

CENTRO UNIVERSITÁRIO SÃO CAMILO

CURSO DE BIOMEDICINA

Rafaela Xavier Espinosa

IC-16

COMPARAÇÃO FENOTÍPICA E GENOTÍPICA DO PERFIL DE RESISTÊNCIA DE ISOLADOS DE *S. pseudintermedius* DE ORIGEM VETERINÁRIA NA GRANDE SÃO PAULO

PHENOTYPIC AND GENOTYPIC COMPARISON OF VETERINARY *S. pseudintermedius* RESISTANCE PROFILE IN SÃO PAULO METROPOLITAN AREA

SÃO PAULO

2024

Rafaela Xavier Espinosa

COMPARAÇÃO FENOTÍPICA E GENOTÍPICA DO PERFIL DE RESISTÊNCIA DE ISOLADOS DE *S. pseudintermedius* DE ORIGEM VETERINÁRIA NA GRANDE SÃO PAULO

PHENOTYPIC AND GENOTYPIC COMPARISON OF VETERINARY *S. pseudintermedius* RESISTANCE PROFILE IN SÃO PAULO METROPOLITAN AREA

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Curso de Biomedicina do Centro Universitário São Camilo, orientado pela Prof.^a Dr.^a Marjorie Mendes Marini e Souza, como requisito parcial para obtenção do título de biomédica.

São Paulo

2024

RESUMO

A resistência aos antimicrobianos (RAM) é classificada como uma das 10 principais causas de ameaças globais à saúde. O uso indiscriminado de antimicrobianos na medicina humana e veterinária e a disseminação de bactérias resistentes e seus genes de resistência contribuem para a piora dessa situação. O *Staphylococcus pseudintermedius*, parte da microbiota normal de cães, principalmente da faringe e mucosas nasal e oral, é uma bactéria oportunista frequentemente associada à infecções como piodermite, otite e, em casos mais graves, infecções sistêmicas dos tratos urinário, respiratório e reprodutivo. Por conta de seu potencial zoonótico, da provável transferência de genes de resistência entre isolados humanos e veterinários e do aumento de exemplares resistentes e multidrogas resistentes, um estudo mais aprofundado se faz necessário. A resistência à maior parte dos antimicrobianos da classe dos beta-lactâmicos é mediada pela presença do gene *mecA*, contido no cassete Estafilocócico *mec* (*SCCmec*), elemento genético móvel único com localização sítio específica no cromossomo Estafilocócico. A variabilidade terapêutica disponível para cepas MRSP se faz ainda menor quando essas bactérias também se apresentam multidroga resistentes. Recentemente, nosso grupo de pesquisa identificou 51 *S. pseudintermedius*, por meio do sequenciamento da região V1-V3 do gene 16S do rRNA, isolados majoritariamente de infecções cutâneas e otológicas de animais de companhia de regiões da grande São Paulo. Estes isolados foram submetidos aos testes de disco-difusão para a avaliação do perfil de resistência fenotípico para as classes dos beta-lactâmicos, tetraciclina, fluoroquinolonas, grupo MLS_B e aminoglicosídeos. Para a avaliação do perfil de resistência genotípico, foi realizada uma reação em Cadeia da Polimerase (PCR) convencional com genes para as mesmas classes antimicrobianas. Foram encontradas 4 discrepâncias na classe dos beta-lactâmicos, 6 na classe das tetraciclina, 12 na classe das fluoroquinolonas, 4 no grupo dos macrolídeos, lincosamidas e estreptograminas B (MLS_B) e 7 na classe dos aminoglicosídeos. Outros isolados que não amplificaram nenhum gene de resistência, mas que apresentaram resistência nos testes de disco-difusão, sugerem outros mecanismos de resistência que não os testados no presente estudo. Analisar as incompatibilidades entre fenótipo e genótipo permite inferir a eficácia do tratamento de escolha. Além disso, realizar o mapeamento dos genes de resistência e das bactérias multidroga resistentes auxilia na criação de projetos que visem o combate à resistência e procurem otimizar o tratamento antimicrobiano.

PALAVRAS-CHAVE: *Staphylococcus pseudintermedius* resistente à metilina (MRSP), perfil de resistência, multidroga resistência, discrepância entre fenótipo e genótipo.

ABSTRACT

Antimicrobial resistance (AMR) is ranked as one of the top 10 causes of global health threats. The indiscriminate use of antimicrobials in human and veterinary medicine and the spread of resistant bacteria and their resistance genes contribute to the worsening of this situation. *Staphylococcus pseudintermedius*, part of the common microbiota of dogs, mainly of the pharynx, nasal and oral mucous membranes, is an opportunistic bacterium frequently associated with infections such as pyoderma, otitis and, in more serious cases, systemic infections of the urinary, respiratory and reproductive tracts. Due to its zoonotic potential, the possible transfer of resistance genes between human and veterinary isolates and the increase in resistant and multidrug resistant specimens, a more in-depth study is necessary. The resistance to most antimicrobials of the beta-lactam class is mediated by the presence of the *mecA* gene, contained in the Staphylococcal *mec* cassette (*SCCmec*), a unique mobile genetic element with a specific site location on the Staphylococcal chromosome. The therapeutic variability available for MRSP strains becomes even smaller when these bacteria are also multidrug resistant. Recently, our research group identified 51 *S. pseudintermedius*, through sequencing of the V1-V3 region of the 16S rRNA gene, isolated mostly from skin and ear infections of companion animals in São Paulo metropolitan area. These isolates were subjected to disk diffusion tests to evaluate the phenotypic resistance profile for the classes of beta-lactams, tetracyclines, fluoroquinolones, MLS_B group and aminoglycosides. To evaluate the genotypic resistance profile, a conventional Polymerase Chain Reaction (PCR) was performed with genes for the same antimicrobial classes. 4 discrepancies were found in the beta-lactam class, 6 in the tetracycline class, 12 in the fluoroquinolone class, 4 in the macrolides, lincosamides and streptogramins B (MLS_B) group and 7 in the aminoglycoside class. Other isolates that did not amplify any resistance gene, but showed resistance in disk diffusion tests, suggest other resistance mechanisms than those tested in the present study. Analyzing incompatibilities between phenotype and genotype allows us to infer the effectiveness of the treatment. Furthermore, mapping resistance genes and multidrug-resistant bacteria helps in the creation of projects that aim to combat resistance and seek to optimize antimicrobial treatment.

KEYWORDS: Methicillin-resistant *Staphylococcus pseudintermedius* (MRSP), resistance profile, multidrug resistance, discrepancy between phenotype and genotype.

INTRODUÇÃO

A resistência aos antimicrobianos (RAM) é apontada como um grande problema para a saúde pública e para o contexto socioeconômico global, sendo classificada como uma das 10 principais causas de ameaças globais à saúde. Segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS), a RAM está associada a 4,95 milhões de mortes e é a causa direta de 1,27 milhões destas (1). Por conta disso, a OMS estipula como prioridade a identificação e o monitoramento de bactérias resistentes e seus genes de resistência com o propósito de entender e rastrear sua disseminação (2, 3).

O uso indiscriminado de antimicrobianos na medicina humana e veterinária e a disseminação de bactérias resistentes e genes de resistência são dois fatores importantes que contribuem com o aumento da resistência antimicrobiana (4, 5). Um dos meios de disseminação que vem recebendo atenção nos últimos anos é a entre humanos e seus animais de companhia (6), de tal forma que impulsionaram a evolução e implementação do “*One Health*” (Saúde Única), uma abordagem colaborativa que reconhece a relação entre a saúde humana e animal com seu meio ambiente partilhado (5, 7).

Um dos patógenos de destaque em se tratando de resistência bacteriana é o *Staphylococcus pseudintermedius*, membro do grupo das *Staphylococcus intermedius* (SIG). O SIG é composto por cinco espécies coagulase-positivas, sendo estas *Staphylococcus intermedius*, *Staphylococcus pseudintermedius*, *Staphylococcus cornubiensis*, *Staphylococcus delphini* e *Staphylococcus ursi*, sendo o pertencimento desta última ainda discutido. (8) (figura 1).

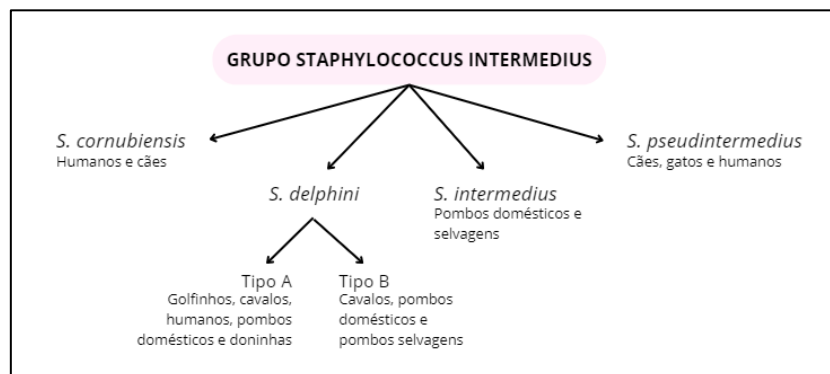


Figura 1: Membros do grupo *Staphylococcus intermedius* (SIG) e seus hospedeiros. Adaptado de Canver et al. (32)

Esses patógenos zoonóticos, classificados como cocos gram-positivos, catalase e coagulase positivos com Beta-hemólise em Ágar Sangue e encontrados principalmente em isolados provenientes de mucosa canina, foram agrupados por não apresentarem diferenças significativas em seus traços

fenotípicos, sendo necessária a identificação por análise molecular através de genes espécie-específicos (9).

O *Staphylococcus pseudintermedius* compõe a microbiota normal de cães, presente no ânus, faringe e mucosas nasal e oral, e é principal integrante do grupo das *Staphylococcus intermedius* (SIG). Essa Bactéria oportunista é frequentemente associada a infecções nesses animais, causando doenças como a piodermite, otite e, em casos mais graves, infecções sistêmicas dos tratos urinário, respiratório e reprodutivo (10, 11). Por conta dos fatores de virulência do *S. pseudintermedius*, como citotoxinas, toxinas esfoliativas, superantígenos e proteínas associadas à parede celular, e de seu potencial invasivo, esse microrganismo possui a capacidade de causar doenças em sua forma grave (12).

Infecções causadas por *S. pseudintermedius* são de grande importância na medicina veterinária devido à alta incidência de cepas resistentes à meticilina (11, 13, 14), além de tipicamente estarem associados à multirresistência a drogas, sendo também resistentes à classe das fluoroquinolonas, macrolídeos, tetraciclina e aminoglicosídeos (12, 15).

Outro grande problema de saúde pública é a transferência de bactérias entre cães e seres humanos (11, 14). Apesar de seus fatores de virulência serem adaptados ao organismo canino, a *S. pseudintermedius* não infecta restritamente a esses animais, fazendo com que estes possam ser prováveis reservatórios de bactérias resistentes (4, 15). Devido ao potencial zoonótico, sua importância em infecções humanas vem sendo discutida e pesquisada cada vez mais (16, 17).

O ambiente e/ou contexto genético também exercem influência na resistência aos antimicrobianos, pois podem modificar a expressão dos genes de resistência e gerar uma incompatibilidade entre genótipo e fenótipo, alterando o perfil de resistência *in vitro* e dificultando ainda mais a administração do antimicrobiano adequado (18).

Buscando realizar a epidemiologia molecular e uma caracterização à nível de espécie de isolados de *Staphylococcus* do grupo *intermedius* de origem veterinária na região da grande São Paulo, nosso grupo de pesquisa, com colaboração com o Setor de Microbiologia da Unidade Veterinária Especializada em Diagnóstico, Dognóstico, analisou 65 amostras de cães e gatos com suspeita clínica de infecções por *Staphylococcus* sp (**Anexo 1**) durante os meses de Junho à Novembro de 2022. As regiões contempladas abrangeram as filiais localizadas nos bairros Belém, Campo Belo, Brooklin e Alphaville e nos municípios de Mogi das Cruzes e Guarulhos, além de outras clínicas e hospitais

veterinários de diferentes regiões da grande São Paulo. A análise das sequências provenientes da técnica de sequenciamento SANGER da região V1-V3 do rDNA 16S confirmou que 51 isolados são pertencentes à espécie *Staphylococcus pseudintermedius* (**Quadro 1**).

QUADRO 1: ISOLADOS DE <i>S. pseudintermedius</i> E SEUS LOCAIS DE ORIGEM					
REGIÃO	ISOLADO	ESPÉCIE	REGIÃO	ISOLADO	ESPÉCIE
BELÉM	6Θ - 313268	<i>Staphylococcus pseudintermedius</i>	ALPHAVILLE	108C - 164468	<i>Staphylococcus pseudintermedius</i>
CAMPO BELO	8C - 174335	<i>Staphylococcus pseudintermedius</i>	ALPHAVILLE	109C - 164479	<i>Staphylococcus pseudintermedius</i>
CAMPO BELO	9C - 174372	<i>Staphylococcus pseudintermedius</i>	BELÉM	178C - 328337	<i>Staphylococcus pseudintermedius</i>
CAMPO BELO	10C - 174391	<i>Staphylococcus pseudintermedius</i>	ALPHAVILLE	186Θ - 184814	<i>Staphylococcus pseudintermedius</i>
CAMPO BELO	13C - 174414	<i>Staphylococcus pseudintermedius</i>	CAMPO BELO	189Θ - 182981	<i>Staphylococcus pseudintermedius</i>
CAMPO BELO	15C - 174424	<i>Staphylococcus pseudintermedius</i>	CAMPO BELO	190Θ - 182981	<i>Staphylococcus pseudintermedius</i>
BELÉM	16Θ - 313474	<i>Staphylococcus pseudintermedius</i>	CAMPO BELO	193Θ - 183024	<i>Staphylococcus pseudintermedius</i>
CAMPO BELO	22C - 174571	<i>Staphylococcus pseudintermedius</i>	BELÉM	194Θ - 328555	<i>Staphylococcus pseudintermedius</i>
ALPHAVILLE	23C - 157907	<i>Staphylococcus pseudintermedius</i>	BROOKLIN	196C - 1777	<i>Staphylococcus pseudintermedius</i>
BELÉM	33C - 313828	<i>Staphylococcus pseudintermedius</i>	ALPHAVILLE	198C - 164999	<i>Staphylococcus pseudintermedius</i>
CAMPO BELO	42C - 174677	<i>Staphylococcus pseudintermedius</i>	CAMPO BELO	216C - 183379	<i>Staphylococcus pseudintermedius</i>
CAMPO BELO	43C - 174703	<i>Staphylococcus pseudintermedius</i>	BELÉM	4Θ - 329003	<i>Staphylococcus pseudintermedius</i>
GUARULHOS	45N - 77176	<i>Staphylococcus pseudintermedius</i>	BELÉM	6C - 329003	<i>Staphylococcus pseudintermedius</i>
BELÉM	58C - 314290	<i>Staphylococcus pseudintermedius</i>	CAMPO BELO	54Θ - 183950	<i>Staphylococcus pseudintermedius</i>
CAMPO BELO	66C - 175039	<i>Staphylococcus pseudintermedius</i>	ALPHAVILLE	57C - 165706	<i>Staphylococcus pseudintermedius</i>
BELÉM	76Θ - 314616	<i>Staphylococcus pseudintermedius</i>	BELÉM	58C - 329911	<i>Staphylococcus pseudintermedius</i>
ALPHAVILLE	119C - 158646	<i>Staphylococcus pseudintermedius</i>	ALPHAVILLE	62C - 165799	<i>Staphylococcus pseudintermedius</i>
CAMPO BELO	123Θ - 175493	<i>Staphylococcus pseudintermedius</i>	BELÉM	70Θ - 330098	<i>Staphylococcus pseudintermedius</i>
CAMPO BELO	197V - 180440	<i>Staphylococcus pseudintermedius</i>	BELÉM	71Θ - 330098	<i>Staphylococcus pseudintermedius</i>
CAMPO BELO	6C - 181175	<i>Staphylococcus pseudintermedius</i>	CAMPO BELO	77C - 184159	<i>Staphylococcus pseudintermedius</i>
BELÉM	14Φ - 325701	<i>Staphylococcus pseudintermedius</i>	BELÉM	104Φ - 330858	<i>Staphylococcus pseudintermedius</i>
BELÉM	18Θ - 325704	<i>Staphylococcus pseudintermedius</i>	ALPHAVILLE	107C - 166406	<i>Staphylococcus pseudintermedius</i>
BELÉM	19C - 325761	<i>Staphylococcus pseudintermedius</i>	BELÉM	161C - 331808	<i>Staphylococcus pseudintermedius</i>
BELÉM	75Θ - 326331	<i>Staphylococcus pseudintermedius</i>	CAMPO BELO	168Θ - 185157	<i>Staphylococcus pseudintermedius</i>
BELÉM	102Θ - 327324	<i>Staphylococcus pseudintermedius</i>	CAMPO BELO	171Θ - 185220	<i>Staphylococcus pseudintermedius</i>
GUARULHOS	104C - 83239	<i>Staphylococcus pseudintermedius</i>			
TOTAL: 51 ISOLADOS IDENTIFICADOS COMO <i>S. pseudintermedius</i>					

Quadro 1: Relação dos isolados de *S. pseudintermedius* e seus locais de origem. Quadro autoral.

A *Staphylococcus pseudintermedius* resistente à metilina (SPRM) se tornou um grande problema na veterinária por, além de apresentar resistência à maioria dos antimicrobianos da classe dos beta-lactâmicos, ser associada também à multirresistência a drogas (19). Outras classes bem utilizadas para o tratamento de infecções de *S. pseudintermedius* são as quinolonas e fluoroquinolonas, as tetraciclina, os aminoglicosídeos, as sulfonamidas e o grupo dos macrolídeos, lincosamidas e estreptograminas (MLS). Além destes, recentemente estão sendo utilizados o ácido fusídico e a mupirocina como alternativas terapêuticas (**Quadro 2**).

QUADRO 2: CLASSES E MECANISMOS DE AÇÃO DOS ANTIMICROBIANOS	
CLASSES	ESPÉCIE
Tetraciclina	Inibem a síntese proteica por meio da sua ligação à subunidade 30S do ribossomo
Quinolonas e fluoroquinolonas	Inibem a síntese de DNA ligando-se à DNA girase (topoisomerases II e IV)
Macrolídeos, lincosamidas, estreptograminas	Inibem a síntese proteica ligando-se à subunidade 50S do ribossomo bacteriano e bloqueando a saída do peptídeo
Aminoglicosídeos	Causam erro de tradução ao se ligarem na subunidade 30S do ribossomo
Mupirocina	Inibe a síntese proteica e de RNA por meio da isoleucina tRNA sintetase
Ácido fusídico	Inibe síntese proteica impedindo a renovação do fator G de alongamento do ribossomo

Quadro 2: Classes de antimicrobianos e seus mecanismos de ação. Quadro autoral.

Desta forma, a proposta desse projeto é avaliar o perfil genotípico de alguns genes de resistência para as principais classes antimicrobianas, caracterizar o cassete cromossômico *Estafilocócico mec*,

o qual possui o gene *mecA*, responsável pela resistência à metilina, e posteriormente comparar o perfil genotípico com o perfil fenotípico de resistência dos isolados provenientes dos animais de companhia da grande São Paulo de forma a fornecer dados que possam ser integrados a vigilância da resistência aos antimicrobianos em outros setores no âmbito da saúde única. Além disso, o projeto visa verificar a presença ou ausência dos reguladores *mecI* e *mecR1* para auxiliar na compreensão de sua significância no perfil fenotípico de resistência demonstrado aos betas lactâmicos *in vitro*, assim providenciando meios para a investigação do *SCCmec* e de seus elementos, os quais vêm se provando cada vez mais relevantes.

MATERIAL E MÉTODOS

Este projeto está vinculado ao projeto de pesquisa temático Centro de estudos genômicos de microorganismos comensais, atípicos e negligenciados: utilização de análises genômicas *in silico* para o diagnóstico clínico, aprovado pelo comitê de pesquisa institucional (parecer 37/2021) e Comissão de Ética do Uso de Animais – CEUA institucional (parecer consubstanciado nº 04/23).

Obtenção dos isolados e rotina microbiológica

Em colaboração com o Setor de Microbiologia da Unidade Veterinária Especializada em Diagnóstico, DOGNOSTIC, os isolados selecionados foram aqueles identificados como pertencentes ao grupo *Staphylococcus intermedius* (SIG), sendo estabelecidos como parâmetros de identificação a morfologia de cocos gram-positivos na análise bacterioscópica, com beta-hemólise em ágar sangue, catalase e dnase positivos e manitol negativos. Havendo alguma dúvida na triagem, o Meio de Tolerância ao Sal (MTS) e o ágar Bile-esculina eram utilizados como meios para diferenciação entre *Enterococcus*, *Streptococcus* e *Staphylococcus* (figura 2).

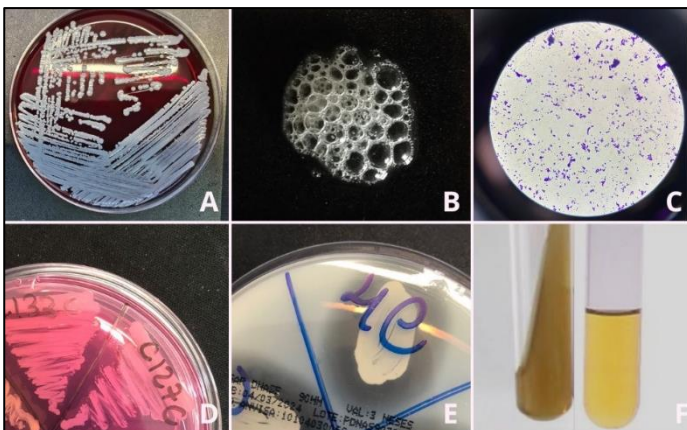


Figura 2: Imagem representativa da rotina de triagem microbiológica. A) Crescimento em ágar sangue; B) Catalase positiva; C) Cocos Gram positivos na coloração de Gram; D) Manitol negativo; E) DNase positiva e F) Meio Bile-esculina negativo e caldo MTS positivo. Figura autoral.

Caracterização fenotípica da resistência aos antimicrobianos

O teste de sensibilidade aos antimicrobianos por disco difusão foi realizado como parte da rotina clínica no Laboratório de diagnóstico veterinário DOGNOSTC, utilizando os marcadores para detecção da resistência relacionados no BRCast 2022, CLSI-VET (2020) e CLSI M100 (2022). Para a realização da presente pesquisa de forma a contemplar as principais classes antimicrobianas, foi padronizado o uso dos discos de Ampicilina (AMP 10 µg), Amoxicilina (AMO 10 µg), Amoxicilina + ácido clavulânico (AMC 30 µg), Cefalexina (CFE 30 µg), Cefovecina (CVN 30 µg), Penicilina G (PEN 10 U), Oxacilina (OXA 1 µg), Tetraciclina (TET 30 µg), Doxiciclina (DOX 30 µg), Enrofloxacina (ENO 30 µg), Levofloxacino (LEV 5 µg), Norfloxacino (NOR 10 µg), Pradofloxacino (PRD 5 µg), Clindamicina (CLI 2 µg), Eritromicina (ERI 15 µg), Canamicina (CAN 30 µg), Gentamicina (GEN 10 µg) e Neomicina (NEO 30 µg).

Para a triagem das amostras quanto à resistência à meticilina, foram utilizadas as observações listadas no BRCast 2024/CLSI-VET (2024), o qual sugere o uso do disco de oxacilina 1µg para *S. pseudintermedius*, *S. schleiferi* e *S. coagulans* como antimicrobiano preditivo para detecção de resistência à meticilina com pontos de corte de diâmetro de halo $S \geq 20\text{mm}$ e $r < 20\text{mm}$. Por fim, todos os dados foram tabulados e utilizados para comparar com resultados obtidos nas análises genéticas.

Extração de DNA genômico e identificação da espécie

A extração de DNA genômico das amostras, feita seguindo o protocolo padronizado baseado no método manual de extração descrito por Sambrook e colaboradores e Wilson Kate (51, 52), e a identificação das espécies, através do sequenciamento pelo método SANGER da região V1-V3 (24F-534R) da região variável do gene 16S rRNA, foram realizadas anteriormente por nosso grupo de pesquisa.

Testes genotípicos para detecção genes de resistência

1. Reação em cadeia da polimerase (PCR)

Para a realização da Reação em cadeia da polimerase (PCR) pelo método convencional foram eleitos dois grupos cuja análise molecular foi feita de forma distinta (**figura 3**).

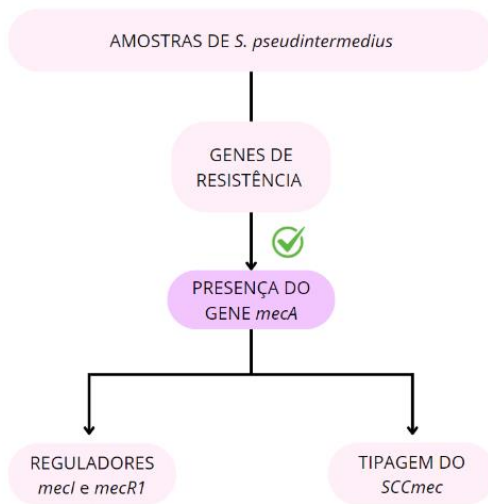


Figura 3: Fluxograma da análise molecular dos isolados de *S. pseudintermedius*. Figura autoral.

Todos os 51 isolados foram submetidos à PCR convencional com volume final de 25 μ L para a caracterização genotípica de genes de resistência para diferentes classes de antimicrobianos com grande importância clínica, incluindo o gene *mecA* e seu homólogo *mecC* (**Quadro 3**).

QUADRO 3: PRIMERS PARA OS GENES DE RESISTÊNCIA				
GENES	Primers (sequência de nucleotídeos 5' → 3')	TAMANHO (pb)	TM (°C)	REFERÊNCIAS
<i>mecA</i>	GTGAAGATATACCAAGTGATT	147 pb	51°C	ZHANG et al, 2005 ⁴⁸
	ATGCGCTATAGATTGAAAGGAT			
<i>mecC</i>	GCTCCTAATGCTAATGCA	304 pb	48°C	CUNY et al, 2011 ³⁶
	TAAGCAATAATGACTACC			
<i>blaZ</i>	CAGTTCACATGCCAAAGAG	772 pb	53°C	SCHNELLMANN et al, 2006 ⁴⁴
	TACACTCTTGGCGGTTTC			
<i>tet(K)</i>	TTAGGTGAAGGGTTAGGTCC	697 pb	54°C	AERESTRUP et al, 2000 ³¹
	GCAAACCTATTCCAGAAGCA			
<i>tet(M)</i>	GTTAAATAGTGTCTTGGAG	576 pb	49°C	
	CTAAGATATGGCTCTAACAA			
<i>griA</i>	CAAGAGCGTGCTTTRCCT	300 pb	54,5°C	COSTA et al, 2021 ³⁴
	CTGACTYAATTTGCGTTCAG			
<i>gyrA</i>	ATGAGTGTTATYGTRTCTCGT	261 pb	55°C	COSTA et al, 2021 ³⁴
	CATMGAACCRAAGTTACCTTG			
<i>mupA</i>	CCCATGGCTTACCAGTTGA	419 pb	55°C	UDO et al, 2003 ⁴⁶
	CCATGGAGCACTATCCGAA			
<i>fusB</i>	TCATATAGATGACGATATTG	496 pb	49°C	CASTANHEIRA et al, 2010 ³³
	ACAATGAATGCTATCTCGAC			
<i>fusC</i>	GATATTGATATCTCGACTT	128 pb	49°C	
	AGTTGACTTGATGAAGGTAT			
<i>erm(A)</i>	AAGCGGTAACCCCTCTGAG	442 pb	56°C	COSTA et al, 2016 ³⁵
	TCAAAGCCTGTCCGAATTGG			
<i>erm(B)</i>	TGGAACAGGTAAGGGCATT	433 pb	54°C	
	TGTGGTATGGCGGGTAAGTT			
<i>erm(C)</i>	TCGTAACCTGCCATTGAAATA	348 pb	49,5°C	
	TCACITTAGGTTTAGGATGAAA			
<i>aac6'-aph2''</i>	CCAAGAGCAATAAGGGCATA	220 pb	53°C	SHERVINGTON et al, 2001 ⁴⁵
	CACATCATAACCCACTACCG			

Quadro 3: Primers utilizados para a caracterização genotípica do perfil de resistência com suas respectivas temperaturas de anelamento (TM). Quadro autoral.

Os genes *mecA*, *mecC* e *blaZ* codificam mecanismos de resistência para beta-lactâmicos, os genes *tet(K)* e *tet(M)* conferem resistência para a classe das tetraciclina, os genes *griA* e *gyrA* conferem resistência para a classes das quinolonas, *mupA* para mupirocina, da classes dos ácidos pseudomônicos, *fusB* e *fusC* conferem resistência para ácido fusídico, da classe dos esteroides,

aac6'-aph2'' para a classe dos aminoglicosídeos e os genes *erm(A)*, *erm(B)* e *erm(C)* codificam mecanismos de resistência para o grupo da classe dos macrolídeos, lincosamidas e estreptograminas B (MLS_b).

Os isolados que se apresentaram resistentes aos genes *mecA* e *mecC* foram submetidos à PCR convencional para a tipagem do cassete cromossômico *mec* (*SCCmec*) (**Quadro 4**).

QUADRO 4: PRIMERS PARA TIPAGEM DO <i>SCCmec</i>				
TIPOS DE <i>SCCmec</i>	Primers (sequência de nucleotídeos 5' → 3')	TAMANHO	TM (°C)	REFERÊNCIAS
Tipo I (<i>SCCmecI</i>)	GCTTTAAAGAGTGTGCGTTACAGG	613 pb	56°C	ZHANG et al, 2005 ⁴⁸
	GTTCTCTCATAGTATGACGTCC			
Tipo II (<i>SCCmecII</i>)	TAGCTTATGGTGCTTATGCG	128 pb	53,5°C	ZHANG et al, 2012 ⁴⁹
	GTGCATGATTTCAATTTGTGGC			
Tipo III (<i>SCCmecIII</i>)	GAAACTAGTTATTTCCAACGG	257 pb	54,5°C	ZHANG et al, 2012 ⁴⁹
	GTGTAATTTCTTTGAAAGATATGG			
Tipo IVa (<i>SCCmecIVa</i>)	GCCTTATTCGAAGAAACCG	776 pb	54,5°C	ZHANG et al, 2005 ⁴⁸
	CTACTCTTCTGAAAAGCGTCC			
Tipo IVb (<i>SCCmecIVb</i>)	TCTGGAATTAATTCAGCTGC	493 pb	52,5°C	ZHANG et al, 2005 ⁴⁸
	AAACAATATTGCTCTCCCTC			
Tipo IVc (<i>SCCmecIVc</i>)	CCTGAATCTAAAGAGATACACCG	200 pb	54°C	ZHANG et al, 2012 ⁴⁹
	GGTATTTTCATAGTGAATCGC			
Tipo IVd (<i>SCCmecIVd</i>)	CTCAAAATACGGACCCCAATACA	881 pb	53,5°C	ZHANG et al, 2005 ⁴⁸
	TGCTCCAGTAATTGCTAAAG			
Tipo IVe (<i>SCCmecIVe</i>)	CAGATTCATCATTTCAAAGGC	175 pb	50°C	ZHANG et al, 2012 ⁴⁹
	AACAATATTAGATAATTTCCG			
Tipo V (<i>SCCmecV</i>)	GAACATTGTTACTTAAATGAGCG	325 pb	54°C	ZHANG et al, 2005 ⁴⁸
	TGAAAGTTGTACCCTTGACACC			

Quadro 4: Primers utilizados para a tipagem do *SCCmec* e suas respectivas temperaturas de anelamento. Quadro autoral.

Estes mesmos isolados também foram caracterizados quanto a presença ou ausência dos reguladores do gene *mecA*, contidos neste cassete (**Quadro 5**).

QUADRO 5: PRIMERS PARA OS REGULADORES DE <i>mecA</i>			
GENES	Primers (sequência de nucleotídeos 5' → 3')	TM (°C)	REFERÊNCIA
<i>mecRI</i>	F: CGC TCA GAA ATT TGT TGT GC	51°C	KATAYAMA et al, 2001 ⁴¹
	R: ATC TCC ACG TTA ATT CCA TT		
<i>mecI</i>	F: AAT GGC GAA AAA GCA CAA CA	51,5°C	
	R: GAC TTG ATT GTT TCC TCT GTT		

Quadro 5: Primers utilizados para verificar a presença ou ausência dos genes *mecR1* e *mecI* e suas respectivas temperaturas de anelamento (TM). Quadro autoral.

2. Eletroforese em gel de agarose

Para analisar o resultado da reação em cadeia da polimerase (PCR), foram adicionados 2,5 µL do corante orange/blue aos produtos de PCR. Posteriormente, 15µL da mistura foram aplicados no gel

de agarose de concentração 1,2% em tampão TAE (Tris-Acetato-EDTA) 1X com brometo de etídeo como agente intercalante. Por fim, a eletroforese foi executada sob uma voltagem de 80 volts por 90 minutos para a separação efetiva dos fragmentos amplificados.

RESULTADOS

1. Beta-lactâmicos

Dos 51 isolados testados, 54,9% (28 isolados) apresentaram um perfil fenotípico concordante com o perfil de resistência demonstrado no teste disco-difusão. Destes, 21 isolados eram resistentes a pelo menos três antimicrobianos da classe dos beta-lactâmicos e os outros 7 se mostraram sensíveis. Outros 18 isolados (33,4%) não amplificaram para nenhum dos genes testados, mas apresentaram resistência fenotípica. Por fim, 11,7% dos isolados apresentaram discrepâncias consideráveis, dos quais 4 amplificaram os genes *blaZ* (1 isolado) e *mecA* (3 isolados), mas não apresentaram resistência em seu perfil fenotípico (**Quadro 6**).

CLASSE DOS BETA-LACTÂMICOS																					
ISOLADOS	ANTIMICROBIANOS							GENES ASSOCIADOS			ISOLADOS	ANTIMICROBIANOS							GENES ASSOCIADOS		
	AMP	AMO	AMC	CFE	CVN	PEN G	OXA	blaZ	mecC	mecA		AMP	AMO	AMC	CFE	CVN	PEN G	OXA	blaZ	mecC	mecA
1S - Ø	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	26S - C	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2S - C	+	+	-	-	-	+	-	+	-	-	27S - C	+	+	-	-	+	-	+	-	-	-
3S - C	+	+	-	-	-	+	-	+	-	-	28S - C	+	+	-	-	+	-	+	-	-	-
4S - C	+	+	-	-	-	+	-	+	-	-	29S - C	+	+	-	-	+	-	+	-	-	-
5S - C	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	30S - Ø	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
6S - C	+	+	-	-	-	+	-	+	-	+	31S - Ø	+	+	-	-	+	-	+	-	-	-
7S - Ø	+	+	-	-	-	+	-	+	-	-	32S - Ø	+	+	-	-	+	-	+	-	-	-
8S - C	+	+	-	-	-	+	-	+	-	-	33S - Ø	+	+	-	-	+	-	-	-	-	-
9S - C	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	34S - Ø	+	+	-	-	+	-	-	-	-	-
10S - C	+	+	-	-	-	+	-	+	-	-	35S - C	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+
11S - C	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	36S - C	+	+	-	-	+	-	-	-	-	-
12S - C	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	37S - C	+	+	-	-	+	-	-	-	-	-
13S - N	+	+	+	-	-	+	+	+	-	+	38S - Ø	+	+	-	-	+	-	-	-	-	-
14S - C	+	+	-	-	-	+	-	+	-	-	39S - C	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
15S - C	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	40S - Ø	+	+	-	-	+	-	-	-	-	-
16S - Ø	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	41S - C	+	+	-	-	+	-	-	-	-	-
17S - C	+	+	-	-	-	+	-	+	-	-	42S - C	+	+	-	-	+	-	-	-	-	-
18S - Ø	+	+	-	-	-	+	-	+	-	-	43S - C	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
19S - V	+	+	-	-	-	+	-	+	-	-	44S - Ø	+	+	-	-	+	-	-	-	-	-
20S - C	+	+	-	-	-	+	-	-	-	-	45S - Ø	+	+	-	-	+	-	-	-	-	-
21S - Ø	+	+	+	+	+	+	-	+	-	-	46S - C	+	+	-	-	+	-	-	-	-	-
22S - Ø	+	+	-	-	-	+	-	-	-	-	47S - Ø	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-
23S - C	+	+	-	-	-	+	-	-	-	-	48S - C	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
24S - Ø	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	49S - C	+	+	-	+	+	+	-	-	-	-
25S - Ø	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	50S - Ø	+	+	-	-	+	-	-	-	-	-
											51S - Ø	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Quadro 6: Sumarização dos resultados obtidos relacionados à classe dos Beta-Lactâmicos. Abreviações: Amoxicilina (AMO), Amoxicilina + Clavulanato (AMC), Ampicilina (AMP), Cefalexina (CFE), Cefovecina (CVN) e Penicilina G (PEN G). Para antimicrobianos, considerar “+” como resistente, “-” como sensível e “NA” para não avaliado. Para genes associados, considerar “+” como amplificado e “-” como não amplificado. Quadro autoral.

As amostras confirmadas para a presença do gene *mecA* também foram submetidas à caracterização genotípica dos reguladores deste gene e à tipagem do cassete cromossômico *SCCmec*. Destes 10

isolados, 40% foram positivos para a presença do gene regulador *mecl*, repressor do gene *mecA*, e apenas 1 isolado apresentou-se positivo para a presença da proteína transmembrana *mecR1*. (Quadro 7).

De todos os isolados submetidos à tipagem do cassete cromossômico estafilocócico *mec* (*SCCmec*) apenas um isolado (13S - N) foi determinado como tipo V. As outras 9 amostras não apresentaram resultados definitivos.

CLASSE DOS BETA-LACTÂMICOS											
ISOLADOS	ANTIMICROBIANOS							GENES ASSOCIADOS			
	AMP	AMO	AMC	CFE	CVN	PEN G	OXA	<i>mecA</i>	<i>mecl</i>	<i>mecR1</i>	<i>SCCmec</i>
5S - C	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	SEQ
6S - C	+	+	-	-	-	+	-	+	-	+	SEQ
9S - C	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	SEQ
11S - C	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	SEQ
12S - C	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	SEQ
13S - N	+	+	+	-	-	+	+	+	-	-	TIPO V
15S - C	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	SEQ
24S - Θ	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	SEQ
35S - C	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	SEQ
48S - C	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	SEQ

Quadro 7: Sumarização dos resultados obtidos relacionados aos reguladores do gene *mecA* e ao cassete cromossômico *SCCmec*. Abreviações: Amoxicilina (AMO), Amoxicilina + Clavulanato (AMC), Ampicilina (AMP), Cefalexina (CFE), Cefovecina (CVN) e Penicilina G (PEN G). Para antimicrobianos, considerar “+” como resistente e “-” como sensível. Para genes associados, considerar “+” como amplificado, “-” como não amplificado e “SEQ” como disponível apenas por análise do sequenciamento. Quadro autoral.

2. Tetraciclina

Apenas um dos 51 isolados foi positivo para a presença do gene *tet(K)*, que codifica uma bomba de efluxo responsável por garantir resistência à classe das tetraciclina. Este isolado era resistente tanto à tetraciclina quanto à doxiciclina.

Em se tratando do gene *tet(M)*, que codifica uma proteína de ligação ribossômica responsável pela resistência ao antimicrobiano tetraciclina, 44 dos 51 isolados apresentaram concordância entre genótipo e fenótipo, sendo 12 sensíveis e 32 resistentes. Outros 6 isolados, apesar de serem positivos para o gene *tet(M)*, não possuem resistência fenotípica ao antimicrobiano tetraciclina, sendo portanto classificados como parte dos isolados que apresentam discrepância entre fenótipo

e genótipo. Apenas um isolado que não amplificou o gene *tet(M)* apresentou resistência fenotípica à tetraciclina (**Quadro 8**).

CLASSE DAS TETRACICLINAS									
ISOLADOS	ANTIMICROBIANOS E GENES				ISOLADOS	ANTIMICROBIANOS E GENES			
	TET	tet(M)	DOX	tet(K)		TET	tet(M)	DOX	tet(K)
1S - Θ	-	-	-	-	26S - C	+	+	-	-
2S - C	+	+	-	-	27S - C	-	-	-	-
3S - C	+	+	-	-	28S - C	-	+	-	-
4S - C	-	+	-	-	29S - C	+	+	-	-
5S - C	+	+	+	-	30S - Θ	+	+	-	-
6S - C	-	+	-	-	31S - Θ	-	+	-	-
7S - Θ	-	+	+	-	32S - Θ	+	+	+	-
8S - C	+	+	+	-	33S - Θ	+	+	+	-
9S - C	+	+	+	+	34S - Θ	+	+	+	-
10S - C	+	+	+	-	35S - C	+	+	+	-
11S - C	+	+	+	-	36S - C	-	-	-	-
12S - C	+	+	-	-	37S - C	-	-	-	-
13S - N	+	+	-	-	38S - Θ	+	+	+	-
14S - C	+	+	-	-	39S - C	-	-	-	-
15S - C	-	+	-	-	40S - Θ	+	+	-	-
16S - Θ	-	-	-	-	41S - C	+	+	-	-
17S - C	+	+	+	-	42S - C	-	-	-	-
18S - Θ	+	+	-	-	43S - C	-	-	-	-
19S - V	+	+	+	-	44S - Θ	+	+	+	-
20S - C	-	-	-	-	45S - Θ	+	+	-	-
21S - φ	+	+	+	-	46S - C	-	-	-	-
22S - Θ	+	+	-	-	47S - φ	+	+	+	-
23S - C	+	+	+	-	48S - C	+	-	-	-
24S - Θ	+	+	+	-	49S - C	+	+	-	-
25S - Θ	-	-	-	-	50S - Θ	+	+	+	-
					51S - Θ	-	-	-	-

Quadro 8: Sumarização dos resultados relacionados à classe das tetraciclinas. Abreviações: Doxiciclina (DOX) e Tetraciclina (TET). Para antimicrobianos, considerar “+” como resistente e “-” como sensível. Para genes associados, considerar “+” como amplificado e “-” como não amplificado. Quadro autoral.

3. Fluoroquinolonas

Para a análise genotípica da classe das fluoroquinolonas, foram testados os genes *gyrA* e *glrA*, ambos relacionados com mutações na enzima girase. Os isolados positivos para *glrA* somaram 11 e os isolados positivos para o gene *gyrA* somaram 14, sendo que destes, apenas 6 amostras possuíam os dois genes.

Fenotipicamente, 8 dos 14 isolados positivos para *gyrA* eram sensíveis à todas as fluoroquinolonas testadas e 6 eram resistentes. Quanto ao gene *glrA*, 8 dos 11 isolados testados eram sensíveis à todas as fluoroquinolonas testadas e 3 eram resistentes. Das 6 amostras que possuíam os dois genes,

apenas 2 eram resistentes à classe das fluoroquinolonas. As 4 amostras restantes são sensíveis a todos os antimicrobianos dessa classe que foram testados.

Em geral, 27,5% (14) dos isolados possuem resistência a pelo menos um antimicrobiano da classe das Fluoroquinolonas, mas não apresentam nenhum dos genes testados em sua análise genotípica. Já outros 23,5% (12) isolados possuem um dos genes de resistência, mas não o expressam *in vitro* nas análises fenotípicas (**Quadro 9**).

CLASSE DAS FLUOROQUINOLONAS															
ISOLADOS	ANTIMICROBIANOS					GENES		ISOLADOS	ANTIMICROBIANOS					GENES	
	ENO	LEV	MRB	NOR	PRD	gyrA	glrA		ENO	LEV	MRB	NOR	PRD	gyrA	glrA
1S - Ø	-	-	-	-	-	+	-	26S - C	-	-	-	NA	-	-	+
2S - C	-	-	-	-	-	-	-	27S - C	-	-	NA	-	-	+	-
3S - C	+	+	+	+	NA	-	-	28S - C	-	-	-	-	-	-	-
4S - C	-	-	-	-	-	-	+	29S - C	-	-	-	-	-	-	-
5S - C	+	+	+	+	+	+	+	30S - Ø	-	-	-	+	-	-	-
6S - C	-	-	-	-	-	-	+	31S - Ø	-	-	-	-	-	-	-
7S - Ø	+	+	+	-	+	-	-	32S - Ø	-	-	-	NA	-	-	-
8S - C	-	-	-	-	-	+	-	33S - Ø	+	+	+	+	+	-	-
9S - C	+	+	+	-	+	-	+	34S - Ø	+	+	+	+	+	-	-
10S - C	-	-	-	-	-	-	-	35S - C	+	+	+	+	+	-	-
11S - C	+	+	+	+	+	-	-	36S - C	-	-	-	-	-	-	-
12S - C	-	-	-	-	-	-	-	37S - C	-	-	-	-	-	-	-
13S - N	+	+	+	+	+	+	-	38S - Ø	+	+	+	+	+	-	-
14S - C	-	-	-	-	-	+	-	39S - C	-	-	-	-	-	-	-
15S - C	-	-	-	-	-	+	+	40S - Ø	+	+	+	-	+	-	-
16S - Ø	-	-	-	NA	-	+	+	41S - C	-	-	-	-	-	-	-
17S - C	-	-	-	-	-	+	+	42S - C	-	-	-	-	-	-	-
18S - Ø	+	+	+	-	+	+	+	43S - C	-	+	+	+	+	+	-
19S - V	+	+	+	+	+	+	-	44S - Ø	+	+	+	+	+	-	-
20S - C	-	-	NA	NA	-	-	+	45S - Ø	+	+	+	+	+	+	-
21S - Ø	-	-	NA	-	-	-	-	46S - C	-	-	-	-	-	-	-
22S - Ø	+	+	+	+	+	-	-	47S - Ø	+	+	+	+	+	-	-
23S - C	-	NA	NA	-	-	+	+	48S - C	-	-	-	+	-	-	-
24S - Ø	+	+	+	+	+	-	-	49S - C	-	-	-	-	-	-	-
25S - Ø	-	-	-	-	-	-	-	50S - Ø	-	-	-	-	-	-	-
								51S - Ø	-	-	-	-	-	-	-

Tabela 9: Sumarização dos resultados obtidos em relação à classe das Fluoroquinolonas. Abreviações: Enrofloxacino (ENO), Levofloxacino (LEV), Marbofloxacino (MRB), Norfloxacino (NOR) e Pradofloxacino (PRD). Para antimicrobianos, considerar “+” como resistente, “-” como sensível e “NA” como não avaliado. Para genes associados, considerar “+” como amplificado e “-” como não amplificado. Quadro autoral.

4. Macrolídeos, Lincosamidas e Estreptograminas (MLS)

Ambos os antimicrobianos testados para a avaliação genotípica do grupo MLS apresentaram o mesmo perfil em todas as amostras. Dos 51 isolados, 31 mostraram-se concordantes em sua análise fenotípica, sendo destes 26 sensíveis e 5 resistentes. Dos isolados resistentes sem discrepância,

todos foram positivos para a presença apenas do gene *erm(B)*. Outros 16 isolados apresentaram resistência fenotípica, mas foram negativos para a presença dos três genes testados. Além disso, 4 dos 51 isolados apresentaram discrepância nos perfis de resistência, apresentando o gene de resistência, mas sendo sensíveis no teste disco-difusão (**Quadro 10**).

GRUPO MLS (MACROLÍDEOS, LINCOSAMIDAS E ESTREPTOGRAMINAS)											
ISOLADOS	ANTIMICROBIANO		GENES			ISOLADOS	ANTIMICROBIANO		GENES		
	CLI	ERI	<i>erm(A)</i>	<i>erm(B)</i>	<i>erm(C)</i>		CLI	ERI	<i>erm(A)</i>	<i>erm(B)</i>	<i>erm(C)</i>
1S - Θ	-	-	-	-	-	26S - C	-	-	-	-	-
2S - C	+	+	-	-	-	27S - C	-	-	-	-	-
3S - C	+	+	-	-	-	28S - C	-	-	-	-	-
4S - C	-	-	-	-	-	29S - C	+	+	-	+	-
5S - C	+	+	-	-	-	30S - Θ	-	-	-	-	-
6S - C	-	-	-	-	-	31S - Θ	-	-	-	-	-
7S - Θ	-	-	-	+	-	32S - Θ	-	-	-	-	-
8S - C	-	-	-	-	-	33S - Θ	-	-	-	-	-
9S - C	+	+	-	-	-	34S - Θ	+	+	-	+	-
10S - C	+	+	-	-	-	35S - C	+	+	-	-	-
11S - C	+	+	-	-	-	36S - C	-	-	-	-	-
12S - C	-	-	-	-	-	37S - C	-	-	-	-	-
13S - N	+	+	-	-	-	38S - Θ	+	+	-	+	-
14S - C	-	-	-	-	-	39S - C	-	-	-	-	-
15S - C	-	-	-	-	-	40S - Θ	+	+	-	+	-
16S - Θ	-	-	-	-	-	41S - C	-	-	-	-	-
17S - C	-	-	-	-	-	42S - C	-	-	-	+	+
18S - Θ	-	-	-	-	-	43S - C	-	-	-	+	-
19S - V	+	+	-	-	-	44S - Θ	+	+	-	-	-
20S - C	-	-	-	-	-	45S - Θ	+	+	-	-	-
21S - φ	+	+	-	-	-	46S - C	-	-	-	+	-
22S - Θ	+	+	-	-	-	47S - φ	+	+	-	+	-
23S - C	-	-	-	-	-	48S - C	-	-	-	-	-
24S - Θ	+	+	-	-	-	49S - C	+	+	-	-	-
25S - Θ	-	-	-	-	-	50S - Θ	+	+	-	-	-
						51S - Θ	-	-	-	-	-

Quadro 10: Sumarização dos resultados obtidos em relação ao grupo dos Macrolídeos, Lincosamidas e Estreptograminas (MLS). Abreviações: Eritromicina (ERI) e Clindamicina (CLI). Para antimicrobianos, considerar “+” como resistente e “-” como sensível. Para genes associados, considerar “+” como amplificado e “-” como não amplificado. Quadro autoral.

5. Mupirocina e ácido fusídico

Nenhuma das 51 amostras apresentaram resistência genotípica para os antimicrobianos mupirocina e ácido fusídico. Os isolados não foram testados fenotipicamente para estes dois antimicrobianos.

6. Aminoglicosídeos

Para a classe dos Aminoglicosídeos foi testado apenas um gene. 33 dos 51 isolados apresentaram perfis de resistência genotípico e fenotípico concordantes. Destes, 16 são resistentes à classe e 17 são sensíveis. Outros 11 isolados possuíam resistência fenotípica, mas não são positivos para a

presença do gene *aac(6')-aph(2'')*. Os 7 isolados restantes têm seus perfis de resistência discrepantes, pois possuem o gene de resistência, mas são fenotipicamente sensíveis (**Quadro 11**).

CLASSE DOS AMINOGLICOSÍDEOS									
ISOLADOS	ANTIMICROBIANOS			GENE	ISOLADOS	ANTIMICROBIANOS			GENE
	CAN	GEN	NEO	<i>aac6'-aph2''</i>		CAN	GEN	NEO	<i>aac6'-aph2''</i>
1S - Ø	-	-	-	-	26S - C	-	-	NA	-
2S - C	+	-	-	-	27S - C	-	-	-	-
3S - C	+	+	+	+	28S - C	-	-	-	+
4S - C	-	-	-	+	29S - C	+	-	-	+
5S - C	+	-	-	-	30S - Ø	-	-	-	+
6S - C	-	-	-	-	31S - Ø	-	+	-	+
7S - Ø	-	+	-	+	32S - Ø	NA	-	-	+
8S - C	+	+	-	+	33S - Ø	-	-	-	+
9S - C	+	+	-	+	34S - Ø	+	-	+	+
10S - C	+	-	-	-	35S - C	+	-	-	-
11S - C	+	+	-	+	36S - C	-	-	-	-
12S - C	-	-	-	+	37S - C	-	-	-	-
13S - N	+	+	+	+	38S - Ø	+	+	-	+
14S - C	-	-	-	-	39S - C	-	-	-	-
15S - C	-	-	-	-	40S - Ø	+	+	-	-
16S - Ø	-	-	-	-	41S - C	-	-	-	-
17S - C	-	NA	-	-	42S - C	-	-	-	-
18S - Ø	+	-	-	-	43S - C	-	-	-	-
19S - V	+	+	-	+	44S - Ø	+	+	NA	+
20S - C	+	NA	-	-	45S - Ø	+	+	-	+
21S - φ	+	-	-	+	46S - C	-	-	-	-
22S - Ø	+	-	-	+	47S - φ	NA	+	-	+
23S - C	-	NA	-	+	48S - C	+	+	-	-
24S - Ø	+	+	-	-	49S - C	+	-	-	-
25S - Ø	-	-	-	-	50S - Ø	+	-	-	-
					51S - Ø	-	-	-	-

Quadro 11: Sumarização dos resultados obtidos em relação à classe dos aminoglicosídeos. Abreviações: Canamicina (CAN), Gentamicina (GEN) e Neomicina (NEO). Para antimicrobianos, considerar “+” como resistente, “-” como sensível e “NA” para não avaliado. Para genes associados, considerar “+” como amplificado e “-” como não amplificado. Quadro autoral.

DISCUSSÃO

Segundo o anuário COMAC 2022, no ano de 2021, o Brasil atingiu mais de 85 milhões de pets, sendo 58,1 milhões apenas cães. Além disso, 35% dos lares brasileiros possuem animais de companhia e apenas de 6-9% dos tutores moram sozinhos, evidenciando que muitos brasileiros têm contato direto e frequente com animais de estimação, principalmente cães e gatos (50). Este contato mais frequente e a humanização dos animais de companhia por seus cuidadores foi um dos motivos pelos quais foi criada a iniciativa *One Health* (**figura 4**), que visa integrar a saúde dos animais, seus tutores e do meio ambiente partilhado entre eles (5,7). A resistência antimicrobiana e o compartilhamento

de cepas resistentes e de seus genes de resistência são produtos deste cenário e precisam ser objetos de estudos que visam mapeá-las e evitá-las.



Figura 4: Representação gráfica do conceito de *One Health*. Figura autoral

1. Beta-lactâmicos – *Staphylococcus pseudintermedius* resistentes à metilina (SPRM)

Os antimicrobianos da classe dos beta-lactâmicos são frequentemente usados no tratamento de infecções por *Staphylococcus pseudintermedius* por serem, na maior parte das vezes, efetivos e visarem um alvo não presente nas células dos organismos eucariotos. Antimicrobianos como as cefalosporinas de primeira geração, amoxicilina com clavulanato, clindamicina e sulfonamidas são medicamentos de escolha para o tratamento antimicrobiano sistêmico contra a piodermite e outras infecções causadas por *S. pseudintermedius* (20).

A resistência à classe dos Beta-lactâmicos limita as opções terapêuticas disponíveis, além de direcionar o tratamento para o uso de outros antimicrobianos que não os mais indicados. Essa resistência é mediada por dois importantes genes: *blaZ* e *mecA*. O gene *blaZ* codifica uma enzima penicilinase PC1 capaz de clivar o anel beta-lactâmico, garantindo resistência às penicilinas (21). Dos 51 isolados, 21 amplificaram o gene *blaZ*. Destes, 20 se mostraram resistentes à pelo menos 1 antimicrobiano da classe dos beta-lactâmicos (**figura 5**), sugerindo uma forte concordância entre fenótipo e genótipo dos perfis de resistência. Porém, 1 dos isolados que possui o gene *blaZ* não apresentou resistência *in vitro*. Esse cenário apresenta uma potencial discrepância, onde as condições no teste de disco-difusão não foram suficientes para estimular a expressão do gene, mas as condições *in vivo* podem ser diferentes.

Além disso, 18 isolados dos que não possuem o gene *blaZ* se apresentaram resistentes nos testes disco-difusão, sugerindo outro mecanismo de resistência aos beta-lactâmicos não testado neste estudo.

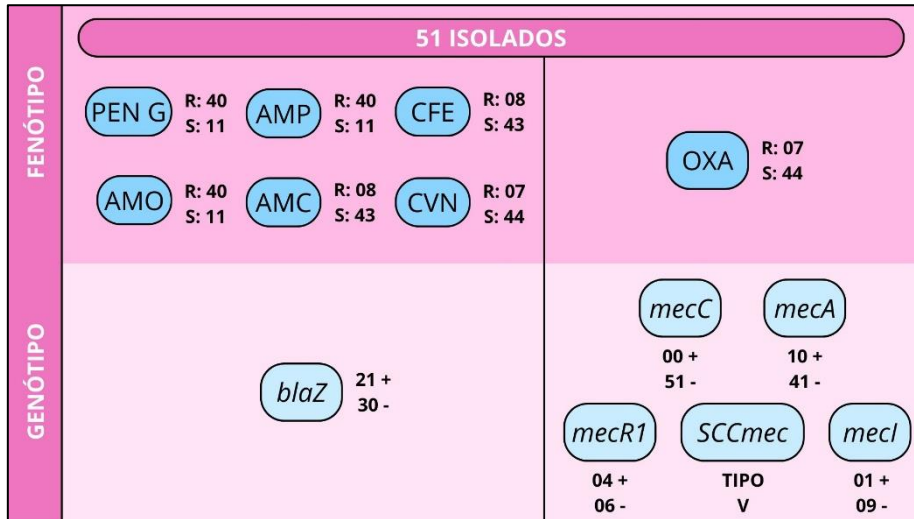


Figura 5: Representação esquemática do número de isolados resistentes (R) e sensíveis (S) aos beta-lactâmicos, assim como os isolados que amplificaram (+) e não amplificaram (-) os genes de resistência relacionados. Figura autoral.

A presença do gene *mecA*, que codifica a proteína de ligação à penicilina (PBP2a) com baixa afinidade com o anel Beta-lactâmico, permite que a síntese da parede celular aconteça normalmente mesmo na presença do antimicrobiano, assim conferindo resistência à toda a classe dos beta-lactâmicos. (13, 22).

Seis dos 51 isolados foram classificados como resistentes à oxacilina segundo seu perfil de resistência antimicrobiana realizado pelo teste de disco infusão de triagem. A resistência à oxacilina (**figura 6**) pode ser utilizada como preditora da presença do gene *mecA* por ter a capacidade de induzir a

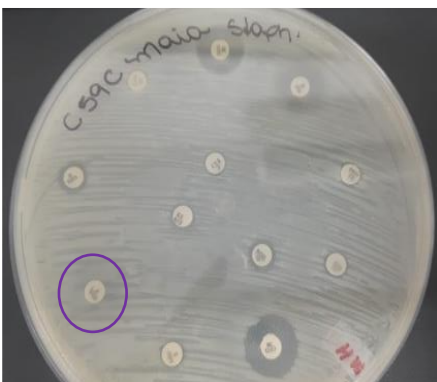


Figura 6: Teste de sensibilidade aos antimicrobianos realizado com um isolado do gênero *Staphylococcus*, oriundo de um isolado cutâneo de cachorro. Nota-se a presença da resistência à oxacilina. Figura autoral.

expressão deste mesmo gene, sendo importante para a análise proposta pelo presente estudo (8, 23).

De todos os isolados, 10 foram positivos para a presença do gene *mecA* na análise genotípica, porém apenas 6 destes apresentaram seu genótipo concordante com seu fenótipo e uma das amostras resistentes à oxacilina não apresentou o gene *mecA*. Por conta desta discrepância, a avaliação do contexto genético de regulação do gene *mecA*, com seus reguladores *mecl* e *mecR1*, são de grande importância. O regulador *mecR1* codifica uma proteína transmembrana e transdutora de sinal que tem função auto proteolítica ao entrar em contato com o antimicrobiano. Sua porção intracelular, ao ser separada, remove o repressor *mecl*, ligado ao promotor, e permite que o gene *mecA* seja transcrito (23) (**Figura 7**).

Os isolados 11S-C, 13S-N e 35S-C possuem o gene *mecA*, mas não têm seus reguladores, levando à hipótese de que este gene está constantemente sendo transcrito, gerando um perfil de resistência concordante. O isolado 6S-C teve os genes *blaZ*, *mecA* e *mecR1* amplificados. Sua resistência fenotípica foi concordante apenas com a presença do gene *blaZ*, podendo estar relacionado com a presença apenas do repressor *mecR1*, que não permite a transcrição do gene *mecA*.

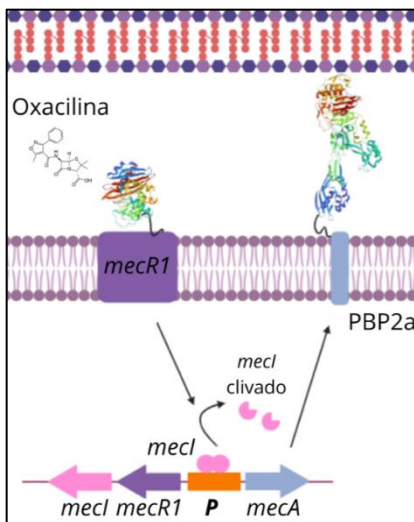


Figura 7: representação esquemática do mecanismo de resistência aos beta-lactâmicos. Adaptado de Alexander et al. (24).

Os isolados 5S-C e 9S-C possuem o gene *blaZ*, *mecA* e seu repressor *mecl*. Apesar de apresentarem apenas o repressor, o gene *mecA* está sendo transcrito e os isolados são fenotipicamente resistentes à classe dos beta-lactâmicos. Isso pode ser devido ao mecanismo de regulação cruzado entre os genes *mecA* e *blaZ*, onde o indutor *blaR1* pode clivar o repressor do gene *mecA* (**figura 8**) (24).

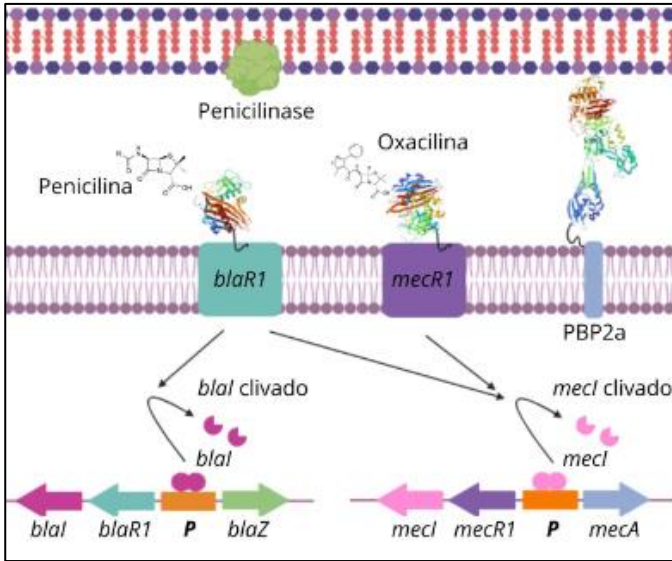


Figura 8: representação esquemática do mecanismo de regulação cruzada. Adaptado de Alexander et al. (24).

Os isolados 24S- Θ e 48S-C têm o gene *mecA* e seu repressor *mecI*. O isolado 48 possui seu perfil fenotípico concordante, sendo sensível a todos os beta-lactâmicos, Porém, apesar de só possuir o repressor, o isolado 24 é fenotipicamente resistente a todos os beta-lactâmicos testados.

Além disso, dois dos isolados (12S-C e 15S-C) têm apenas o gene *mecA*, sem seu repressor, e apresentam resistência fenotípica a todos os antimicrobianos da classe dos beta-lactâmicos testados. Se faz necessária uma análise mais completa dos isolados que possuem essas discrepâncias para que hipóteses sejam levantadas e estudadas.

O gene *mecA* está localizado no Cassete Cromossômico Estafilocócico *Mec* (*SCCmec*), que pode ser compartilhado entre diferentes espécies de estafilococos (**figura 9**) (10) por mecanismos ainda não muito bem elucidados (25). Neste mesmo cassete, outros genes de resistência antimicrobiana e aos metais pesados também podem se fazer presentes, fator que limita ainda mais as opções terapêuticas disponíveis (26).

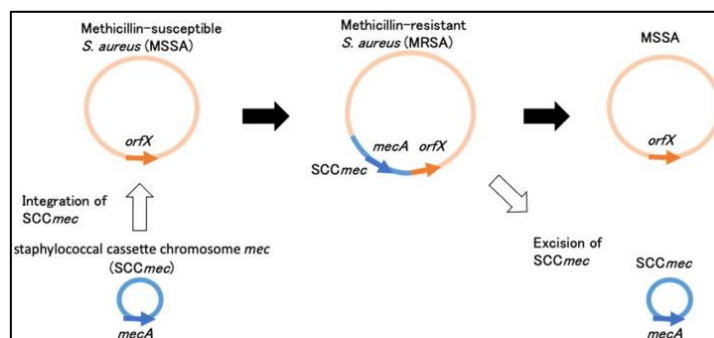


Figura 9: representação esquemática da excisão e integração do *SCCmec* em *S. aureus*. Uehara. (22)

O *SCCmec* é um elemento genético móvel único com localização sítio específica no cromossomo estafilocócico composto por três componentes importantes: 1. o complexo do gene *mec*, formado pelo gene *mecA* e seus reguladores *mecR1* (proteína de transdutora de sinal) e *mecI* (proteína repressora), 2. o complexo *ccr*, composto por genes *ccr*, os quais são genes de recombinase responsáveis pela mobilidade do *SCCmec*, 3. e pelas regiões de junção, as quais são diferentes dos outros dois complexos e podem abrigar outros genes que conferem resistência adicional a antibióticos na forma de cópias integradas de plasmídeos ou transposons (**Figura 10**) (13, 27).

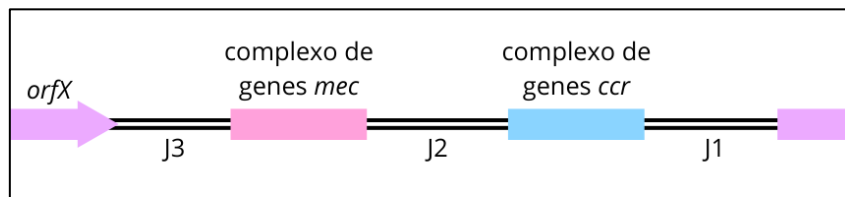


Figura 10: representação esquemática do cassete cromossômico estafilocócico mec (*SCCmec*). Figura autoral.

Até o momento, os *SCCmec* foram classificados em 14 tipos (**figura 11**), sendo estes definidos por meio das variações que existem dentro do complexo *ccr* (*ccrA*, *ccrB* e *ccrC*) e das regiões de junção (*J1*, *J2* e *J3*) (**Quadro 11**). Sua identificação se mostra importante para o estudo da epidemiologia molecular, controle e prevenção de infecções, além da investigação da evolução de cepas resistentes à metilina (22).

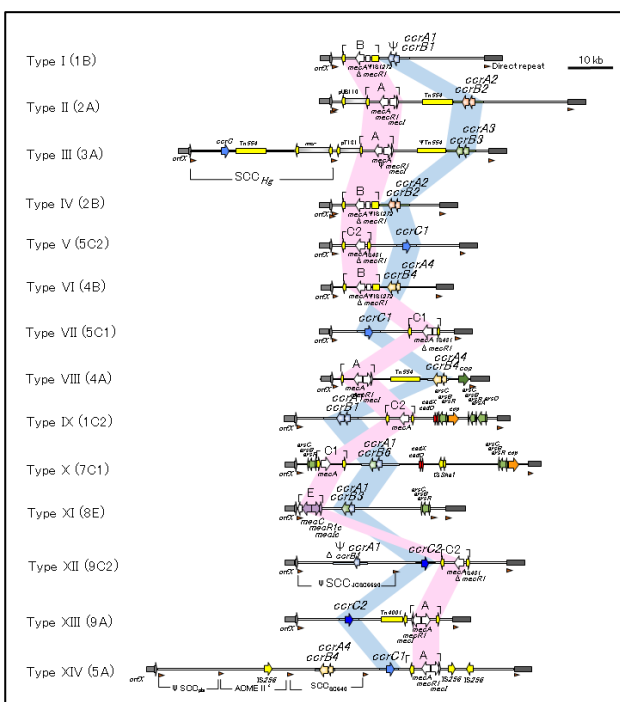


Figura 11: Representação esquemática dos tipos de *SCCmec*. IWG-SCC (43).

Os tipos de *SCCmec* também podem auxiliar na previsão do fenótipo apresentado no perfil de resistência antimicrobiana. Wegener e colaboradores descreveram que os *SCCmec* tipo II e III foram associados à resistência de alto nível para oxacilina, ampicilina e amoxicilina/ácido clavulânico, enquanto o *SCCmec* tipo IV foi associado à resistência de baixo nível para oxacilina e ampicilina e o *SCCmec* tipo V à resistência de baixo nível para amoxicilina/ácido clavulânico (28).

QUADRO 11: TIPOS DE <i>SCCmec</i>			
Tipos de <i>SCCmec</i>	Complexo <i>ccr</i>	Complexo <i>mec</i>	Referências
Tipo I (<i>SCCmecI</i>)	1 (A1B1)	B	ITO et al, 2001
Tipo II (<i>SCCmecII</i>)	2 (AB2B)	A	
Tipo III (<i>SCCmecIII</i>)	3 (A3B3)	A	
Tipo IV (<i>SCCmecIV</i>)	2 (A2B2)	B	MA et al, 2002
Tipo V (<i>SCCmecV</i>)	5 (C1)	C2	ITO et al, 2004
Tipo VI (<i>SCCmecVI</i>)	4 (A4B4)	B	OLIVEIRA et al, 2006
Tipo VII (<i>SCCmecVII</i>)	5 (C1)	C1	BERGLUND et al, 2008
Tipo VIII (<i>SCCmecVIII</i>)	4 (A4B4)	A	ZHANG et al, 2009
Tipo IX (<i>SCCmecIX</i>)	1 (A1B1)	C2	LI et al, 2011
Tipo X (<i>SCCmecX</i>)	7 (A1B6)	C1	
Tipo XI (<i>SCCmecXI</i>)	8 (A1B3)	E	GARCÍA-ÁLVAREZ et al, 2011
Tipo XII (<i>SCCmec XII</i>)	9 (C2)	C2	WU et al, 2015
Tipo XIII (<i>SCCmec XIII</i>)	9 (C2)	A	BAIG et al, 2018
Tipo XIV (<i>SCCmec XIV</i>)	5 (C1)	A	URUSHIBARA et al, 2020
Tipo XV (<i>SCCmec XV</i>)	7 (A1B6)	A	WANG et al, 2022

Quadro 11: Relação dos tipos de *SCCmec* e suas respectivas variações nos complexos *mec* e *ccr*. Quadro autoral.

As amostras confirmadas para a presença do gene *mecA* também foram submetidas à tipagem do cassete cromossômico *SCCmec*. Destas, apenas um isolado foi determinado como tipo V. As outras 9 amostras não apresentaram resultados definitivos, sendo portanto necessária uma análise por sequenciamento.

2. *Staphylococcus pseudintermedius* multidrogas resistente

Apesar dos beta-lactâmicos serem antimicrobianos de escolha comum entre médicos e veterinários por terem seu alvo na parede celular de bactérias, estrutura não existente nas células eucariotas, outras classes de antimicrobianos com alvos variados também são de extrema importância para o tratamento de diversas infecções. Porém, essa variabilidade de alvos diminui drasticamente em se tratando de cepas multidroga resistentes.

As tetraciclina são antimicrobianos que funcionam por meio da interrupção da síntese proteica ao se ligarem na subunidade 30S do ribossomo bacteriano. Dois dos genes que conferem resistência aos antimicrobianos desta classe foram testados no presente estudo. O gene *tet(K)* codifica uma bomba de efluxo capaz de fornecer resistência à toda a classe das tetraciclina, já o gene *tet(M)*

codifica uma proteína de ligação ribossômica capaz de desalojar a tetraciclina do ribossomo (**figura 12**) (29).

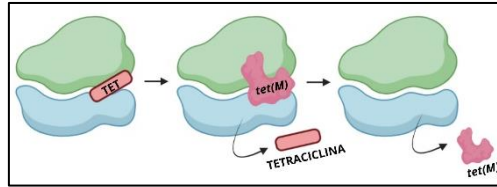


Figura 12: Mecanismo de resistência à tetraciclina. Figura autoral.

Dos 51 isolados testados, um foi positivo para o gene *tet(K)* e apresentou um fenótipo concordante, sendo resistente tanto à tetraciclina, quanto à doxiciclina. Dos isolados positivos para o gene *tet(M)*, 6 apresentaram perfil de resistência discordante: não houve resistência no teste disco-difusão, mas *in vivo* pode ser que, se usada a tetraciclina, o tratamento não seja efetivo.

A classe das fluoroquinolonas tem como mecanismo de ação antimicrobiana a ligação na girase ou na topoisomerase IV, enzimas essenciais para a transcrição e duplicação da dupla fita de DNA (**figura 13**). Microrganismos resistentes à essa classe possuem mutações em suas enzimas que não permitem a ligação entre elas e os antimicrobianos. Neste estudo, 12 isolados positivos para um dos genes *gyrA* e *glrA* não apresentaram resistência fenotípica indicada no teste disco-difusão. Essa discrepância pode levar à administração inadequada de fluoroquinolonas, fazendo com que a conduta incorreta dificulte o tratamento e selecione bactérias resistentes presentes na microbiota dos animais doentes.

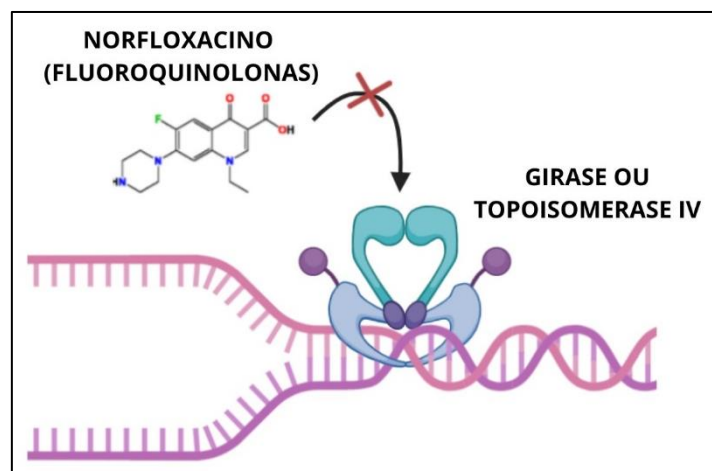


Figura 13: Esquema ilustrativo da ação das fluoroquinolonas. Figura autoral.

Os genes *erm(A)*, *erm(B)* e *erm(C)* quando expressos induzem a resistência contra o grupo dos macrolídeos, lincosamidas e estreptograminas B, antimicrobianos que bloqueiam a saída do peptídeo do ribossomo (**figura 14**).

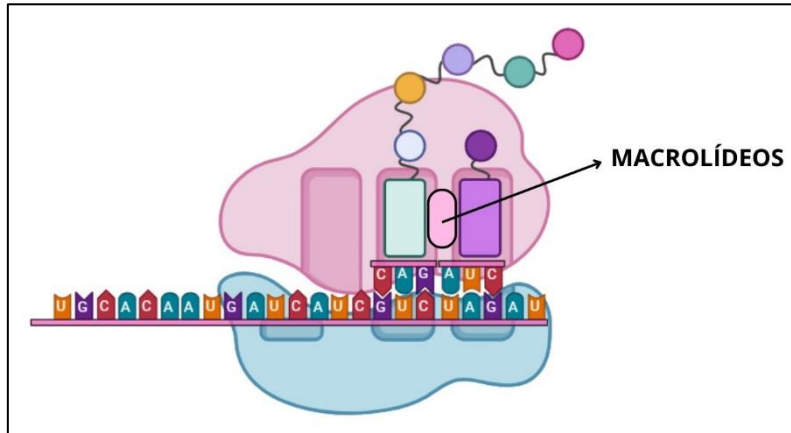


Figura 14: Imagem esquemática do mecanismo dos macrolídeos. Imagem autoral.

Neste estudo, foram testados os três genes em 51 amostras, demonstrando 10 amostras resistentes genotipicamente (**figura 15**). A prevalência do gene *erm(B)* já é descrita na literatura (30). Neste caso, foram observadas 4 discrepâncias, onde um dos genes estava presente, mas não foi encontrada a resistência fenotípica.

	TETRACICLINAS	FLUOROQUINOLONAS	MLS	AMINOGLICOSÍDEOS
FENÓTIPO	<p>TET R: 33 S: 18</p> <p>DOX R: 13 S: 32</p>	<p>ENO R: 18 S: 33</p> <p>LEV R: 19 S: 31</p> <p>MRB R: 19 S: 28</p> <p>NOR R: 17 S: 30</p> <p>PRD R: 19 S: 31</p>	<p>CLI R: 33 S: 18</p> <p>ERI R: 33 S: 18</p>	<p>CAN R: 24 S: 25</p> <p>GEN R: 15 S: 33</p> <p>NEO R: 03 S: 46</p>
GENÓTIPO	<p>tet(M) 38 + 13 -</p> <p>tet(K) 01 + 50 -</p>	<p>gyrA 14 + 37 -</p> <p>glrA 11 + 40 -</p>	<p>erm(A) 00 + 51 -</p> <p>erm(B) 09 + 42 -</p> <p>erm(C) 01 + 50 -</p>	<p>aac(6')-aph(2'') 23 + 28 -</p>

Figura 15: Representação esquemática do número de isolados resistentes (R) e sensíveis (S) às tetraciclínas, fluoroquinolonas, grupo MLS e aminoglicosídeos, assim como os isolados que amplificaram (+) e não amplificaram (-) os genes de resistência relacionados. Figura autoral.

Na classe dos aminoglicosídeos, antimicrobianos responsáveis por causar erros de tradução, foram encontradas 7 discrepâncias, onde os isolados possuíam o gene *aac(6′)-aph(2″)*, mas são fenotipicamente sensíveis a todos os antimicrobianos da classe testados. Os antimicrobianos mupirocina e ácido fusídico não eram testados na clínica veterinária no ano de 2022, fazendo com que a análise dos mesmos fosse feita apenas de forma genotípica a fim de preparar os próximos estudos para o mapeamento da resistência a esses dois antimicrobianos e comparar a disseminação da resistência antes destes serem utilizados na prática clínica e após a implementação de seu uso.

Por fim, 28 dos 51 isolados deste estudo foram classificados como multidroga resistentes, ou seja, são resistentes a 3 ou mais classes de antimicrobianos. Entre estes estão aqueles classificados fenotipicamente como resistentes à metilina.

CONCLUSÃO

A iniciativa *One Health*, ou Saúde Única, visa estudar a interação entre o meio ambiente, os animais e os seres humanos. A resistência antimicrobiana é um exemplo importante das consequências do descontrole das ações tomadas neste ambiente partilhado, visto que pode ser transmitida através de animais de companhia e seus tutores, animais destinados ao consumo e até mesmo ser resultado de pressões seletivas ambientais, as quais podem provocar mudanças na expressão dos genes de resistência e gerar incompatibilidades no perfil fenotípico de resistência *in vitro* e da forma apresentada pela bactéria *in vivo*. Essas discrepâncias dificultam o tratamento e auxiliam na seleção positiva de clones resistentes, gerando um ciclo vicioso que só aumenta os problemas de resistência aos antimicrobianos. A análise das diferenças entre fenótipo e genótipo é importante para o controle e prevenção de infecções, pois permite inferir a eficácia do tratamento de escolha. Além disso, realizar o mapeamento dos genes de resistência e das bactérias multidroga resistentes é importante para a implementação de programas que auxiliem o combate à resistência e procurem otimizar o tratamento antimicrobiano.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. World Health Organization. Global Antimicrobial Resistance and Use Surveillance System (GLASS) report: 2022 [Internet]. Disponível em: <https://www.who.int/publications/i/item/9789240062702>.
2. Hernando-Amado S, Coque TM, Baquero F, Martínez JL. Defining and combating antibiotic resistance from One Health and Global Health perspectives. *Nature Microbiology*. 2019 Aug 22;4(9):1432–42.
3. Tacconelli E, Carrara E, Savoldi A, Harbarth S, Mendelson M, Monnet DL, et al. Discovery, research, and development of new antibiotics: the WHO priority list of antibiotic-resistant bacteria and tuberculosis. *The Lancet Infectious Diseases*. 2018 Mar;18(3):318–27.
4. Lakhundi S, Zhang K. Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*: Molecular Characterization, Evolution, and Epidemiology. *Clinical Microbiology Reviews*. 2018 Sep 12;31(4).
5. Ahmad N, Joji RM, Shahid M. Evolution and implementation of One Health to control the dissemination of antibiotic-resistant bacteria and resistance genes: A review. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*. 2023 Jan 16;12.
6. Gwenzi W, Chaukura N, Muisa-Zikali N, Teta C, Musvuugwa T, Rzymiski P, et al. Insects, Rodents, and Pets as Reservoirs, Vectors, and Sentinels of Antimicrobial Resistance. *Antibiotics*. 2021 Jan 12;10(1):68.
7. CDC. One Health [Internet]. One Health. 2024. Disponível em: <https://www.cdc.gov/one-health/index.html>.
8. Wu MT, Burnham CA. D, Westblade LF, Dien Bard J, Lawhon SD, Wallace MA, et al. Evaluation of Oxacillin and Cefoxitin Disk and MIC Breakpoints for Prediction of Methicillin Resistance in Human and Veterinary Isolates of *Staphylococcus intermedius* Group. *Journal of Clinical Microbiology*. 2016 Mar 1;54(3):535–42.
9. Perreten V, Kania SA, 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*. 2020 Jul 16;
10. Viegas F, Jordana Almeida Santana, Brendhal Almeida Silva, Rafael Albuquerque Xavier, Cláudia Teixeira Bonisson, Sette L, et al. Occurrence and characterization of methicillin-resistant *Staphylococcus* spp. in diseased dogs in Brazil. 2022 Jun 3;17(6):e0269422–2.

11. Lynch SA, Helbig KJ. The Complex Diseases of *Staphylococcus pseudintermedius* in Canines: Where to Next? *Veterinary Sciences*. 2021 Jan 18;8(1):11.
12. Carroll KC, Burnham CAD, Westblade LF. From canines to humans: Clinical importance of *Staphylococcus pseudintermedius*. 2021 Dec 2;17(12):e1009961–1.
13. Chanayat Y, Akatvipat A, Bender JB, Punyapornwithaya V, Meeyam T, Anukool U, et al. The SCCmec Types and Antimicrobial Resistance among Methicillin-Resistant *Staphylococcus* Species Isolated from Dogs with Superficial Pyoderma. *Veterinary Sciences*. 2021 May 13;8(5):85.
14. Moses IB, Santos FF, Gales AC. Human Colonization and Infection by *Staphylococcus pseudintermedius*: An Emerging and Underestimated Zoonotic Pathogen. *Microorganisms*. 2023 Feb 25;11(3):581.
15. Roberts E, Nuttall TJ, G. Gkekas, R.J. Mellanby, Fitzgerald JR, Paterson GK. Not just in man's best friend: A review of *Staphylococcus pseudintermedius* host range and human zoonosis. *Research in Veterinary Science*. 2024 Jul 1;174:105305–5.
16. Yarbrough ML, Lainhart W, Burnham CAD. Epidemiology, Clinical Characteristics, and Antimicrobial Susceptibility Profiles of Human Clinical Isolates of *Staphylococcus intermedius* Group. Mellmann A, editor. *Journal of Clinical Microbiology*. 2018 Mar;56(3).
17. Oh JY, Chae JC, Han JI, Song WK, Lee CM, Park HM. Distribution and epidemiological relatedness of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolated from companion dogs, owners, and environments. *The Journal of Veterinary Medical Science*. 2020 Oct 7;82(9):1379–86.
18. Hughes D, Andersson DI. Environmental and genetic modulation of the phenotypic expression of antibiotic resistance. *FEMS Microbiology Reviews*. 2017 Mar 8;41(3):374–91.
19. Robb AR, Ure R, Chaput DL, Foster G. Emergence of novel methicillin resistant *Staphylococcus pseudintermedius* lineages revealed by whole genome sequencing of isolates from companion animals and humans in Scotland. *PloS One*. 2024;19(7):e0305211.
20. Usasom Khongsri, Peerawit Chongrattanameteekul, Sineenart Chantarachart, Kornravee Photichai, Nittaya Chanayat, Thanya Varinrak, et al. Comparative Susceptibility of Pathogenic Methicillin-Resistant and Methicillin-Susceptible *Staphylococcus pseudintermedius* to Empirical Co-Trimoxazole for Canine Pyoderma. *Life*. 2023 May 18;13(5):1210–0.
21. Srednik ME, Perea C, Giacoboni G, Hicks JA, Foxx CL, Harris B, et al. Genomic Features of Antimicrobial Resistance in *Staphylococcus pseudintermedius* Isolated from Dogs with

- Pyoderma in Argentina and the United States: A Comparative Study. *International Journal of Molecular Sciences*. 2023 Jul 12;24(14):11361–1.
22. Uehara Y. Current Status of Staphylococcal Cassette Chromosome *mec* (SCC*mec*). *Antibiotics*. 2022 Jan 11;11(1):86.
23. Black CC, Eberlein LC, Solyman SM, Wilkes RP, Hartmann FA, Rohrbach BW, et al. The role of *mecA* and *blaZ* regulatory elements in *mecA* expression by regional clones of methicillin-resistant *Staphylococcus pseudintermedius*. *Veterinary Microbiology*. 2011 Aug;151(3-4):345–53.
24. Alexander JAN, Radaeva M, King DT, Chambers HF, Cherkasov A, Chatterjee SS, et al. Structural analysis of avibactam-mediated activation of the *bla* and *mec* divergons in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Journal of Biological Chemistry*. 2020 Aug;295(32):10870–84.
25. Maree M, Thi Nguyen LT, Ohniwa RL, Higashide M, Msadek T, Morikawa K. Natural transformation allows transfer of SCC*mec*-mediated methicillin resistance in *Staphylococcus aureus* biofilms. *Nature Communications*. 2022 May 5;13(1):2477.
26. Phumthanakorn N, Wongsurawat T, Jenjaroenpun P, Kurilung A, Prapasarakul N. Novel Organization of the Staphylococcal Cassette Chromosome *mec* Composite Island in Clinical *Staphylococcus haemolyticus* and *Staphylococcus hominis* Subspecies *hominis* Isolates from Dogs. Khursigara CM, editor. *Microbiology Spectrum*. 2022 Aug 31;10(4).
27. Ito T, Kuwahara-Arai K, Katayama Y, Uehara Y, Han X, Kondo Y, et al. Staphylococcal Cassette Chromosome *mec* (SCC*mec*) analysis of MRSA. *Methods in Molecular Biology* (Clifton, NJ). 2014;1085:131–48.
28. Wegener A, Damborg P, Guardabassi L, Moodley A, Mughini-Gras L, Duim B, et al. Specific staphylococcal cassette chromosome *mec* (SCC*mec*) types and clonal complexes are associated with low-level amoxicillin/clavulanic acid and cefalotin resistance in methicillin-resistant *Staphylococcus pseudintermedius*. *The Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 2020 Mar 1;75(3):508–11.
29. Donhofer A, Franckenberg S, Wickles S, Berninghausen O, Beckmann R, Wilson DN. Structural basis for TetM-mediated tetracycline resistance. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2012 Oct 1;109(42):16900–5.
30. Teixeira IM, de Moraes Assumpção Y, Paletta ACC, Aguiar L, Guimarães L, da Silva IT, et al. Investigation of antimicrobial susceptibility and genetic diversity among *Staphylococcus*


pseudintermedius isolated from dogs in Rio de Janeiro. *Scientific Reports*. 2023 Nov 18;13(1):20219.

31. Aarestrup FM, Agerso Y, Gerner–Smidt P, Madsen M, Jensen LB. Comparison of antimicrobial resistance phenotypes and resistance genes in *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium* from humans in the community, broilers, and pigs in Denmark. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*. 2000 Jun;37(2):127–37.
32. Canver MC, Tekle T, Compton ST, Callan K, Burd EM, Zimmer BL, et al. Performance of Five Commercial Identification Platforms for Identification of *Staphylococcus delphini*. Burnham CAD, editor. *Journal of Clinical Microbiology*. 2019 Nov;57(11).
33. Castanheira M, Watters AA, Bell JM, Turnidge JD, Jones RN. Fusidic Acid Resistance Rates and Prevalence of Resistance Mechanisms among *Staphylococcus* spp. Isolated in North America and Australia, 2007-2008. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 2010 Sep;54(9):3614–7.
34. Costa SS, Oliveira V, Serrano M, Pomba C, Couto I. Phenotypic and Molecular Traits of *Staphylococcus coagulans* Associated with Canine Skin Infections in Portugal. *Antibiotics (Basel, Switzerland)*. 2021 May 2;10(5):518.
35. Costa SS, Palma C, Kadlec K, Fessler AT, Viveiros M, Melo-Cristino J, et al. Plasmid-Borne Antimicrobial Resistance of *Staphylococcus aureus* Isolated in a Hospital in Lisbon, Portugal. *Microbial Drug Resistance (Larchmont, NY)*. 2016 Dec 1;22(8):617–26.
36. Cuny C, Layer F, Strommenger B, Witte W. Rare Occurrence of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* CC130 with a Novel *mecA* Homologue in Humans in Germany. Bereswill S, editor. *PLoS ONE*. 2011 Sep 8;6(9):e24360.
37. McClure-Warnier JA, Conly JM, Zhang K. Erratum: Multiplex PCR Assay for Typing of Staphylococcal Cassette Chromosome Mec Types I to V in Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Journal of Visualized Experiments*. 2013 Sep 5;(79).
38. Erratum: Multiplex PCR Assay for Typing of Staphylococcal Cassette Chromosome Mec Types I to V in Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Journal of Visualized Experiments: JoVE*. 2019 Mar 19;(145).
39. Eucast: New S, I and R definitions [Internet]. www.eucast.org. Disponível em: <https://www.eucast.org/newsiandr>.
40. Jensen LB, Hammerum AM, Bager F, Aarestrup FM. Streptogramin Resistance among *Enterococcus faecium* Isolated from Production Animals in Denmark in 1997. *Microbial Drug Resistance*. 2002 Dec;8(4):369–74.

41. Katayama Y, Ito T, Hiramatsu K. Genetic Organization of the Chromosome Region Surrounding *mecA* in Clinical Staphylococcal Strains: Role of IS431-Mediated *mecI* Deletion in Expression of Resistance in *mecA*-Carrying, Low-Level Methicillin- Resistant *Staphylococcus haemolyticus*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 2001 Jul 1;45(7):1955–63.
42. Morais C, Costa S, Leal M, Ramos B, Andrade M, Ferreira C, et al. Genetic diversity and antimicrobial resistance profiles of *Staphylococcus pseudintermedius* associated with skin and soft-tissue infections in companion animals in Lisbon, Portugal. *Frontiers in Microbiology*. 2023 Apr 17;14.
43. SCCmec. [Internet] Disponível em: <<https://www.sccmec.org/index.php/en/>>.
44. Schnellmann C, Gerber V, Rossano A, Jaquier V, Panchaud Y, Doherr MG, et al. Presence of New *mecA* and *mph(C)* Variants Conferring Antibiotic Resistance in *Staphylococcus* spp. Isolated from the Skin of Horses before and after Clinic Admission. *Journal of Clinical Microbiology*. 2006 Sep 27;44(12):4444–54.
45. Shervington A, Aabasi L, Bdour S. PCR amplification of four genes coding for aminoglycoside-modifying enzymes in bacteria of clinical isolates from Jordan University Hospital. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*. 2001;17(2):139-42.
46. Udo EE. A chromosomal location of the *mupA* gene in *Staphylococcus aureus* expressing high-level mupirocin resistance. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 2003 Mar 28;51(5):1283–6.
47. Wang MY., Geng JL ., Chen YJ ., Song Y, Sun M, Liu HZ ., et al. Direct detection of *mecA*, *bla_{SHV}*, *bla_{CTX-M}*, *bla_{TEM}* and *bla_{OXA}* genes from positive blood culture bottles by multiplex-touchdown PCR assay. *Letters in Applied Microbiology*. 2017 Jan 12;64(2):138–43.
48. Zhang K, McClure JA., Elsayed S, Louie T, Conly JM. Novel Multiplex PCR Assay for Characterization and Concomitant Subtyping of Staphylococcal Cassette Chromosome *mec* Types I to V in Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*. *Journal of Clinical Microbiology*. 2005 Oct 1;43(10):5026–33.
49. Zhang K, McClure JA, Conly JM. Enhanced multiplex PCR assay for typing of staphylococcal cassette chromosome *mec* types I to V in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Molecular and Cellular Probes*. 2012 Oct;26(5):218–21.
50. Anuário Comac 2022: Síntese de indicadores [Internet]. Disponível em: sindan.org.br
51. Sambrook J, David William Russell. *Molecular cloning*. Cold Spring Harbor (New York): Cold Spring Harbor Laboratory Press; 2001.

52. Wilson K. Preparation of genomic DNA from bacteria. Current protocols in molecular biology [Internet]. 2001;Chapter 2:Unit 2.4.

Anexo 1

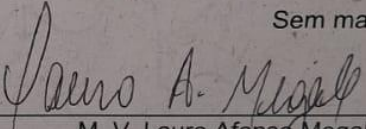

Dognostic
Unidade Veterinária Especializada

DECLARAÇÃO

Eu, Lauro Afonso Megale, M.V. cadastrado no Conselho Regional de Medicina Veterinária sobre o registro 10.222, sócio proprietário e responsável pela Unidade Veterinária Especializada Dognostic, CNPJ 01024097/0001-35, CNAES 75.00-1-00, estando a matriz situada na Rua Padre Adelino, número 1039, Belenzinho; declaro estar ciente da colaboração com o Centro Universitário São Camilo por meio do envio de micro-organismos isolados oriundos de amostras clínicas, para utilização em experimentos e estudos científicos.


São Paulo, 03 de novembro de 2021.

Sem mais,


M. V. Lauro Afonso Megale
CRMV/SP 10.222

UNIDADE BELÉM

Rua Padre Adelino, 1039 - Belém
São Paulo - SP - CEP 03303-000
Fones: (11) 2605-1126 / 2606-3209


Centro Universitário São Camilo
Preservando a vida, educando a consciência.

AGRADECIMENTOS

Ao iniciar meus agradecimentos, não poderia começar de outra forma a não ser agradecendo a Deus, por tudo. Muito obrigada aos meus pais, Luciana e Rogerio Espinosa, que sempre se esforçaram e renunciaram a seus próprios desejos e necessidades para proporcionar uma vida boa e confortável, estudos de qualidade e um lar amoroso para a nossa família. Agradeço também o grande incentivo, o apoio e todos os conselhos: vocês sabem o quanto eles me foram úteis. Amanda, muitíssimo obrigada por ser a melhor irmã do mundo, a pessoa mais generosa que eu conheço. Obrigada por me ouvir falar de curiosidades científicas um pouco duvidosas mesmo durante o almoço.

Agradeço também imensamente aos meus avós, Amparo e João Xavier, por crescerem em mim o amor pelos estudos desde muito cedo. Além disso, vó, muito obrigada por sempre torcer por mim e me apoiar de forma psicológica e de forma prática, com todos os objetos magnéticos. Tio Alexandre, muito obrigada por me aconselhar desde o início a seguir a área da pesquisa, que hoje eu tanto amo, foi através de você que procurei fazer parte de um grupo de Iniciação Científica. Leonardo e Louise, vocês vão longe, espero que saibam que podem contar comigo para tudo! Aos demais familiares que não pude citar nominalmente, agradeço por todo o apoio e consideração, a jornada da graduação não é fácil, mas o incentivo nos ajuda mais do que podemos expressar em palavras.

“Secret árias”, foi muito bom dividir esses anos com vocês, saibam que vocês foram parte importante da minha jornada e sou grata pelo companheirismo.

Agradeço ao meu amado grupo de pesquisa “Centro de Genômica”, que é o motivo pelo qual seguirei como pesquisadora. Obrigada aos meus professores, à DOGNOSTIC e a todos os meus colegas, principalmente Danielly, Giovana, Caroline e Gabriela, as melhores amigas de IC que eu poderia imaginar, Isabella por ter me ensinado tanto e Débora, minha dupla, que sempre esteve ao meu lado passando por todos os momentos bons e os ruins também (só a gente sabe os perrengues que passamos e sempre vou ser grata por ter você como minha companheira).

Por fim, agradeço à minha mãe científica, Marjorie, que desde o início enxergou um potencial que eu nunca reconheceria. Obrigada pelo reconhecimento, pelas oportunidades, pela confiança e pelo companheirismo, saiba que te admiro muito como mulher e como a excelente profissional que é.

Atenciosamente,

Rafalittle.