas por diversos fungos, precedem os registros científicos de bactérias resistentes no contexto clínico

(UEHARA, 2022). Nos últimos 20 anos, a origem da resistência à meticilina vem sendo intensamente investigada por pesquisadores de todo o mundo. O advento das tecnologias de sequenciamento genético permitiu a produção de dados comparativos entre as diferentes sequências de genes *mec* provenientes de distintos tipos clonais de *Staphylococcus* spp. de origem humana, ambiental e animal. Apesar dos avanços consideráveis na compreensão dos processos evolucionários envolvidos na emergência da RAM em *Staphylococcus* spp., o tópico permanece em discussão (LARSEN *et al.*, 2022).

A resistência à meticilina é determinada pela expressão dos genes do tipo *mec*. O *mecA* é o gene de maior prevalência dentre os quatro do tipo *mec* (DE MOURA *et al.*, 2023). Posteriormente, outro homólogo de *mecA*, denominado *mecC*, foi detectado na Inglaterra em 2007 em isolados provenientes de amostras de mastite. O gene *mecC* apresenta 69% de homologia com *mecA* (GARCÍA-ÁLVAREZ *et al.*, 2011). Inicialmente chamado de *mecA*_{LGA251} e posteriormente renomeado como *mecC* (ITO *et al.*, 2012). O gene *mecB* é um homólogo de *mec* de localização cromossomal ou plasmidial reportado em *Micrococcus caseolyticus*, ao passo que *mecD* é um gene cromossômico não móvel e foi encontrado na mesma espécie bacteriana em isolados bovinos e caninos. Ambas as variantes também são capazes de conferir resistência aos beta-lactâmicos. *mecB* e *mecD* representam um desafio para a microbiologia clínica, uma vez que apresentam aproximadamente 60% de homologia com *mecA* de tal maneira que detecção molecular destas variantes exige a utilização de primers específicos. (LAKHUNDI; ZHANG, 2018).

Os genes *mecA* e *mecC* codificam respectivamente as proteínas PBP2a e PBP2c. Essas Proteínas Ligantes de Penicilina (PBP: *Penicilin Binding Protein*) estão envolvidas na síntese da parede celular bacteriana. São responsáveis pelas reações de transpeptidação necessárias para o estabelecimento das ligações cruzadas entre as cadeias de peptideoglicano, responsáveis pela rigidez da parede celular. Os antimicrobianos beta-lactâmicos agem sobre este grupo de proteínas ligando-se a elas e inibindo sua atividade. Como resultado, a falha na produção do peptideoglicano acarreta a perda de estabilidade da parede celular e morte (DEMAIN; ELANDER, 1999). As PBPs produzidas a partir de *mecA* ou *mecC* apresentam afinidade reduzida às penicilinas, em especial a PBP2a (LARSEN *et al.*, 2022). A baixa afinidade impede a ação antibiótica dos beta-lactâmicos e, assim, confere resistência a penicilinas, cefalosporinas e carbapenêmicos.

A hipótese de transferência de resistência à meticilina por meio de elementos genéticos móveis decorre da observação da ampla disseminação de *mecA* entre diversas espécies

estafilocócicas. O gene *mecA* localiza-se em um elemento genético móvel, denominado cassete cromossômico *SCCmec* (*Staphylococcal Cassette Chromosome mec*). O *SCCmec* é um elemento genético que só pode ser transferido entre espécies do gênero *Staphylococcus* spp. A aquisição deste gene permite a produção de uma proteína de parede celular alterada chamada de PBP2a (*Penicilin Binding Protein 2a*) com menor afinidade aos beta-lactâmicos. Consequentemente, as cepas com presença do gene *mecA* são capazes de expressar a resistência à meticilina, ou seja, às penicilinas, cefalosporinas e carbapenêmicos (KATAYAMA, HIRAMATSU, 2000).

Acredita-se que a integração do gene *mecA* a cepas de *S. aureus* deva-se à transferência do elemento genético *SCCmec* proveniente de *S. sciuri*, reclassificado como *Mammalicoccus sciuri*, um estafilococo coagulase negativo comensal de animais e raramente patogênico. O gene *mecA* presente nos MRSA é um gene exógeno que apresenta considerável homologia com o *mecA* de *S. sciuri*, um gene naturalmente presente nessa espécie (CALAZANS-SILVA *et al.*, 2014; MELO, 2020).

Estruturalmente, o *SCCmec* é constituído por alguns componentes genéticos cruciais, o complexo *mec*, que inclui a ilha de patogenicidade IS431, o gene *mec* e seus reguladores *mecRI*, o responsável pela sinalização para que ocorra a tradução de *mec*, e *mecI*, responsável pela inibição da tradução. Além disso, há o complexo *ccr* (*Cassette Chromosome Recombinases*), que contém genes responsáveis por codificar enzimas recombinases, responsáveis pela mobilidade do *SCCmec*. Além dos elementos citados, outros genes de resistência podem estar presentes no *SCCmec*, sendo transferidos conjuntamente e determinando multirresistência a diversas famílias de antimicrobianos. A zona que abriga estas estruturas não essenciais é denominada de região J. As particularidades estruturais de *SCCmec* encontrados em diferentes isolados ocasionaram a sua classificação em 13 tipos, com características próprias (HIRAMATSU *et al.*, 2014; LARSEN *et al.*, 2022). Os tipos de *SCCmec* estão associados a variados cenários epidemiológicos e tipos clonais de estafilococos. Alguns exemplos são a detecção dos tipos II, IV e *SCCmec* não tipáveis em *S. pseudintermedius*, isolados de processos de cães e gatos no Rio de Janeiro (MOTTA, 2018), a caracterização do tipo II em isolados MRSA e dos tipos IV e V em MRSP obtidos a partir de cães e gatos saudáveis nos Estados Unidos da América (DAVIS *et al.*, 2014), a prevalência dos tipos IV e V em isolados de MRS associados à pecuária (*Livestock Associated MRS: LA-MRS*) na Bélgica (TCHAMBA *et al.*, 2021) e os diferentes perfis de susceptibilidade a beta-lactâmicos observados em MRSP

isolados a partir de amostras caninas na Dinamarca e Noruega e sua associação com os distintos tipos de *SCCmec* encontrados (WEGENER *et al.*, 2020).

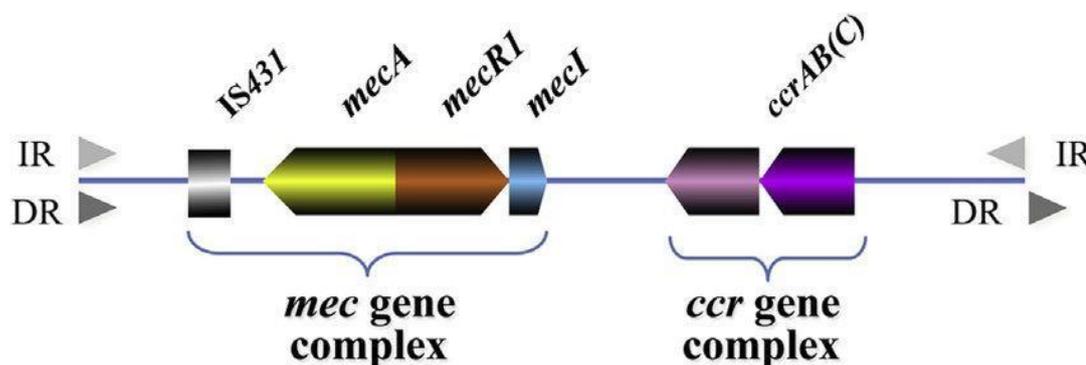


Figura 1: Cassete cromossômico SCCmec. (HIRAMATSU *et al.*, 2014)

Além de influenciarem nos perfis de RAM, as características particulares de cada tipo e subtipo de *SCCmec* podem apresentar desafios à caracterização molecular da resistência à meticilina. Em estudo realizado com isolados de *Staphylococcus* spp. provenientes da cadeia de produção leiteira, observou-se que os isolados de bovinos, apesar de apresentarem resistência fenotípica, não apresentavam amplificação do gene *mec* (MELO *et al.*, 2014). Entretanto, o mesmo *primer* foi capaz de amplificar o *mecA* obtido a partir de amostras das mãos de trabalhadores da cadeia leiteira e equinos. A observação destes resultados levou à hipótese de que a resistência à meticilina em cepas estafilocócicas provenientes de bovinos talvez não fosse correlacionada necessariamente à presença de genes *mecA*. Entretanto, trabalhos europeus (GARCÍA-ÁLVAREZ *et al.*, 2011) relatando a detecção de um novo tipo de *mec* isolado a partir de MRS de origem humana e bovina, que apresentava particularidades genotípicas como inserções de bases, deleções ou mutações pontuais, apontavam a possibilidade da presença de variantes de *mecA* não detectáveis através da PCR, com os iniciadores habitualmente utilizados e baseados nas sequências *mecA* de MRSA provenientes de amostras humanas (MURAKAMI *et al.* 1991). Diante dessas observações, os autores propuseram a elaboração de um *primer* voltado especificamente à identificação do *mecA* de amostras MRS provenientes da cadeia leiteira brasileira. Para tanto, foram comparadas sequências *mecA* de *Staphylococcus* spp. disponíveis na base de dados *GeneBank* e, a partir dessa comparação, foi criada uma sequência representativa do *mecA* de MRSA humano. Em seguida, utilizando quatro pares de iniciadores distintos, mas que conjuntamente abarcavam toda a sequência de *mecA*, procedeu-se a avaliação da capacidade de amplificação do *mecA* em isolados bovinos. Os quatro iniciadores utilizados foram desenhados para amplificação da porção inicial do gene *mecA*

(*mecAant*), porção interna 1 (*mecAint1*), porção interna 2 (*mecAint2*) e porção posterior do gene (*mecApos*). Destes iniciadores, o único que apresentou resultado positivo foi o iniciador relacionado à porção interna 1. A ausência de amplificação das outras porções do gene *mecA* foi indicativa de que particularidades estruturais daquela variante do gene poderiam não apresentar homologia suficiente com o primer de MURAKAMI *et al.* (1991) para que a detecção pela técnica de PCR fosse efetiva, ao passo que a porção interna 1 apresentou-se suficiente semelhante ao *primer* para que a reação ocorresse. O *primer* relacionado a porção anterior 1 demonstrou grande compatibilidade com a sequência do *mecA* de *S. sciuri* (AY820253) de origem bovina. A partir dessas conclusões e baseado na alta compatibilidade observada com o primer interior 1 (*mecAint1*), outros três *primers* foram produzidos com base em sequências conservadas do *mecA* de *S. sciuri* bovino com base nas sequências de suas porções anterior (*mecSsciuriAnt*), interior (*mecSsciuriInt*) e posterior (*mecSsciuriPos*). Os quatro pares de *primers* produzidos na segunda etapa amplificaram somente as sequências de *mecA* de isolados bovinos, com resultados negativos para as amostras de humanos e equinos. Após o sequenciamento genético dos isolados foi possível confirmar que as sequências de *mecA* presentes em amostras de bovinos possuíam algumas divergências pontuais em relação às amostras equinas e humanas, particularmente na região de anelamento descrita para o *mecA* proveniente de amostras clínicas humanas de MRSA (MURAKAMI *et al.* 1991). Os dados genômicos permitiram determinar a classificação dos isolados em dois conjuntos evolutivamente distintos: um abarcando *mecA* isolado de cães, roedores e equinos, e outro somente de bovinos. A detecção de *mecA* em amostras de animais não deve ser baseada exclusivamente em parâmetros humanos, uma vez que as populações animais podem apresentar tipos clonais inesperados ou mesmo desconhecidos. A diversidade genética de MRS de diferentes origens deve sempre ser levada em consideração, a fim de reduzir a possibilidade de caracterizações errôneas.

Ao longo das últimas décadas, o uso indiscriminado de antibióticos, tanto na medicina humana quanto na veterinária, acelerou o processo de seleção de bactérias resistentes, aumentando sua prevalência. A disseminação global de cepas de MRS foi facilitada pela mobilidade humana e pelo comércio internacional, tornando a resistência à metilina um problema de saúde pública mundial. Segundo estudos recentes, a alta prevalência de RAM não só a metilina mas também a outros antimicrobianos correlaciona-se diretamente ao uso inadequado destes medicamentos (UEHARA, 2022). A resistência à metilina em cepas de *Staphylococcus pseudintermedius* e *Staphylococcus schleiferi* associadas à piodermite canina

tem emergido devido a tratamentos prolongados ou equivocados com antibióticos. Esse fenômeno sugere que o elemento *mecA* pode ser facilmente transferido entre diferentes espécies e ultrapassar barreiras de adaptação ao hospedeiro. (MCVEY *et al.*, 2022)

2.5 Transmissão de estafilococos entre humanos e animais de companhia a partir do aspecto de Saúde Única

O convívio entre seres humanos e animais inicia-se com os processos de domesticação de espécies de mamíferos e aves. Seja para consumo ou trabalho, bovinos, equinos, suínos, galinhas, cães e outras espécies passaram por um longo processo de adaptação, seleção e reprodução, de tal modo que as histórias evolutivas de humanos e animais passam a estar interligadas. Inicialmente percebidos pelos seres humanos como aliados nas tarefas práticas dos grupos primitivos, como pastoreio de gado e proteção contra predadores, os cães foram alçados posteriormente à posição de animais de estimação. Atualmente, o cão é considerado por muitos como membro do grupo familiar, com acesso irrestrito ao ambiente domiciliar.

A transferência de bactérias resistentes pode ocorrer pelo contato direto, através de fômites ou por via ambiental (GREENE, 2015). Cada organismo animal conta com uma microbiota permanente e transitória específica, equipadas pela evolução com mecanismos adaptativos, como genes de resistência e virulência, específicos para o nicho ecológico que ocupam. Além disso, o uso exagerado de antimicrobianos e os fluxos de transporte global facilitaram a seleção e disseminação de microrganismos portadores de RAM. Sabe-se que algumas bactérias resistentes podem ser encontradas com níveis de prevalência importantes em reservatórios animais como, por exemplo, MRSP em cães, MRSA em suínos, *E. coli* resistente às fluoroquinolonas em aves de produção e *Enterococcus faecium* resistente à vancomicina em múltiplos cenários de produção animal (OMS, 2024).

Historicamente, o conceito estabelecido era de que as espécies de *Staphylococcus* spp. possuíam uma relação de coevolução com o hospedeiro, associadas à microbiota de uma determinada espécie animal. Hoje sabe-se que, apesar de apresentarem adaptações e, na maioria dos casos, afinidade a um determinado hospedeiro natural, a capacidade de transferência genética horizontal de *Staphylococcus* spp. permite a aquisição de genes de virulência e resistência, que capacitam cepas, anteriormente restritas a determinado hospedeiro, a colonizarem outras espécies (MCVEY *et al.*, 2022).

O reservatório natural e a origem do homólogo *mecC* ainda não foram completamente elucidados. Uma pesquisa publicada em 2022 por LARSEN *et al.* apontou que este gene pode ter surgido também em *Staphylococcus (Mammalicoccus) sciuri* através da seleção natural, muito antes da pressão seletiva promovida pelo uso de beta-lactâmicos a partir de sua descoberta no início do século XX. Com base em levantamentos anteriores da microbiota de ouriços europeus, os autores constataram uma alta prevalência de MRSA portadores de *mecC* entre esses animais. A hipótese indicada é que a coinfeção de ouriços pelo fungo dermatófito *Trichophyton erinacei* pode ter selecionado as cepas portadoras de resistência a beta-lactâmicos. Assim como outros fungos, *T. erinacei* é capaz de produzir duas substâncias beta-lactâmicas com atividade antimicrobiana, identificadas como penicilina G e ácido 6-(5-hydroxy-n-valeramido)-penicilânico. A exposição prolongada das cepas de MRSA da microbiota dos ouriços a essas substâncias pode ter selecionado as cepas portadoras do *SCCmec* tipo XI contendo *mecC* e *blaZ*, que lhes garantiam condições de adaptar-se ao desafio ambiental promovido pela infecção fúngica. As análises genômicas do sequenciamento desses MRSA portadores de *mecC* coletados em ouriços revelaram também que os clones encontrados não apresentavam marcadores genéticos relacionados a adaptações ao hospedeiro humano ou bovino, exceto uma das linhagens que demonstrou adaptações genéticas ao hospedeiro bovino. Os processos evolutivos da RAM são profundamente influenciados pela interconectividade entre os animais silvestres, animais domésticos e agroecossistemas e pela ação humana. As abordagens de Saúde Única são criticamente importantes para o entendimento e monitoramento da resistência aos antimicrobianos (LARSEN *et al.*, 2022).

A distribuição, importância em saúde e origem do homólogo *mecC* ainda não estão bem caracterizadas, de tal modo que esta variante de *mec* vem sendo intensamente investigada. Em 2020, foi publicado o primeiro registro de três isolados de MRSA associados à atividade pecuária (*Livestock-Associated MRSA*) no Brasil (SILVA *et al.*, 2020). Os três isolados demonstraram ser do mesmo tipo clonal, e puderam ser isolados a partir do leite, do equipamento de ordenha e das ordenhadeiras. Tal registro caracteriza um quadro preocupante: a resistência aos beta-lactâmicos mediada por *mecC* chegou à pecuária brasileira. A caracterização inequívoca da presença do *mecC* nos rebanhos nacionais acarreta preocupações não só econômicas, mas também do ponto de vista da saúde dos trabalhadores da cadeia leiteira, uma vez que esses isolados também apresentaram outros genes codificantes de fatores de virulência e determinantes de resistência. (SILVA *et al.*, 2020).

2.6 Ambientes de abrigo para cães errantes

Ambientes de abrigo para cães abandonados são instalações dedicadas ao acolhimento temporário ou permanente de animais em situação de vulnerabilidade. A partir de uma perspectiva de Saúde Única, que integra as dimensões da saúde humana, animal e ambiental, esses abrigos desempenham um papel crucial na promoção do bem-estar geral e na prevenção de riscos sanitários. Esses ambientes são projetados para oferecer cuidados médicos, alimentação e socialização aos cães resgatados, além de promover a sua eventual adoção (CFMV, 2023).

Do ponto de vista da saúde animal, os abrigos devem implementar práticas rigorosas de manejo e controle de doenças para garantir a saúde dos animais. Isso inclui a realização de exames veterinários, a vacinação regular, o tratamento de parasitas e o manejo de doenças infecciosas. Um ambiente bem mantido reduz o estresse dos animais e previne a propagação de doenças contagiosas, contribuindo para a saúde geral dos cães e, por conseguinte, para a saúde pública (ASV, 2022).

Os abrigos para cães, em especial aqueles localizados em nações em desenvolvimento como o Brasil, concentram cães provenientes de diversas origens e com diferentes históricos. A aglomeração de animais em espaço reduzido pode propiciar a disseminação de genes de resistência, bem como aumenta o risco de doenças dermatológicas entre a população acolhida no abrigo (AKARSU *et al.* 2024). Cães de rua frequentemente são acolhidos em abrigos para animais com manifestações dermatológicas de natureza parasitária ou infecciosa, como, por exemplo, sarnas, dermatofitoses, infestações de pulgas e carrapatos, e que geralmente estão associadas a infecções bacterianas secundárias (principalmente por *S. pseudintermedius*) (HORSMAN, 2023).

2.7 Setor de Acolhimento e Monitoramento Animal da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro: experiência de criação, implantação e estabelecimento do Projeto AMA no contexto da UFRRJ

O *campus* da UFRRJ em Seropédica, município da Baixada Fluminense do Rio de Janeiro, ocupa uma área de 4.113 hectares e conta com uma diversidade de espaços naturais e urbanizados. A marcante presença de cães errantes e comunitários no contexto do *campus* Seropédica da UFRRJ traz à discussão a problemática do controle e manejo populacional de animais abandonados. Não somente na UFRRJ, mas em muitas instituições públicas Federais o mesmo problema pode ser facilmente verificado, como no Instituto de Ciência e Biomodelos

da Fundação Oswaldo Cruz, no *campus* Cidade Universitária da Universidade Federal do Rio de Janeiro e no campus Capital-Butantã da Universidade de São Paulo. Apesar de ser um crime contra o meio ambiente, tipificado no artigo 32º da lei Nº 9.605 de 12 de fevereiro de 1998, com pena prevista de três meses a um ano e multa, o abandono de animais é uma prática ainda muito comum.

A ampla extensão do *campus* Seropédica da UFRRJ representa um enorme desafio no estabelecimento de estratégias voltadas ao manejo e controle das populações animais. Dentro da área mais central do campus existem alojamentos estudantis e vilas residenciais, habitadas por uma população humana residente e, conseqüentemente, uma população de animais domiciliados, mas que muitas vezes são abandonados em decorrência de doenças, prenhez e traumas. Esses abandonos internos são somados àqueles decorrentes da comunidade externa, que enxerga alguns espaços estratégicos do campus universitário como o local adequado para o abandono de animais indesejados sem maiores conseqüências. Esta temática não difere da encontrada nos diversos municípios dos Estados da Federação (MARS, 2024).

Institucionalizado em 2019, o Setor de Acolhimento e Monitoramento Animal (AMA) constitui-se em espaço institucional, sob a coordenação de responsável técnico médico veterinário, cujo objetivo é estabelecer protocolos para um manejo técnico efetivo da população de animais errantes da UFRRJ a fim de transformar o *campus* em um ambiente de baixo risco de abandono. Formado por uma equipe de docentes, técnicos administrativos, médicos veterinários e discentes de graduação e pós-graduação, o Setor AMA atua na mitigação de riscos de transmissão de zoonoses e acidentes por agressão nos espaços da Universidade, além de atuar diretamente sobre a problemática do abandono de animais.

O acolhimento dos animais errantes do *campus* permite a produção de dados sobre esta população de animais negligenciada, que pode oferecer riscos de saúde à comunidade universitária da UFRRJ. A ausência de controle populacional e sanitário da população de cães errantes favorece a circulação de doenças zoonóticas como raiva, ancilostomose, leishmaniose, leptospirose, toxoplasmose, bactérias multidroga-resistentes e mesmo doenças letais aos cães, como a cinomose (MOHAMMAD; AJAJ; GHARBAN, 2022). Além disso, a convivência com os animais errantes no ambiente universitário pode oferecer transtornos como agressões, atropelamentos e outros acidentes envolvendo os cães. Chama-se acolhimento o processo de recebimento do animal no Setor AMA, em que o cão é resgatado, alojado nas dependências do setor e é preenchida uma ficha de registro do animal com dados de identificação, características físicas e de temperamento, além do histórico clínico inicial.

O monitoramento sanitário é feito por meio de avaliações clínicas realizadas pela equipe de médicos veterinários em todos os cães acolhidos no setor, cães comunitários, cães errantes e animais domiciliados nas PNRs (Próprio Nacional Residencial) localizadas no campus Seropédica. Atuando simultaneamente como cenário educativo prático do curso de Medicina Veterinária da UFRRJ, os discentes de graduação e pós-graduação atuam conjuntamente nas atividades relacionadas à atenção à saúde dos cães no Setor AMA.

O trabalho do Setor AMA leva à diminuição dos riscos de transmissão de zoonoses, redução de acidentes por agressão e se configura em um importante cenário de ensino de graduação e pós-graduação, para o desenvolvimento de estudos que permitam a concepção de modelos de políticas de controle populacional e sanitário, que possam ser replicadas em diferentes espaços públicos para a solução dessa grave questão socioambiental.

2.8 Adoção e risco zoonótico de carreamento de genes de resistência à metilina

A adoção de animais é uma prática que contribui significativamente para a redução da população de cães abandonados, proporcionando-lhes um lar e cuidados adequados. No entanto, esse processo não está isento de desafios, especialmente no que tange a saúde pública e o risco zoonótico associado ao carreamento de genes de resistência. A crescente preocupação com a RAM reflete a complexidade desse fenômeno e a necessidade de uma abordagem cuidadosa na adoção de animais.

Os genes de RAM, presentes em bactérias patogênicas e ambientais, são uma ameaça crescente à saúde humana e animal. Esses genes podem ser transmitidos de animais para seres humanos através de várias vias, incluindo o contato direto e o ambiente compartilhado. Em contextos de abrigos e adoção, a exposição a animais com infecções resistentes pode representar um risco significativo, particularmente para indivíduos imunocomprometidos ou aqueles com condições de saúde pré-existent.

Cães de abrigos, especialmente aqueles com histórico de problemas de saúde, podem ser portadores de cepas bacterianas resistentes. A prevalência de tais cepas é uma preocupação crescente, uma vez que a resistência a antimicrobianos pode levar a infecções mais graves e difíceis de tratar. Evidências apontam que a convivência próxima entre humanos e animais adotados aumenta o potencial de transmissão dessas bactérias resistentes, destacando a necessidade de estratégias eficazes de controle e monitoramento (JIN et al., 2023).

Em 2004, pesquisadores europeus avaliaram a prevalência de *S. intermedius* em treze tutores de cães com piodermite profunda, comparando os isolados humanos e caninos através de eletroforese em gel de campo pulsado (PFGE, *pulsed-field gel electrophoresis*) (GUARDABASSI et al, 2014). Quarenta e seis por cento (seis em treze) dos tutores eram portadores de cepas de *S. intermedius* idênticas àqueles isoladas a partir dos cães. Além disso, foram encontrados isolados do mesmo tipo clonal em mais dois habitantes do domicílio de um dos tutores do grupo portador de *S. intermedius* idêntico ao de seu cão.

GUIMARÃES *et al.* (2023) identificaram os mesmos clones de *Staphylococcus pseudintermedius* em material coletado de lesões de dois cães com piodermite e de *swabs* nasais de seus tutores, sugerindo colonização pelo mesmo isolado. A partir do sequenciamento genético e análise de polimorfismos de nucleotídeo único (SNPs, single nucleotide polymorphism), foi possível determinar que os isolados compartilhados entre os cães e seus donos eram praticamente idênticos. Os autores destacaram o fato de que os animais dormiam na mesma cama que os tutores e que estes trabalhavam em serviços de assistência à saúde.

Em ambos os casos, a íntima proximidade entre cães e humanos no ambiente domiciliar pareceu favorecer o compartilhamento de cepas de *Staphylococcus* spp. Tal fato levanta questionamentos acerca dos riscos de compartilhamento de mecanismos de virulência e resistência entre patógenos e comensais de humanos e cães domésticos, favorecendo a emergência de novas cepas e infecções cruzadas, tanto em medicina humana quanto veterinária. O sentido da transferência de cepas ainda não está completamente elucidado, mas o fato de *Staphylococcus intermedius* e *S. pseudintermedius* serem habitualmente encontrados na microbiota de cães e raramente encontrados em seres humanos indica a transferência de bactérias de animais para os humanos. Nos casos de *S. aureus* isolados a partir de infecções de cães, a via é inversa, indicando transferência de bactérias do hospedeiro humano para o cão.

Altos índices de colonização por ECN-MR em *pets* acarretam altos riscos de transferência desses microrganismos entre cães e tutores. Alguns fatores predisponentes para a colonização por ECN-MR em cães são: histórico de quimioterapia antimicrobiana prolongada, histórico de hospitalização e existência de ao menos um profissional da assistência à saúde humana ou veterinária em convívio próximo (MISZCZAK et al., 2023).

Em 2023, Sarah Horsman e colaboradores apontaram que os mesmos clones de MRSP obtidos a partir de amostras de otite externa e piodermite canina foram encontrados na microbiota nasal de crianças portadoras de dermatite atópica, que residiam no mesmo domicílio. Posteriormente, os mesmos isolados encontrados nos quadros de pioderma canino e na

microbiota nasal das crianças foram observados em infecções de pele e tecidos moles nas crianças. A autora discute que o papel da colonização nasal de crianças por isolados MRSP caninos deve ser investigada mais a fundo, e teoriza que terapias de descolonização talvez possam ser necessárias para mitigar riscos de quadros infecciosos causados por MRSP nesse grupo de pacientes (HORSMAN *et al.*, 2023).

Para mitigar os riscos associados à adoção, é essencial que os abrigos adotem práticas rigorosas de controle de infecções e monitoramento da saúde dos animais. A realização de triagens de saúde, a implementação de medidas higiênico-sanitárias e a educação dos adotantes sobre os riscos da RAM são fundamentais para garantir a segurança de todos os envolvidos. Profissionais médicos e médicos veterinários devem estar prontos para orientar tutores sobre os riscos envolvidos no convívio domiciliar com animais e as medidas higiênicas necessárias. Além disso, promover a conscientização sobre o uso responsável de antimicrobianos tanto em animais quanto em humanos pode ajudar a prevenir o desenvolvimento e a propagação de resistência.

3. Objetivos

- Realizar um levantamento de espécies de *Staphylococcus* spp. presentes nas superfícies corporais de cães saudáveis e com lesões de piodermite não tratadas disponíveis para adoção no setor de acolhimento e monitoramento animal da UFRRJ;
- Avaliar a presença de *Staphylococcus* spp. metilina-resistente em um conjunto de amostras coletadas de cães disponíveis para adoção no setor de acolhimento e monitoramento animal da UFRRJ;
- Contribuir para o entendimento da distribuição do gene *mecA* entre as cepas estafilocócicas circulantes na população de cães do Setor AMA e investigar sua importância como reservatório epidemiológico para este gene.

4. Material e métodos

4.1 Coleta de amostras

Foram coletadas 65 amostras em *swabs* a partir de 5 pontos de coleta na superfície corporal de 15 cães hígidos acolhidos nas dependências do Setor de Acolhimento e Monitoramento Animal da UFRRJ, campus Seropédica. As coletas foram realizadas em acordo com as diretrizes estabelecidas pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro e aprovadas no processo Nº 6239180418.

As amostras foram coletadas dos seguintes sítios: orelha externa direita, orelha externa esquerda, pele interdigital, ambas as narinas e reto. Os animais selecionados não faziam uso de antimicrobianos, entretanto, alguns animais apresentavam histórico clínico de tratamentos anteriores. Após a coleta, as amostras foram transportadas ao Laboratório de Bacteriologia Veterinária (LABACVET), situado no Instituto de Veterinária da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, e o isolamento primário foi realizado no mesmo dia da coleta.

4.2 Isolamento primário

As amostras foram processadas no laboratório de bacteriologia veterinária da UFRRJ (LaBacVet – UFRRJ), com isolamento primário em ágar Columbia Base (Merck®) acrescido de 5% de sangue de carneiro desfibrinado, incubadas a 37 ° Celsius (°C) por 24 horas. Foram registradas características como presença ou ausência de pigmento, tamanho, formato geral e aspecto das colônias, assim como o tipo e a presença ou ausência de hemólise.

4.3 Identificação fenotípica

As colônias morfológicamente compatíveis com o gênero *Staphylococcus* spp. foram caracterizadas morfotintorialmente através da confecção de esfregaços das colônias bacterianas suspensas em salina a 0,85% e corados pela técnica de Gram. Os isolados correspondentes a morfologia de cocos Gram-positivos em arranjo de cacho de uvas, grumos ou tétrades foram subsequentemente encaminhados para a realização da identificação fenotípica através de provas bioquímicas.

4.3.a Ágar Manitol Vermelho de Fenol

Os isolados caracterizados como cocos Gram-positivos em arranjo de cacho de uvas foram repicadas em ágar seletivo Manitol Vermelho de Fenol (AMVF - Himedia®). O meio AMVF permite avaliar a capacidade do microrganismo de crescer em presença de alta concentração de sal (6, 5% de NaCl), bem como avalia sua capacidade de fermentar ou não o carboidrato manitol, cuja fermentação acidifica o meio, alterando a cor do indicador de pH de vermelho para o amarelo.

4.3.b Prova da catalase

A prova da catalase avalia a presença da enzima catalase e representa parte indispensável da identificação de cocos Gram-positivos em geral. A enzima catalase realiza o papel de proteção do microrganismo contra a imunidade celular do hospedeiro, neutralizando a ação oxidativa de defesa das células fagocitárias do sistema imunológico (FERNANDES *et al.*, 2021). Para realização do teste, uma gota de peróxido de hidrogênio (H_2O_2) a 3% é depositada sobre a lâmina de vidro e então adiciona-se uma colônia bacteriana. A conversão do H_2O_2 em $H_2O + 1/2 O_2$ pode ser observada através da intensa formação de bolhas, confirmando a presença da enzima catalase (KONEMAN, 2018).

4.3.c Fermentação dos açúcares manose e maltose

A fermentação dos carboidratos manose e maltose foi testada utilizando o caldo Vermelho de Fenol (Merck®) acrescido de 1% do açúcar. A produção de ácido, indicado pela diminuição do pH e consequente mudança de cor, foi avaliada após 24 horas na temperatura de 37 °C (KONEMAN, 2018).

4.3.d Prova da coagulase

Um dos critérios laboratoriais mais importantes na identificação das diferentes espécies de *Staphylococcus* spp. é a capacidade de um isolado promover ou não a coagulação do plasma por meio da ação da enzima coagulase. A enzima coagulase é um fator de virulência que interage com a protrombina presente no plasma sanguíneo, promovendo a transformação do fibrinogênio em fibrina e, conseqüentemente, a coagulação (FERNANDES *et al.*, 2021). No presente trabalho, utilizou-se a metodologia de detecção da coagulase extracelular através do teste em tubo de ensaio, com plasma desfibrinado de coelho (Coagulplasma, Laborclin®). Duas a quatro colônias puras são adicionadas a 500 µl de plasma de coelho e incubadas a 35±22°C por 4 a 24 horas. Após o tempo de incubação, os isolados capazes de formar o coágulo são classificados como coagulase-positivos.

4.3.e Prova de Voges-Proskauer

A Prova de Voges-Proskauer (VP) avalia a capacidade de um isolado bacteriano fermentar a glicose pela via butilenoglicólica. Para sua realização, foi utilizado o caldo MR-VP (*Methyl Red - Voges-Proskauer*, KASVI®). A utilização da glicose culmina na produção do metabólito acetoina, indicado pela formação de um complexo de cor rósea após adição de 0,1 mL de α -naftol a 5% e 0,3 mL de KOH (40%) ao caldo com inóculo incubado *overnight* (KONEMAN, 2018).

4.3.f Resistência intrínseca à bacitracina 0,04 UI

Uma suspensão bacteriana (1 mL) incubada por 24 horas em caldo BHI (Caldo *Brain Heart Infusion* – infusão de cérebro e coração, KASVI®) foi distribuída por toda a superfície de uma placa de Petri contendo ágar Müeller-Hinton (KASVI®), com o auxílio de um *swab*. Um disco de bacitracina 0,04 UI (SENSIFAR, CEFAR®) foi depositado sobre a superfície do meio, contendo o inóculo. Após incubação por 24 horas a 35 °C ± 2 °C, a zona de inibição ao redor do disco foi observada e medida. *Staphylococcus* spp. são resistentes à bacitracina e crescem até a borda do disco, enquanto os *Micrococcus* são sensíveis e apresentam halo de, no mínimo, 10 mm (KONEMAN, 2018).

4.3.g Identificação por MALDI-TOF MS

Os isolados foram identificados até o nível de espécie pela técnica do Espectrometria de Massas por Ionização/Dessorção a Laser Assistida por Matriz – Tempo de Voo (MALDI-TOF MS – *Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization Time of flight*) no Laboratório Integrado de Microbiologia (LIM), Instituto de Microbiologia Paulo Góes (IMPG) da Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ). Inicialmente, os isolados congelados foram reativados em ágar BHI a 37 °C por 24 horas. As colônias bacterianas puras foram então transferidas para uma microplaca (96 MSP, *Bruker - Billerica*®, EUA) e, sequencialmente, adicionou-se uma solução de lise (ácido fórmico 70%, *Sigma-Aldrich*®) em quantidade suficiente para cobrir o material bacteriano visível. 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*®) foi utilizado para cobrir a solução, para finalmente ser processado. Os espectros de cada amostra foram gerados em um espectrômetro de massa (MALDI-TOF LT *Microflex Bruker, Bruker*®) equipado com laser de 337 nm de nitrogênio no modo linear, controlado pelo programa *FlexControl 3.3 (Bruker*®). Os espectros foram coletados na faixa de massas entre 2.000-20.000 m/s e, posteriormente, analisados pelo programa MALDI *Biotyper 2.0 (Bruker*®), com as configurações padronizadas para identificação bacteriana. A técnica baseia-se na comparação automatizada entre os espectros de massa gerados pela análise da amostra com perfis espectrofotométricos de isolados com identificação conhecida registrados em banco de dados. A confiabilidade da identificação é dada em escala de zero a três. Em virtude da carência de dados nos registros do banco de dados acerca de espécies de *Staphylococcus* spp. provenientes de amostras de animais, as identificações classificadas pelo software *FlexControl 3.4* com score superior ou igual a 2.0 foram consideradas aceitáveis para a realização do presente trabalho.

4.4 Identificação genotípica

4.4.a Extração de DNA:

Os isolados estocados por congelamento foram reativados em ágar sangue de carneiro 5% para realização da extração do DNA bacteriano total. Uma a cinco colônias puras foram

suspensas em 1 mL de Caldo BHI (*KASVI*®) e incubados por 24 horas, a 35 ° C (+- 2°C). Em seguida, os caldos foram centrifugados por dois minutos e trinta segundos a 30.000G. O sobrenadante foi desprezado e o pellet contendo as células bacterianas foi suspenso em 500 µL de água destilada estéril, em microtubos do tipo *Eppendorf*. Os microtubos foram então aquecidos em banho-maria até a temperatura de 99 °C a fim de promover a lise térmica e a liberação do DNA total na solução. Foram, então, centrifugados a 30.000 g por um minuto. Finalmente, 180 µl do sobrenadante é transferido para novo microtubo e armazenado em congelamento a -20 °C (ZHANG, 2005; VELASCO, 2015).

4.4.b Caracterização genotípica através da detecção do gene 16s estafilocócico

A caracterização do gene 16S rRNA (756 pares de bases) foi realizada pela amplificação do material pela reação em cadeia da polimerase, utilizando iniciadores específicos para o gênero *Staphylococcus* spp. (ZHANG *et al.*, 2004).

Foram utilizadas as seguintes concentrações de reagentes nas reações de PCR: Tampão *DreamTaq* 10X (2,0 mM MgCl₂, *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 miliQ para completar o 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 1,5%. O marcador de tamanho molecular de DNA Lambda (*Sigma-Aldrich*™) foi utilizado.

4.4.c Detecção genotípica do gene *mecA* estafilocócico

A detecção do gene de resistência a beta-lactâmicos *mecA* foi realizada pela amplificação através da reação em cadeia da polimerase utilizando um iniciador universal para amplificação do gene *mecA* de diversos tipos, voltado para isolados de origem animal, conforme metodologia proposta por MELO *et al.*, 2020.

Foram utilizadas as seguintes concentrações de reagentes nas reações de PCR: Tampão *DreamTaq* 10X (2,0 mM MgCl₂, *Thermo Fischer Scientific*®), 0,5 mM de dNTP (*Invitrogen*®), 1,25 U *DreamTaq DNA Polimerase* (*Thermo Fischer Scientific*®), 0,4 µl de cada iniciador, água *miliQ* para completar o volume total de reação de 25 µl e 2 µl do DNA total liberado. Ao

produto da PCR foi adicionado *Loading-Buffer* Azul de Bromofenol e o corante SYBR® Green (Sigma-Aldrich®). Os fragmentos foram avaliados por eletroforese em gel de agarose a 1,5%, a 70mV por 40 minutos. Após a eletroforese a imagem das bandas formadas no gel foi capturada em Transiluminador UV LTB-STi (*Loccus*®).

4.5 Teste de sensibilidade aos antimicrobianos

Tabela 1: Pontos de corte utilizados para caracterização da resistência fenotípica à metilina (adaptado de CLSI VET01S-Ed, 2024).

Agente antimicrobiano	Conteúdo do disco	Espécie bacteriana	Diâmetro da zona de inibição (mm)	
Cefoxitina	30 µg	<i>S. aureus</i> e <i>S. lugdunensis</i>	≤ 21	≥ 22
		<i>S. epidermidis</i> e outros <i>Staphylococcus</i> spp.	≤24	≥25
Oxacilina	1 µg	<i>S. epidermidis</i> , <i>S. pseudintermedius</i> e <i>S. schleiferi</i>	≤17	≥18

Todos os isolados foram submetidos à técnica de disco-difusão com os antimicrobianos oxacilina e cefoxitina. 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 Ágar Mueller-Hinton (AMH - BD Difco™), onde foram depositados os discos de oxacilina (1 µg) (Cefar®). Após incubação por 18 horas a 35 ± 2 °C, os halos formados ao redor dos discos foram observados e os diâmetros medidos em milímetros. De acordo com o CLSI VET 01S ED7:2024, a triagem fenotípica de resistência mediada pelo gene *mecA* deve ser realizada de maneira diferente a depender da espécie de estafilococo avaliada. As espécies *S. aureus* e *S. lugdunensis* devem ser avaliadas com base na testagem com disco de cefoxitina (30 µg). Para tais espécies, isolados apresentando halos ≤21 mm e ≥22 devem ser considerados resistentes à metilina por ação do gene *mecA*. Para as espécies *S. pseudintermedius* e *S. schleiferi*, o antimicrobiano a ser testado deve ser a oxacilina (1 µg) e os isolados com halos ≤17 mm e ≥18 mm serão considerados resistentes à metilina, por ação do gene *mecA*. As demais espécies do gênero devem ser triadas com base na testagem da cefoxitina (30ug) e o ponto de corte aplicado será ≤24 e ≥25 mm.

5. Resultados

Foram processadas 65 amostras de cães saudáveis e disponíveis para adoção que à época estavam alojados nos canis externos do Setor AMA. A partir das 65 amostras, foram obtidos 82 isolados de *Staphylococcus* spp. As amostras coletadas foram *swabs* de orelha externa direita, orelha externa esquerda, pele interdigital, narinas e do reto.

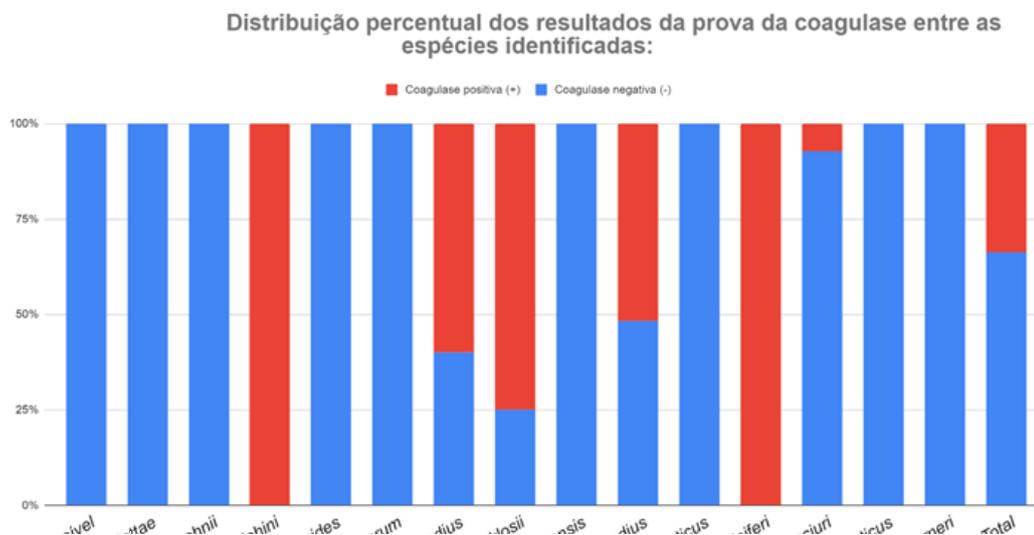
Todos os isolados foram submetidos a uma bateria de provas bioquímicas para identificação preliminar e comparação de dados. Sabe-se que o perfil bioquímico de diversas espécies coagulase-positivas e negativas podem ser altamente variáveis, de modo que os testes bioquímicos por si só não podem ser considerados uma forma confiável de identificação para *Staphylococcus* spp. ao nível de espécie.

A partir dos 65 *swabs* coletados, foram obtidos 130 isolados caracterizados como cocos Gram-positivos em arranjos irregulares. Em seguida procedeu-se a triagem fenotípica: foram encaminhados para identificação proteômica 83 isolados caracterizados como cocos Gram-positivos, em arranjos irregulares, catalase-positiva, resistentes à bacitracina 0.04 UI e capazes de crescer em meio AMVF. 28 isolados (33,7%) foram positivos no teste da coagulase em tubo, ao passo que 55 (66,3%) foram considerados negativos após 18-24 horas de incubação a 35°C ±2°.

A partir dos 83 isolados encaminhados ao MALDI-TOF MS, 82 foram identificados como *Staphylococcus* spp. de 13 espécies distintas. Um dos isolados não pode ser identificado pelo equipamento, não sendo encontrado perfil proteômico suficientemente compatível no banco de dados utilizado. Por apresentarem-se compatíveis com os caracteres fenotípicos selecionados para identificação preliminar de *Staphylococcus* spp., o isolado não identificado foi incluído nas análises genotípicas posteriores.

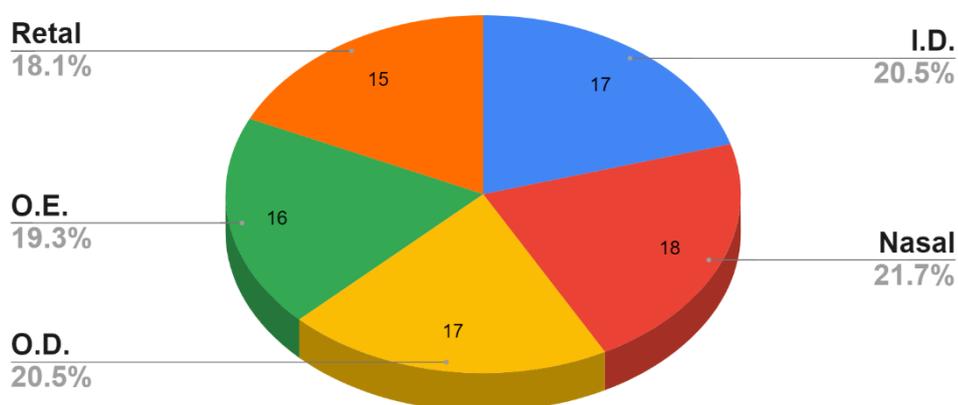
Dentre as espécies encontradas as únicas do grupo dos ECP foram *S. intermedius*, *S. pseudintermedius* e *S. delphini*. Seis isolados de *S. intermedius*, dezesseis isolados de *S. pseudintermedius* e um único isolado obtido de *S. delphini* apresentaram positividade no teste da coagulase em tubo.

Quadro 1: Distribuição percentual dos resultados da prova da coagulase.



Quadro 2: Gráfico de setores representando a quantidade de isolados MRS encontrados em cada um dos sítios de coleta.

Numero de isolados de Staphylococcus spp. obtidos em cada sítio de coleta



Após a identificação fenotípica e extração do DNA bacteriano total, todos os isolados, foram submetidos à confirmação genotípica do gênero *Staphylococcus* spp. através da detecção do *amplicon* 16S rRNA estafilocócico (756 pb). Como resultado, todas as amostras apresentaram o gene utilizado como marcador molecular para a identificação desse gênero, fornecendo dados para confirmação das identificações fenotípicas. A amostra sem identificação no MALDI-TOF MS também demonstrou positividade para a presença do *amplicon* relacionado à detecção da porção 16S do ribossomo estafilocócico.

A pesquisa genotípica em busca do gene *mecA* foi realizada para todos os isolados. Dezoito amostras, ou 21, 7% do total, foram positivas para a presença do gene *mecA*. As cinco amostras (6%) que exibiram resistência fenotípica à meticilina demonstraram ser portadoras do gene *mecA*. Além destas, outras 13 amostras (15,6%) portadoras do gene demonstraram sensibilidade à meticilina no Teste de Suscetibilidade aos Antimicrobianos (TSA) mesmo com presença da sequência homóloga de *mecA*.

Tabela 2: espécies bacterianas encontradas, número de isolados por espécie e número de isolados por espécie encontrados em cada sítio de coleta.

Espécie bacteriana	Isolados	Sítio de coleta das amostras
<i>Staphylococcus arlettae</i>	4	I.D.(1), Nasal (1), O.E.(1), O.D.(1)
<i>Staphylococcus cohnii</i>	1	Retal
<i>Staphylococcus delphini</i>	1	O.E.
<i>Staphylococcus equorum</i>	1	I.D.
<i>Staphylococcus intermedius</i>	10	O.D. (3) O.E. (3), Nasal (1), Retal (3)
<i>Staphylococcus kloosii</i>	4	I.D. (2), O.E. (1), O.D. (1),
<i>Staphylococcus nepalensis</i>	7	I.D. (4), O.E. (1), O.D. (1), Retal (1)

<i>Staphylococcus pseudintermedius</i>	31	Nasal (9), I.D. (4), O.D. (8), O.E. (5), Retal (5)
<i>Staphylococcus saprophyticus</i>	1	O.D.
<i>Staphylococcus sciuri</i>	14	Nasal (6), I.D. (3), Retal (1), O.D. (2), O.E. (2)
<i>Staphylococcus schleiferi</i>	1	Nasal
<i>Staphylococcus warneri</i>	3	Retal (3)
<i>Staphylococcus ureilyticus</i>	2	Retal (1), I.D. (1)
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	2	O.E (1), I.D. (1)
Não identificado	1	O.E.
TOTAL	83	

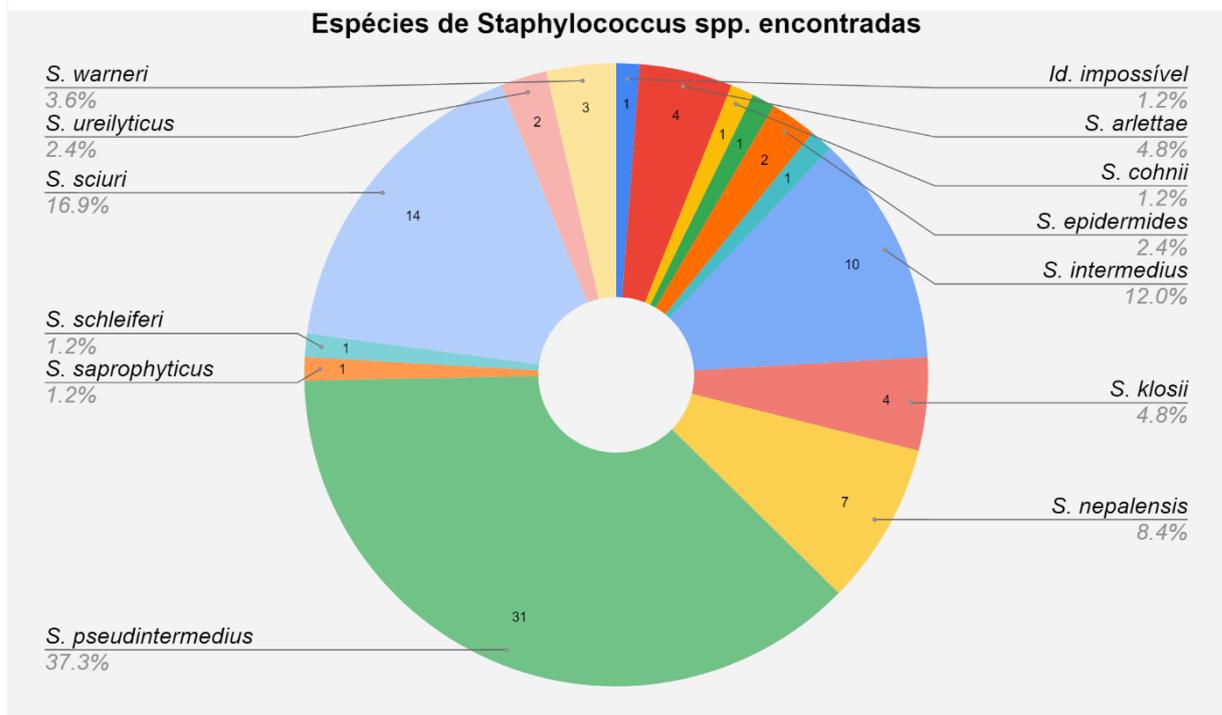
Tabela 3: Presença do gene *mecA* e fenótipo de resistência à meticilina por espécie.

Espécie	Quantidade de isolados <i>mecA</i> +	Isolados <i>mecA</i> + com resistência fenotípica
<i>S. equorum</i>	1	0
<i>S. intermedius</i>	1	0
<i>S. kloсии</i>	2	1
<i>S. pseudintermedius</i>	6	2
<i>Staphylococcus (Mammalicoccus) sciuri</i>	5	2
<i>S. ureilyticus</i>	1	0
<i>S. warneri</i>	2	0
Total:	18	5

6. Discussão

A espécie mais prevalente dentre as amostras estudadas foi *S. pseudintermedius*, corroborando os dados disponíveis na literatura científica que indicam esta espécie como a isolada com mais frequência em cães (MOSES; SANTOS; GALES, 2023). *S. intermedius*, espécie filogeneticamente relacionada, foi encontrada em dez amostras, e uma das amostras foi identificada como *S. delphini*, espécie isolada pela primeira vez em 1988, por Varaldo *et al.*, a partir de lesões purulentas de golfinhos. As três espécies pertencem ao Grupo *Staphylococcus intermedius*, um conjunto de espécies de ECP reconhecidas como importantes patógenos veterinários e patógenos emergentes em medicina humana. Somados os isolados pertencentes ao GSI, estes representam 50,6% do total de *Staphylococcus* spp. identificados no presente trabalho.

Quadro 3: Gráfico da frequência percentual encontrada para cada espécie estafilocócica obtida.



A identificação de *S. delphini* isolado a partir da orelha externa de um cão saudável também se configura como dado relevante, uma vez que a disponibilidade de informações sobre esta espécie ainda é limitada e a questão acerca de quem seriam seus hospedeiros naturais não

está completamente elucidada (GUARDABASSI *et al.*, 2012). Além disso, assim como outras espécies de *Staphylococcus* spp., *S. delphini* possui grande capacidade de transferência de elementos genéticos como plasmídeos, pró-fagos e fagos, além de importantes elementos de virulência como, por exemplo, um gene *sec* codificante de enterotoxina estafilocócica C (VRBOVSKÁ *et al.*, 2020).

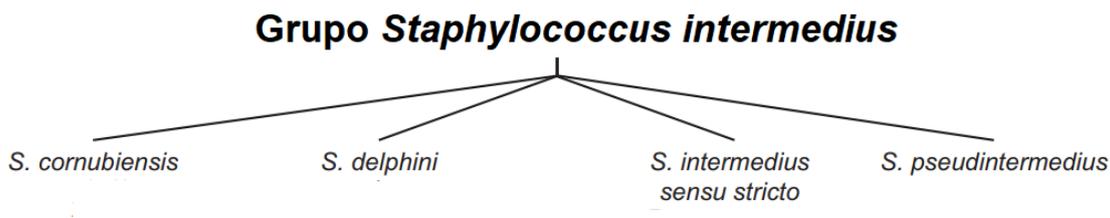


Figura 2: Representação conceitual do GSI (adaptado de MAGLEBY *et al.*, 2019).

Dentre os membros do GSI encontrados, apenas dois isolados de *S. pseudintermedius* exibiram resistência fenotípica à metilina, entretanto, um total de 6 *S. pseudintermedius* e 1 *S. intermedius* foram positivos para a presença do gene *mecA*. Os isolados do grupo GSI unidos representaram 38,9% do total de positivos para a presença do gene. A ausência de expressão fenotípica de *mecA* em 5 isolados GSI *mecA* positivos está provavelmente relacionada a mecanismos reguladores da transcrição, em especial os genes *mecI* e *mecRI*, ativando ou inibindo a produção de PBP2 de acordo com as condições do meio e ausência ou presença de estímulos estressores, como fármacos antimicrobianos. A mesma razão também pode explicar a presença relativamente baixa de resistência fenotípica entre todos os isolados obtidos, uma vez que os mecanismos de resistência estudados constituem mecanismos de sobrevivência bacteriana expressos diante de desafios, principalmente a antibioticoterapia. Outros fatores, como mutações em *loci* gênicos não relacionados a *mecA*, adaptações epigenéticas, fisiológicas e metabólicas, podem exercer influência sobre a expressão da resistência à metilina (IKHIMIUKOR *et al.*, 2023), constituindo um outro rol de variáveis a serem compreendidas em estudos vindouros. Os dados apontam a necessidade de maiores estudos sobre os elementos reguladores da expressão de *mecA* em isolados caninos de microbiota e processos patológicos, a fim de subsidiar um melhor entendimento da emergência de fenótipos multidroga resistentes no contexto subclínico e clínico.

Devido à escassez de estudos voltados ao levantamento de espécies colonizantes em cães saudáveis, a disponibilidade de dados para comparação é limitada. Em estudo realizado

em animais de abrigo no Quênia não foram encontrados isolados MRSP, mesmo dentre animais acometidos de pioderma canino (AKARSU *et al.*, 2024). Em levantamento bibliográfico realizado com mais de 300 artigos publicados em periódicos científicos, encontrou 3,1% de prevalência de MRSP em estudos anteriores. O autor destaca a influência de fatores como a escassez de estudos sobre prevalência de MRSP em animais e humanos, e as dificuldades de identificação de isolados do grupo GSI até o nível taxonômico de espécie como entraves ao entendimento preciso da prevalência de MRSP em cães (ABDULLAHI *et al.*, 2022).

Não foi isolado nenhum *Staphylococcus aureus* a partir do *pool* amostral trabalhado. Segundo a literatura científica, este fato pode ser explicado em função da afinidade dessa espécie a outros hospedeiros humanos e animais, sendo o *S. pseudintermedius* preponderante na microbiota canina. O levantamento de Akarsu e colaboradores encontrou alta prevalência (48,45%) de quatro tipos clonais de *S. aureus* (47/97) com grande similaridade genômica com tipos clonais isolados a partir de infecções humanas (AKARSU *et al.*, 2024). Neste trabalho, o autor pondera que a disseminação de poucos tipos clonais naquele ambiente foi indicativa de transmissão antropozoonótica de *S. aureus*, a partir de humanos e eventualmente colonizando os cães abrigados. A ausência de isolados de *S. aureus* nos cães saudáveis do Setor AMA indica que esse tipo de colonização antropozoonótica provavelmente não ocorreu naquele ambiente até o presente estudo, destacando a necessidade de medidas preventivas.

Somadas as espécies, 49,6% dos isolados encontrados corresponderam à ECN. Mesmo sendo microrganismos considerados menos patogênicos, a população de ECN canina representa um importante reservatório de genes de virulência e de resistência. Algumas espécies de ECN são naturalmente portadores de genótipos de resistência à meticilina, além de poderem abrigar genes de resistência a metais pesados e genes de virulência produtores de enterotoxinas e superantígenos. Onze (61,1%) das 18 amostras *mecA* positivas foram encontradas dentre os isolados ECN, *S. equorum* (1), *S. klosii* (2), *Mammalicoccus sciuri* (5), *S. ureilyticus* (1) e *S. warneri* (2).

A detecção de um isolado de *Staphylococcus schleiferi* positivo na prova da coagulase em tubo caracteriza o microrganismo como *S. schleiferi subsp. coagulans*, bactéria relacionada a casos de otite externa e piodermite canina. Esse microrganismo não é frequentemente encontrado em animais saudáveis, segundo a literatura, com prevalência entre 0,8 a 4% dos cães clinicamente saudáveis (HANSELMAN *et al.*, 2009; GREENE, 2015). *S. schleiferi subsp. coagulans* é um exemplo de ECP negligenciado no diagnóstico microbiológico de rotina, mas que pode desempenhar papel importante na emergência de RAM. A caracterização de sua

circulação em ambientes de abrigo de cães suscita estudos posteriores a partir da perspectiva de Saúde Única.

Mammaliicoccus sciuri foi a terceira espécie encontrada com maior frequência dentre as amostras pesquisadas. Recentemente separada do gênero *Staphylococcus* e reclassificada como *Mammaliicoccus sciuri* (MADHAIYAN *et al.*, 2020), a espécie desperta interesse em função da presença de um homólogo de *mecA* nativo sendo considerada um reservatório natural deste gene. Evolutivamente, a espécie é implicada na origem da transferência do gene de resistência à meticilina para *S. aureus* e as demais espécies de *Staphylococcus* (DEURENBERG *et al.*, 2007). Em um estudo de 2024, dentre um total de 183 genomas de *Mammaliicoccus sciuri* analisados, aproximadamente 30% dos *SCCmec* encontrados apresentaram notável semelhança genética com *SCCmec* provenientes de *S. aureus*, *S. capitis*, *S. pseudintermedius* e outros estafilococos resistentes à meticilina de origem animal e humana (CARVALHO; GIAMBIAGI-DEMARVAL; ROSSI, 2024). Apesar da recente reclassificação taxonômica sugerir um afastamento filogenético, as evidências mais recentes indicam a grande relevância de *Mammaliicoccus sciuri* para a compreensão dos mecanismos evolutivos e da dinâmica de RAM no gênero *Staphylococcus*. Além disso, apesar de ser considerado um patógeno humano infrequente, *Mammaliicoccus sciuri* apresenta potencial zoonótico que, somado à sua distribuição ubíqua e importante capacidade de troca gênica (NEMEGHAIRE *et al.*, 2014), sua presença no ambiente do setor AMA inspira medidas de vigilância.

Além disso, espécies de ECN como *S. cohnii*, *S. arlettae* e *S. nepalensis* abrigam, em seu arsenal genômico, capacidades metabólicas e fisiológicas de interesse para a indústria alimentícia, em especial na indústria cárnea e de laticínios, potencial como cepas probióticas atuando como reguladores da microbiota da epiderme em pacientes com dermatopatias e potencial como cepas de biorremediação, agindo no tratamento de resíduos de metais pesados. Conhecer a diversidade de espécies ECN presentes na microbiota de animais saudáveis pode fornecer dados para subsidiar a futura exploração de seu potencial biotecnológico, médico e econômico.

Embora a circulação e eventuais infecções causadas por MRS em animais de companhia estejam bem caracterizadas, ainda é difícil encontrar dados sobre colonização de cães saudáveis. A maioria dos estudos realizados utilizam amostras de lesões clínicas em cães e gatos para detecção de MRS, introduzindo o processo patológico em si como variável marcante na análise. Alguns estudos apontam que menor diversidade de espécies de *Staphylococcus* spp. é observada na microbiota de animais doentes, em comparação com animais saudáveis. Em estudo realizado

em animais da Serra Gaúcha (MOYSES, 2024), dos 90 *Staphylococcus* spp. isolados a partir de cães domiciliados, 86,2% foram identificados como *S. pseudintermedius*, e a frequência de MRS observada foi de 22%. Comparativamente, o presente trabalho observou em 83 isolados de animais de abrigo a prevalência de *S. pseudintermedius* de 37, 35%, e prevalência de MRS circulante de 21, 6%. A infecção por MRS introduz elementos ainda não inteiramente compreendidos à regulação da microbiota comensal e determina um supercrescimento do agente infeccioso em relação às demais espécies. Tratando-se de cenários de abrigos para animais de companhia, os dados disponíveis são ainda mais limitados, tanto em função do viés supracitado, quanto pela limitada disponibilidade de recursos humanos e financeiros para atuação nestes espaços cruciais do ponto de vista da Saúde Única. Além disso, as influências ambientais e de manejo a que estão submetidos os diferentes abrigos pelo mundo criam contextos diferenciados que afetam grandemente a diversidade de espécies presentes e os níveis de RAM (ABDULLAHI, 2022), demonstrando a necessidade de monitoramento regional individual e comparativo entre abrigos (AKARSU, 2024).

7. Conclusões

- Humanos podem introduzir cepas bacterianas em ambientes de abrigo e cuidados à saúde animal, alterando a microbiota animal e predispondo à incidência de doenças;
- A presença de *Staphylococcus* spp. meticilina-resistentes no Setor AMA traz à luz a necessidade de medidas de monitoramento microbiológico de rotina em contextos de abrigos para animais de companhia, inclusive com a realização periódica de culturas de vigilância para detecção de MRS circulantes no ambiente.
- Novos estudos se fazem necessários para determinar a prevalência de cepas MRS em cães saudáveis, tanto de companhia quanto errantes e de abrigos, de forma regionalizada, a fim de fornecer dados para melhor compreensão da dinâmica da resistência à meticilina em animais de companhia;
- É urgente a adoção de medidas de *Stewardship* de antimicrobianos na prática clínica da medicina veterinária de abrigos, a fim de mitigar a pressão seletiva sobre cepas meticilina-resistentes;
- No contexto da UFRRJ, o Setor AMA contribui como espaço de aprimoramento do profissional médico veterinário e produção de dados científicos sobre a circulação de patógenos e genes de resistência em populações de cães negligenciados;
- A adoção responsável envolve não só a conscientização sobre a guarda responsável de cães e gatos, mas também um conjunto de ações pedagógicas fundamentadas nos princípios de Saúde Única junto aos adotantes para mitigação de riscos zoonóticos.

8. Referências

1. AKARSU, H. et al. Canine Staphylococcaceae circulating in a Kenyan animal shelter. *Microbiology Spectrum*, v. 12, n. 2, 2024. DOI: <https://doi.org/10.1128/spectrum.02924-23>.
2. ADEBOWALE, O. et al. Systematic review and meta-analysis of veterinary-related occupational exposures to hazards. *Open Veterinary Science*, v. 2, n. 1, p. 6–22, 1 jan. 2021.
3. ALFOUZAN, W. et al. Molecular Characterization of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* in a Tertiary Care hospital in Kuwait. *Scientific Reports*, v. 9, n. 1, 2019. DOI: <https://doi.org/10.1038/s41598-019-54794-8>.
4. ALGHAMDI, B. A. et al. Antimicrobial Resistance in methicillin-resistant *Staphylococcus Aureus*. *Saudi Journal of Biological Sciences*, v. 30, n. 4, p. 103604, fev. 2023.
5. ALVES, M. F. N. F. et al. First report of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* harboring mecC gene in milk samples from cows with mastitis in southeastern Brazil. *Brazilian Journal of Microbiology*, v. 51, n. 4, p. 2175–2179, 21 out. 2020.
6. ASSOCIATION OF SHELTER VETERINARIANS (ASV). The Association of Shelter Veterinarians' Guidelines for Standards of Care in Animal Shelters. Segunda edição. Dezembro de 2022. Disponível em: <https://jsmcah.org/index.php/jasv/article/view/42/19>. Acesso em: 20 ago. 2024
7. BANNOEHR, J.; GUARDABASSI, L. *Staphylococcus pseudintermedius* in the dog: taxonomy, diagnostics, ecology, epidemiology and pathogenicity. *Veterinary Dermatology*, v. 23, n. 4, p. 253-e52, 19 abr. 2012.
8. BAUER, A. W.; KIRBY, W. M. M.; SHERRIS J. C.. Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. *Am. J. Clin. Pathol.* 36:493-496.
9. BERTELLONI, F.; CAGNOLI, G.; BRESCIANI, F.. Antimicrobial resistant coagulase-negative staphylococci carried by house flies (*Musca domestica*) captured in swine and poultry farms. *Antibiotics*, v. 12, p. 636, 2023. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/antibiotics12040636>. Acesso em: 20 ago. 2024.
10. BOGLIOLO, L. *Patologia Geral*. 5ª Edição. 2013. Guanabara Koogan.
11. BRADLEY, C. W. et al. Longitudinal Evaluation of the Skin Microbiome and Association with Microenvironment and Treatment in Canine Atopic

- Dermatitis. *Journal of Investigative Dermatology*, v. 136, n. 6, p. 1182–1190, jun. 2016. doi: 10.1016/j.jid.2016.01.023.
12. BRASIL. Lei nº 9.605, de 12 de fevereiro de 1998. Dispõe sobre as sanções penais e administrativas derivadas de condutas e atividades lesivas ao meio ambiente. *Diário Oficial da União*, Brasília, DF, 13 fev. 1998.
 13. CALAZANS-SILVA, A. C. et al. Genetic analysis of *mecA* gene and detection of homologue *pbpD* in *Staphylococcus sciuri* group. *Brazilian Journal of Microbiology*, v. 45, n. 2, p. 651–655, jun. 2014.
 14. CARROLL, K. C. et al. *Manual of clinical microbiology*. Washington, DC: ASM Press, 2019.
 15. CARROLL, K. C.; BURNHAM, C.-A. D.; WESTBLADE, L. F. From canines to humans: Clinical importance of *Staphylococcus pseudintermedius*. v. 17, n. 12, p. e1009961–e1009961, 2 dez. 2021.
 16. CARVALHO, A. de; GIAMBIAGI-DEMARVAL, M.; ROSSI, C. C.. Mammaliicoccus *sciuri*'s Pan-Immune System and the Dynamics of Horizontal Gene Transfer Among *Staphylococcaceae*: a One-Health CRISPR Tale. *The Journal of Microbiology*, 22 jul. 2024.
 17. CLSI. *Performance Standards for Antimicrobial Disk and Dilution Susceptibility Tests for Bacteria Isolated from Animals*. 7th ed. CLSI supplement VET01S. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute, 2024.
 18. CHEUNG, G. Y. C.; BAE, J. S.; OTTO, M. Pathogenicity and virulence of *Staphylococcus aureus*. *Virulence*, v. 12, n. 1, p. 547–569, 31 jan. 2021.
 19. CONSELHO FEDERAL DE MEDICINA VETERINÁRIA, Diretrizes de atuação para a responsabilidade técnica em abrigos. 2023. Disponível em: <https://www.cfmv.gov.br/wp-content/uploads/2023/10/Diretrizes-de-RT-de-Abrigos.pdf>. Acesso em 16 de agosto de 2024.
 20. DAVIS, J. A. et al. Carriage of methicillin-resistant staphylococci by healthy companion animals in the US. *Letters in Applied Microbiology*, v. 59, n. 1, p. 1–8, 1 jul. 2014.
 21. DE MELO, D. A. et al. Impairments of *mecA* gene detection in bovine *Staphylococcus* spp. *Brazilian Journal of Microbiology*: [publication of the Brazilian Society for Microbiology], v. 45, n. 3, p. 1075–1082, 2014.

22. DE MOURA, G. S. et al. Emergence of livestock-associated *Mammaliicoccus sciuri* ST71 co-harboring *mecA* and *mecC* genes in Brazil. *Veterinary Microbiology*, v. 283, p. 109792, 1 ago. 2023.
23. DE MELO, D. A. et al. Accuracy of PCR universal primer for methicillin-resistant *Staphylococcus* and comparison of different phenotypic screening assays. *Brazilian Journal of Microbiology*, v. 51, n. 1, p. 403–407, 29 out. 2019.
24. DEMAIN, A. L.; ELANDER, R. P. The beta-lactam antibiotics: past, present, and future. *Antonie Van Leeuwenhoek*, v. 75, n. 1-2, p. 5–19, 1 jan. 1999.
25. DEURENBERG, R. H. et al. The molecular evolution of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Clinical Microbiology and Infection*, v. 13, n. 3, p. 222–235, mar. 2007.
26. EPSTEIN, C. R. et al. Methicillin-resistant commensal staphylococci in healthy dogs as a potential zoonotic reservoir for community-acquired antibiotic resistance. *Infection, Genetics and Evolution*, v. 9, n. 2, p. 283–285, mar. 2009.
27. CHEHIDA, F. B. et al. New Insights into Molecular Characterization, Antimicrobial Resistance and Virulence Factors of Methicillin-Sensitive Coagulase-Positive *Staphylococcus* spp. from Dogs with Pyoderma and Otitis Externa. *Microbiology Research*, v. 15, n. 3, p. 1208–1224, 12 jul. 2024.
28. FERNANDES, G. et al. Main laboratory methods used for the isolation and identification of *Staphylococcus* spp. *Rev. Colomb. Cienc. Quím. Farm*, v. 50, n. 1, p. 5–28, 2021.
29. Fiocruz. Saúde Única na Fiocruz. Instituto de Ciência e Tecnologia em Biomodelos (ICTB). Disponível em: <https://www.ictb.fiocruz.br/saude-unica-na-fiocruz> acesso em 25/03/2023.
30. GOULD, A. P. et al. Recovery of methicillin-resistant *Staphylococcus* species from pet-grooming salons. *Veterinary Dermatology*, v. 31, n. 4, p. 262, 6 fev. 2020.
31. GREENE, E. C.. Doenças infecciosas em cães e gatos. 4. Rio de Janeiro. Ed. Roca, 2015. ISBN 978-85-277-2725-9.
32. GUARDABASSI, L. et al. Mustelidae are natural hosts of *Staphylococcus delphini* group A. *Veterinary Microbiology*, v. 159, n. 3-4, p. 351–353, out. 2012.
33. GUARDABASSI, L.; JENSEN, L. B.; KRUSE, H. Guide to antimicrobial use in animals. Blackwell Pub., 2008.

34. GUARDABASSI, L.; LOEBER, M. E.; JACOBSON, A. Transmission of multiple antimicrobial-resistant *Staphylococcus intermedius* between dogs affected by deep pyoderma and their owners. *Veterinary Microbiology*, v. 98, n. 1, p. 23–27, jan. 2004.
35. GUIMARÃES, L. et al. Epidemiologic case investigation on the zoonotic transmission of Methicillin-resistant *Staphylococcus pseudintermedius* among dogs and their owners. *Journal of Infection and Public Health*, v. 16, p. 183–189, 2023. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jiph.2023.10.041>.
36. HANSELMAN, B. A. et al. Coagulase positive staphylococcal colonization of humans and their household pets. *The Canadian Veterinary Journal*, v. 50, n. 9, p. 954–958, 1 set. 2009.
37. HANSELMAN, B. A.; KRUTH, S.; WEESE, J. S. Methicillin-resistant staphylococcal colonization in dogs entering a veterinary teaching hospital. *Veterinary Microbiology*, v. 126, n. 1-3, p. 277–281, jan. 2008.
38. HANSEN, A. M.; SOLLID, J. U. E. *SCCmec* in staphylococci: genes on the move. *FEMS Immunology & Medical Microbiology*, v. 46, n. 1, p. 8–20, fev. 2006.
39. HENNEKINNE, J. A.; DE BUYSER, M. L.; DRAGACCI, S. *Staphylococcus aureus* and its food poisoning toxins: characterization and outbreak investigation. *FEMS Microbiology Reviews*, v. 36, n. 4, p. 815–836, jul. 2012.
40. HILLIER, A. et al. Guidelines for the diagnosis and antimicrobial therapy of canine superficial bacterial folliculitis (Antimicrobial Guidelines Working Group of the International Society for Companion Animal Infectious Diseases). *Veterinary Dermatology*, v. 25, n. 3, p. 163-e43, 11 abr. 2014.
41. HIRAMATSU, K. et al. Multi-drug-resistant *Staphylococcus aureus* and future chemotherapy. *Journal of Infection and Chemotherapy*, v. 20, n. 10, p. 593–601, out. 2014.
42. HOLMSTROM, T. C. N., DAVID, L. A., MOTTA, C. C. Methicillin-resistant *Staphylococcus pseudintermedius*: an underestimated risk at pet clinic. *Brazilian Journal of Veterinary Medicine*, 42, e107420. DOI: <https://doi.org/10.29374/2527-2179.bjvm107420>.
43. HORSMAN, S. et al. Nasal microbiota profiles in shelter dogs with dermatological conditions carrying methicillin-resistant and methicillin-sensitive *Staphylococcus* species. *Scientific Reports*, v. 13, n. 1, 2023. DOI: <https://doi.org/10.1038/s41598-023-31385-2>.

44. IKHIMIUKOR, O. O. et al. Leaky barriers to gene sharing between locally co-existing coagulase-negative *Staphylococcus* species. *Communications biology*, v. 6, n. 1, 3 maio de 2023.
45. ITO, T. et al. Guidelines for Reporting Novel *mecA* Gene Homologues. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v. 56, n. 10, p. 4997–4999, 1 out. 2012.
46. JESUMIRHEWE, C. et al. Genetic Characterization of Antibiotic-Resistant *Staphylococcus* spp. and *Mammaliicoccus sciuri* from Healthy Humans and Poultry in Nigeria. *Antibiotics*, v. 13, n. 8, p. 733–733, 5 ago. 2024.
47. KLOOS, W. E.; SCHLEIFER, K. H. Genus IV - *Staphylococcus*. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. Baltimore: [s. n.], 1994. p. 1.013–1.035.
48. KONEMAN, E. W.; ALLEN, S. D.; JANDA, W. M. *Diagnóstico microbiológico: texto e atlas colorido*. 7. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2008.
49. LAKHUNDI, S.; ZHANG, K. Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*: Molecular Characterization, Evolution, and Epidemiology. *Clinical Microbiology Reviews*, v. 31, n. 4, 12 set. 2018.
50. LARSEN, J. et al. Emergence of methicillin resistance predates the clinical use of antibiotics. *Nature*, v. 602, p. 1–7, 5 jan. 2022.
51. LARSSON, D. G. J.; FLACH, C.-F. Antibiotic resistance in the environment. *Nature Reviews Microbiology*, v. 20, n. 5, p. 1–13, 4 nov. 2021.
52. LIENEN, T. et al. Multidrug-resistant *Staphylococcus cohnii* and *Staphylococcus urealyticus* isolates from German dairy farms exhibit resistance to beta-lactam antibiotics and divergent penicillin-binding proteins. *Scientific Reports*, v. 11, n. 1, 2021. DOI: <https://doi.org/10.1038/s41598-021-85461-6>.
53. MADHAIYAN, M., WIRTH, J. S., & SARAVANAN, V. S. Phylogenomic analyses of the *Staphylococcaceae* family suggest the reclassification of five species within the genus *Staphylococcus* as heterotypic synonyms, the promotion of five subspecies to novel species, the taxonomic reassignment of five *Staphylococcus* species to *Mammaliicoccus* gen. nov., and the formal assignment of *Nosocomiicoccus* to the family *Staphylococcaceae*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 2020 70, 5926–5936.
54. MAGLEBY, R. et al. First reported human isolation of *Staphylococcus delphini*. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, v. 94, n. 3, p. 274–276, jul. 2019.

55. MAMIZUKA, E. M. et al. Staphylococcal cassette chromosome *mec* elements from *Staphylococcus intermedius* group (SIG) isolates from dogs in a center for veterinary diagnostics in Brazil. *Ciência Rural*, v. 51, n. 9, 2021. DOI: <https://doi.org/10.1590/0103-8478cr20200936>.
56. MARKEY, B.; LEONARD, F.; ARCHAMBAULT, M. *Clinical Veterinary Microbiology*. 2. ed. St. Louis: Elsevier Health Sciences, 2013. 656 p.
57. MARS. Índice do Abandono Animal Brasil. Disponível em: <https://bra.mars.com/sites/g/files/jydp426/files/2024-03/Mars%20%C3%8Dndice%20do%20Abandono%20Animal%20Brasil.pdf>. Acesso em: 16 ago. 2024.
58. McVEY, D. S. et al. *Microbiologia Veterinária*. 3 ed. Guanabara-Koogan, 2016. 632 p.
59. MELO, D. A. et al. Accuracy of PCR universal primer for methicillin-resistant *Staphylococcus* and comparison of different phenotypic screening assays. *Brazilian Journal of Microbiology*, v. 51, n. 1, p. 403–407, 2020. DOI: <https://doi.org/10.1007/s42770-019-00171-6>.
60. MELO, D. A. Implicações da utilização de parâmetros humanos na detecção do gene *mecA* em *Staphylococcus* spp. isolados de mastite bovina e seus impactos na predição da resistência aos beta-lactâmicos em ambientes de produção leiteira. 2013. 63 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias) - Instituto de Veterinária, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, 2013.
61. MÉRIC, G. et al. Ecological Overlap and Horizontal Gene Transfer in *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis*. *Genome Biology and Evolution*, v. 7, n. 5, p. 1313–1328, 16 abr. 2015.
62. MILLER, J. M. et al. A Guide to Utilization of the Microbiology Laboratory for Diagnosis of Infectious Diseases: 2018 Update by the Infectious Diseases Society of America and the American Society for Microbiology. *Clinical Infectious Diseases*, v. 67, n. 6, p. e1–e94, 2018. DOI: <https://doi.org/10.1093/cid/ciy381>.
63. MISZCZAK, M. et al. Colonization of methicillin-resistant *Staphylococcus* species in healthy and sick pets: prevalence and risk factors. *BMC Veterinary Research*, v. 19, n. 1, 18 jul. 2023.
64. MLYNARCZYK-BONIKOWSKA, B. et al. Molecular Mechanisms of Drug Resistance in *Staphylococcus aureus*. *International Journal of Molecular Sciences*, v. 23, n. 15, p. 8088, 1 jan. 2022.

65. MOTTA, C. C.. Análise genotípica e proteômica na identificação de *Staphylococcus* spp. coagulase-positivos isolados do leite e sua cadeia produtiva e caracterização da resistência a beta-lactâmicos. 2014. 76 p. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias). Instituto de Veterinária, Departamento de Parasitologia Animal, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2014.
66. MOHAMMAD, H. A.; AJAJ, E. A.; GHARBAN, H. A. J. The first study on confirmation and risk factors of acute and chronic canine distemper in stray dogs in Wasit Province, Iraq, using enzyme-linked immunosorbent assay and reverse transcription-polymerase chain reaction. *Veterinary World*, p. 968–974, 18 abr. 2022.
67. MOSES, I. B.; SANTOS, F. F.; GALES, A. C. Human Colonization and Infection by *Staphylococcus pseudintermedius*: An Emerging and Underestimated Zoonotic Pathogen. *Microorganisms*, v. 11, n. 3, p. 581, 25 fev. 2023.
68. MOYSES, A. B. Resistência antimicrobiana de *Staphylococcus* spp. isolados de cães e gatos da região da Serra Gaúcha. 2023. 75 f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) – Universidade de Caxias do Sul, Caxias do Sul, 2023. Disponível em: <https://repositorio.ucs.br/handle/11338/11542>. Acesso em: 28 ago. 2024.
69. MURRAY, A. K. et al. *Staphylococcus cornubiensis* sp. nov., a member of the *Staphylococcus intermedius* group (SIG). *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, v. 68, n. 11, p. 3404–3408, 2018. DOI: <https://doi.org/10.1099/ijsem.0.002992>.
70. MURUGAIYAN, J. et al. Species differentiation within the *Staphylococcus intermedius* group using a refined MALDI-TOF MS database. *Clinical Microbiology and Infection*, v. 20, n. 10, p. 1007–1015, 2014. DOI: <https://doi.org/10.1111/1469-0691.12662>.
71. NASCIMENTO, C. et al. Methicillin-resistant *Staphylococcus pseudintermedius*: an underestimated risk at pet clinic. *Brazilian Journal of Veterinary Medicine/Revista Brasileira de Medicina Veterinária*, v. 42, 1 jan. 2020.
72. NEMEGHAIRE, S. et al. The ecological importance of the *Staphylococcus sciuri* species group as a reservoir for resistance and virulence genes. *Veterinary Microbiology*, v. 171, n. 3-4, p. 342–356, jul. 2014.
73. TCHAMBA, C. N. et al. Comparison of the Staphylococcal Chromosome Cassette (SCC) mec in Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) and Non-aureus Staphylococci (MRNAS) from Animals and Humans. *Antibiotics*, v. 10, n. 3, p. 256, 4 mar. 2021.

74. PARTE, A. C., CARBASSE, J. S., MEIER-KOLTHOFF, J. P. List of Prokaryotic names with Standing in Nomenclature (LPSN) moves to the DSMZ. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 70, 2020. 5607-5612; DOI: [10.1099/ijsem.0.004332/](https://doi.org/10.1099/ijsem.0.004332/). Acesso em 20/08/2024.
75. PERRETEN, V.; KANIA, S. A.; BEMIS, D. *Staphylococcus ursi* sp. nov., a new member of the ‘*Staphylococcus intermedius* group’ isolated from healthy black bears. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, v. 70, n. 8, p. 4637–4645, 2020. DOI: <https://doi.org/10.1099/ijsem.0.004324/>.
76. PIROLO, M. et al. A LAMP point-of-care test to guide antimicrobial choice for treatment of *Staphylococcus pseudintermedius* pyoderma in dogs. *The Veterinary Journal*, v. 304, p. 106105–106105, 1 abr. 2024.
77. ROBBINS, S. L.; COTRAN R. S.; KUMAR, V. *Patologia Estrutural e Funcional*. 6ª ed., Rio de Janeiro. Guanabara Koogan, 2000.
78. RØKEN, M. et al. Transmission of Methicillin-Resistant *Staphylococcus* spp. from Infected Dogs to the Home Environment and Owners. *Antibiotics*, v. 11, n. 5, p. 637, 10 maio de 2022.
79. FITZGERALD, J. R. The *Staphylococcus intermedius* group of bacterial pathogens: species re-classification, pathogenesis and the emergence of methicillin resistance. *Veterinary Dermatology*, v. 20, n. 5-6, p. 490–495, out. 2009.
80. RUIZ, R. et al. Staphylococcal cassette chromosome mec elements from *Staphylococcus intermedius* group (SIG) isolates from dogs in a center for veterinary diagnostics in Brazil. *Ciência Rural*, v. 51, n. 9, 1 jan. 2021.
81. SILVA, A. C. C.. Caracterização de *Staphylococcus* do grupo sciuri e análise fenogenotípica da resistência à oxacilina em isolados de roedores e equinos do Instituto Biológico do Exército. 2013. 42 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias) - Instituto de Veterinária, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, 2013.
82. SILVA, J. G. et al. First report of a livestock-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* ST126 harbouring the *mecC* variant in Brazil. *Transboundary and Emerging Diseases*, v. 68, n. 3, p. 1019–1025, 17 ago. 2020.
83. SOARES, L. C.. Caracterização fenotípica da resistência aos antimicrobianos e detecção do gene *mecA* em *Staphylococcus* spp. coagulase negativos isolados de amostras animais e humanas. 2007. 73 f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia

- Veterinária) - Instituto de Veterinária, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica - RJ, 2007.
84. TSUBAKISHITA, S. et al. Origin and molecular evolution of the determinant of methicillin resistance in staphylococci. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v. 54, n. 10, p. 4352–4359, 1 out. 2010.
 85. UBUKATA, K.; YAMASHITA, N.; KONNO, M. Occurrence of a beta-lactam-inducible penicillin-binding protein in methicillin-resistant staphylococci. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v. 27, n. 5, p. 851–857, 1 maio 1985.
 86. UDDIN, T. M. et al. Antibiotic Resistance in microbes: History, mechanisms, Therapeutic Strategies and Future Prospects. *Journal of Infection and Public Health*, v. 14, n. 12, 23 out. 2021.
 87. UEHARA, Y. Current Status of Staphylococcal Cassette Chromosome *mec* (*SCCmec*). *Antibiotics*, v. 11, n. 1, p. 86, 11 jan. 2022.
 88. UTSUI, Y.; YOKOTA, T. Role of an altered penicillin-binding protein in methicillin- and cephem-resistant *Staphylococcus aureus*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v. 28, n. 3, p. 397–403, 1 set. 1985.
 89. VAN HOOVELS, L. et al. First Case of *Staphylococcus pseudintermedius* Infection in a Human. *Journal of Clinical Microbiology*, v. 44, n. 12, p. 4609–4612, dez. 2006.
 90. VARALDO, P. E. et al. *Staphylococcus delphini* sp. nov., a Coagulase-Positive Species Isolated from Dolphins. *International Journal of Systematic Bacteriology*, v. 38, n. 4, p. 436–439, 1 out. 1988.
 91. VELASCO, V. et al. Characterization of *Staphylococcus aureus* from humans and a comparison with isolates of animal origin, in North Dakota, United States. *PLoS ONE*, v. 10, n. 10, 2015. DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0140497>.
 92. VENGUST, M. et al. Methicillin-resistant staphylococcal colonization in clinically normal dogs and horses in the community. *Letters in Applied Microbiology*, v. 43, n. 6, p. 602–606, dez. 2006.
 93. VRBOVSKÁ, V. et al. Characterization of *Staphylococcus intermedius* Group Isolates Associated with Animals from Antarctica and Emended Description of *Staphylococcus delphini*. *Microorganisms*, v. 8, n. 2, p. 204, 1 fev. 2020.
 94. WANG, C. et al. First identification of a methicillin-resistant *Staphylococcus pseudintermedius* clonal lineage ST71 from shelter animals in Brazil. *Scientific Reports*, v. 10, n. 1, 2020. DOI: <https://doi.org/10.1038/s41598-020-69419-4>.

95. WEERASINGHE, W. et al. Monitoring MRSA colonization in shelter animals and the role of environmental contamination in spreading the bacteria. *Microorganisms*, v. 11, n. 2, 2023. DOI: <https://doi.org/10.3390/microorganisms11020312>.
96. WEGENER, A. et al. Specific staphylococcal cassette chromosome mec (SCCmec) types and clonal complexes are associated with low-level amoxicillin/clavulanic acid and cefalotin resistance in methicillin-resistant *Staphylococcus pseudintermedius*. *The Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, v. 75, n. 3, p. 508–511, 1 mar. 2020.
97. WORLD HEALTH ORGANIZATION; FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS; UNITED NATIONS ENVIRONMENT PROGRAMME; WORLD ORGANISATION FOR ANIMAL HEALTH. *A one health priority research agenda for antimicrobial resistance*. Geneva: World Health Organization, 2023. Disponível em: <https://iris.who.int/bitstream/handle/10665/370279/9789240075924-eng.pdf?sequence=1>. Acesso em: 16 nov. 2024.