

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS

MARIA EDUARDA ROCHA JACQUES DA SILVA

**CARACTERIZAÇÃO GENÔMICA DE ISOLADOS DE *Staphylococcus*
pseudintermedius PROVENIENTES DE INFECÇÃO CANINA**

Porto Alegre

2024

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS

**CARACTERIZAÇÃO GENÔMICA DE ISOLADOS DE *Staphylococcus*
pseudintermedius PROVENIENTES DE INFECÇÃO CANINA**

Maria Eduarda Rocha Jacques da Silva

Dissertação apresentada como requisito parcial para a obtenção do grau de mestre em Ciências Veterinárias, especialidade Bacteriologia.

Orientadora: Prof^a Dra. Franciele Maboni Siqueira

Porto Alegre

2024

O Presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001

CIP - Catalogação na Publicação

Rocha Jacques da Silva, Maria Eduarda
Caracterização genômica de isolados de
Staphylococcus pseudintermedius provenientes de
infecção canina / Maria Eduarda Rocha Jacques da
Silva. -- 2024.
64 f.
Orientadora: Franciele Maboni Siqueira.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal do
Rio Grande do Sul, Faculdade de Veterinária, Programa
de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, Porto
Alegre, BR-RS, 2024.

1. Genômica. 2. Microbiologia. 3. Staphylococcus
pseudintermedius. I. Maboni Siqueira, Franciele,
orient. II. Título.

Elaborada pelo Sistema de Geração Automática de Ficha Catalográfica da UFRGS com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

Maria Eduarda Rocha Jacques da Silva

CARACTERIZAÇÃO GENÔMICA DE ISOLADOS DE *Staphylococcus
pseudintermedius* PROVENIENTES DE INFECÇÃO CANINA

Dissertação de Mestrado em Bacteriologia Veterinária submetida ao Programa de Pós-
Graduação em Ciências Veterinárias da Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

Aprovado em: 27/02/2024

Aprovado por:

.....

Dra. Franciele Maboni Siqueira
Orientador e Presidente da Comissão

.....

Dra. Ana Paula Guedes Frazzon
Membro da Comissão

.....

Dr. Bruno de Araújo Penna
Membro da Comissão

.....

Dra. Miliane Moreira Soares de Souza
Membro da Comissão

AGRADECIMENTOS

À minha família, principalmente à minha mãe, Liane, expresso minha gratidão por sempre acreditar em mim e apoiar-me nas minhas decisões e incentivar a busca pelos meus sonhos.

Ao meu namorado, Felipe, agradeço pelo companheirismo, amor e carinho. Obrigada por estar ao meu lado em todos os momentos, fazendo com que cada desafio pareça mais leve e superável.

Aos meus biólogos preferidos, Meyre, Rejane e Giovanni, pela amizade e os momentos compartilhados que tornaram essa jornada ainda mais especial.

À Professora Doutora Franciele Maboni Siqueira, pelo incentivo constante, pelo compartilhamento de conhecimento e dedicada orientação. Muito obrigada pela oportunidade de fazer parte do LaBacVet, foi um privilégio contar com a sua orientação nesse percurso.

À toda a equipe do LaBacVet, pelo acolhimento, crescimento e por todo aprendizado que adquiri com vocês. Em especial, à Gabi e à Mari, pela amizade e pelo companheirismo, vocês foram essenciais.

E a todas as pessoas que de alguma forma somaram para a minha formação

RESUMO

Staphylococcus pseudintermedius é uma bactéria de significativa importância clínica em infecções caninas, frequentemente associada a uma variedade de enfermidades cutâneas e sistêmicas em cães. Embora seja normalmente um comensal na pele e mucosas de animais saudáveis, *S. pseudintermedius* pode se tornar patogênica. A preocupação é ampliada pela crescente prevalência de *S. pseudintermedius* resistente à meticilina (MRSP), representando um desafio significativo na medicina veterinária. A resistência aos betalactâmicos, fundamental no tratamento de infecções bacterianas, destaca a urgência de enfrentar essa resistência de forma proativa, dada sua persistência em ambientes clínicos e comunitários, juntamente com sua transmissibilidade entre animais. Neste estudo, foi realizada a análise genômica de 28 isolados de *S. pseudintermedius*, abrangendo 15 isolados MRSP e 13 isolados sensíveis à meticilina (MSSP). Esses isolados foram obtidos de diversas amostras, incluindo otite, infecções de pele, piometra, cistite e quadros de septicemia em cães. Como resultados, observamos diferença significativa entre o tamanho dos genomas entre os grupos MRSP e MSSP. A média de ilhas genômicas foi de 10,2 ilhas presentes nos isolados MSSP e 16,2 nos isolados MRSP. Na tipagem do SCC*mec*, o tipo III prevaleceu entre os isolados. O sistema CRISPR/Cas completo foi observado em 18% (5/28) dos isolados, sendo que quatro desses isolados pertenciam ao grupo MSSP e um isolado ao grupo MRSP. Todos os isolados foram caracterizados como multirresistentes (MDR), com base na presença de genes marcadores de resistência a antimicrobianos, abrangendo mais de três classes de antibióticos. Na análise dos genes marcadores de resistência a antimicrobianos, o grupo MRSP apresenta um maior número de genes em comparação com o grupo MSSP. Em contraste, o grupo MSSP apresentou um maior número de genes de virulência em comparação com o grupo MRSP. O *core* e o *cloud* genoma apresentaram um maior número de genes em comparação com o *shell* e o *soft-core*, sugerindo um robusto conjunto de genes conservados e essenciais compartilhados entre si, enquanto também exibem uma diversidade de genes que não são essenciais. A análise filogenômica permitiu agrupar os isolados em dois cladogramas: i) clado I, o qual abrange uma diversidade de isolados com diferentes origens, que incluem casos de piometra, otite, sepsis, piodermatite, cistite e pele. ii) clado II, que é composto exclusivamente por isolados MRSP, as quais têm origens de piodermatite, otite, pele e culturas mistas. Este estudo não apenas contribui para o conhecimento atual sobre *S. pseudintermedius*, mas também estabelece uma base sólida para futuras investigações, visando aprimorar a saúde e o tratamento de animais de companhia.

Palavras-chaves: sequenciamento de nova geração; piodermatite; patogenicidade; virulência.

ABSTRACT

Staphylococcus pseudintermedius is a bacterium of significant clinical importance in canine infections, often associated with a variety of cutaneous and systemic diseases in dogs. Although it is normally a commensal on the skin and mucous membranes of healthy animals, *S. pseudintermedius* can become pathogenic. Concern is compounded by the increasing prevalence of methicillin-resistant *S. pseudintermedius* (MRSP), posing a significant challenge in veterinary medicine. Resistance to beta-lactams, crucial in the treatment of bacterial infections, underscores the urgency of addressing this resistance proactively, given its persistence in clinical and community settings, along with its transmissibility among animals. In this study, genomic analysis was conducted on 28 isolates of *S. pseudintermedius*, including 15 MRSP isolates and 13 Methicillin-susceptible *Staphylococcus pseudintermedius* (MSSP) isolates. These isolates of *S. pseudintermedius* were obtained from various samples, including otitis, skin infections, pyometra, cystitis, and cases of septicemia in dogs. As a result, a significant difference was observed in the genome size between the MRSP and MSSP groups. Average number of genomic islands was 10.2 in MSSP isolates and 16.2 in MRSP isolates. In SCCmec typing, type III prevailed among the isolates. Complete CRISPR/Cas system was observed in 18% (5/28) of the isolates, with four of these belonging to the MSSP group and one isolate to the MRSP group. All isolates were characterized as multidrug-resistant (MDR), based on the presence of antimicrobial resistance marker genes spanning more than three antibiotic classes. In the analysis of antimicrobial resistance marker genes, the MRSP group had a higher number of genes compared to the MSSP group. In contrast, the MSSP group exhibited a higher number of virulence genes compared to the MRSP group. Core and cloud genomes had a higher number of genes compared to the shell and soft-core, suggesting a robust set of conserved and essential genes shared among them while also displaying diversity in non-essential genes. Phylogenomic analysis allowed grouping the isolates into two clades: i) Clade I, covering a diversity of isolates with different origins, including cases of pyometra, otitis, sepsis, pyoderma, cystitis, and skin infections. ii) Clade II, composed exclusively of MRSP isolates, originating from pyoderma, otitis, skin, and mixed cultures. This study not only contributes to the current knowledge of *S. pseudintermedius*, but also establishes a solid foundation for future investigations aimed at improving the health and treatment of companion animals.

Keywords: next-generation sequencing; pyodermatitis; pathogenicity; virulence.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1. Box-plot ilustra a distribuição do tamanho do genoma ao comparar os isolados MSSP (n=13) e MRSP (n=15). O teste de normalidade de Shapiro-Wilk indicou que os dados não estavam distribuídos normalmente. O teste de Wilcoxon revelou diferenças significativas, demonstrando diferenças estatisticamente significativas ($P < 0,05$)..... 33

Figura 2. Diagrama de Venn com base nos genes que conferem resistência aos antimicrobianos. A) Comparação de genes de resistência entre os dois grupos: MSSP e MRSP. B) Comparação de genes de resistência considerando as origens dos isolados de *Staphylococcus pseudintermedius*, incluindo sepse, cistite, piometra, otite e piodermatite..... 41

Figura 3. Diagrama de Venn com base nos genes marcadores de virulência. A) Comparação de genes de virulência entre os dois grupos: MSSP e MRSP. B) Comparação de genes de virulência considerando as origens dos isolados de *Staphylococcus pseudintermedius*, incluindo sepse, cistite, piometra, otite e piodermatite 42

Figura 4. Representação em forma de *heatmap* indicando a presença (em roxo) e ausência (em lilás) de genes de virulência em todos os 28 genomas de *S. pseudintermedius* desse estudo..... 44

Figura 5. A) Gráfico representando a análise genômica dos 34 isolados de *S. pseudintermedius*. O *core* genoma com 1847 genes (genes compartilhados entre 33 a 34 genomas); o *shell* genoma com 991 genes (genes compartilhados entre 5 a 32 genomas); *cloud* genoma com 1895 genes (genes compartilhados com 5 genomas); e o *soft-core* com 151 genes (genes compartilhados entre 32 a 33 genomas). B) Distribuição da frequência do número de genes ao longo do número de genomas45

Figura 6. Análise genômica dos 34 isolados de *S. pseudintermedius* relacionada a presença e ausência dos genes por homologia, obtido a partir do alinhamento pelo Roary, conforme descrito na metodologia. Legenda: ST (*Sequencing Type*), Hospedeiro, Origem e Presença ou Ausência do gene *mecA*. NI = não informado..... 47

Figura 7. Árvore filogenômica de 34 isolados de *S. pseudintermedius* utilizando regiões do genoma central, estimada pelo método da Máxima Verossimilhança por meio do *software* MEGA11. No painel direito: a primeira coluna representa a classificação em relação à resistência à meticilina (MRSP e MSSP), a segunda coluna representa a classificação de acordo com a origem dos isolados. Os clados estão destacados em verde, sendo denominados Clado I e Clado II. “*”: Genomas retirados a partir do Banco de dados do NCBI 50

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1.** Genomas completos de 28 isolados de *S. pseudintermedius* foram sequenciados a partir de amostras de diferentes sítios deste estudo. Seis genomas foram adicionados a partir do banco de dados do NCBI 31
- Tabela 2.** Estatísticas de mapeamento e sequenciamento de genoma completo de 28 isolados de *S. pseudintermedius* desse estudo34
- Tabela 3.** Caracterização genotípica dos 28 isolados de *S. pseudintermedius* desse estudo.....35
- Tabela 4.** Diversidade de plasmídeos identificados nos 28 genomas de *S. pseudintermedius*, conforme o programa PlasmidFinder..... 39
- Tabela Suplementar 1.** Diversidade de sequências de inserção encontradas nos 28 genomas de *S. pseudintermedius* deste estudo, de acordo com o programa ISFinder ... 52

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

BGC	<i>Biosynthetic gene clusters</i>
CARD	<i>Comprehensive Antibiotic Resistance Database</i>
CLSI	<i>Clinical and Laboratory Standards Institute</i>
CRISPR	<i>Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats</i>
IG	Ilha Genômica
LaBacVet	Laboratório de Bacteriologia Veterinária
MALDI-TOF	<i>Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Time-of-Flight</i>
Mb	<i>Megabyte</i>
MDR	Multirresistente
MFS	<i>Major Facilitator Superfamily</i>
MV	Máxima Verossimilhança
MLST	<i>Multi-Locus Sequence Typing</i>
MRSA	<i>Staphylococcus aureus</i> resistente à meticilina
MRSP	<i>Staphylococcus pseudintermedius</i> resistente à meticilina
MSSA	<i>Staphylococcus aureus</i> sensível à meticilina
MSSP	<i>Staphylococcus pseudintermedius</i> sensível à meticilina
NCBI	<i>National Center for Biotechnology Information</i>
NDARO	<i>National Database of Antibiotic Resistant Organisms</i>
NGS	<i>Next Generation Sequencing</i>
NRPS	<i>Non-Ribosomal Peptide Synthetases</i>
pb	Pares de base
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i>
PG	Profago
RAM	Resistência antimicrobiana
RGI	<i>Resistance Gene Identifier</i>
SCC _{mec}	<i>Staphylococcal cassette chromosome mec</i>
SCN	<i>Staphylococcus</i> coagulase negativa
SCP	<i>Staphylococcus</i> coagulase positiva
SI	Sequências de inserção
SIG	<i>Staphylococcus intermedius Group</i>
ST	<i>Sequencing type</i>
UFRGS	Universidade Federal do Rio Grande do Sul
VFDB	<i>Virulence Factor Database</i>

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO.....	12
2.	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	14
2.1	O Gênero <i>Staphylococcus</i>.....	14
2.2	<i>Staphylococcus pseudintermedius</i>.....	15
2.2.1	Genômica de <i>Staphylococcus pseudintermedius</i>	16
2.2.2	Distribuição do <i>Sequencing type</i> de <i>Staphylococcus pseudintermedius</i>	17
2.2.3	Determinantes previamente descritos de resistência a antimicrobianos e virulência em <i>Staphylococcus pseudintermedius</i>	18
2.2.4	Semelhanças na Resistência à Meticilina entre <i>Staphylococcus pseudintermedius</i> e <i>Staphylococcus aureus</i>	19
2.2.5	Identificação de <i>Staphylococcus pseudintermedius</i>	21
3.	HIPÓTESES CIENTÍFICAS.....	23
4.	OBJETIVOS.....	24
4.1	Objetivo geral	24
4.2	Objetivos específicos	24
5.	METODOLOGIA, RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	25
6	CONCLUSÕES	57
7	PERSPECTIVAS	58
8	REFERÊNCIAS	59

1. INTRODUÇÃO

Staphylococcus pseudintermedius é uma bactéria de significativa importância clínica em infecções caninas (Lynch; Helbig, 2021), frequentemente associada a uma variedade de enfermidades cutâneas e sistêmicas em cães, como piodermatite, otite e bacteremia (Bannoehr; Guardabassi, 2012; Penna *et al.*, 2022). Embora seja normalmente um comensal na pele e mucosas de animais saudáveis, *S. pseudintermedius* pode se tornar patogênica em circunstâncias específicas, desencadeando infecções. Destaca-se como o principal agente causador de piodermatite em cães (Bannoehr; Guardabassi, 2012).

Além disso, a crescente prevalência de *S. pseudintermedius* resistente à meticilina (MRSP) tem suscitado preocupações no campo da medicina veterinária (Prior *et al.*, 2022; Rana *et al.*, 2022). A resistência aos betalactâmicos, utilizado no tratamento de diversas infecções bacterianas, apresenta desafios significativos para a eficácia dos tratamentos convencionais. A habilidade do MRSP de persistir e se disseminar tanto em ambientes clínicos quanto comunitários, aliada à sua transmissibilidade entre animais, sublinha a urgência de enfrentar essa resistência de maneira proativa (Feng *et al.*, 2012; Fungwithaya *et al.*, 2022).

Em um estudo conduzido por Nakaminami *et al.* (2021), que abordou isolados de *S. pseudintermedius* provenientes de narinas e áreas afetadas por piodermatite, foi observada uma equivalência na prevalência de MRSP. Os resultados revelaram taxas de 32% nas narinas, comparadas a 34% nos locais de piodermatite, destacando a persistência consistente desses isolados resistentes.

Para além das implicações na saúde canina, há uma preocupação em ascensão quanto ao potencial zoonótico de *S. pseudintermedius* (Somayaji *et al.*, 2016). Apesar de ser comumente considerado um patógeno específico de animais de companhia, estudos recentes têm levantado a possibilidade de transmissão de *S. pseudintermedius* para seres humanos, ressaltando a importância de compreender e controlar esse microrganismo (Guimarães *et al.*, 2023; Lozano *et al.*, 2017). Essa dualidade de preocupações, tanto na esfera veterinária quanto na saúde pública, destaca a necessidade urgente de abordagens integradas visando mitigar os riscos associados a esses isolados resistentes e com potencial zoonótico.

O monitoramento genômico de *S. pseudintermedius* torna-se uma ferramenta crucial para compreender e gerenciar as implicações clínicas e epidemiológicas associadas a essa bactéria. Ao analisar a informação genética dos isolados, podemos identificar padrões de resistência antimicrobiana, entender a diversidade genética e mapear a evolução da espécie.

Um estudo com cães revelou linhagens genéticas frequentemente associadas ao MSSP/MRSP, como ST20/ST71, destacando a detecção frequente do clone epidêmico europeu MRSP-ST71 em cães (Abdullahi *et al.*, 2022). Comumente encontrado na Europa, o clone ST71 apresenta uma disseminação global, e diversos estudos demonstram a circulação dele na América do Sul (Breyer *et al.*, 2023; Penna *et al.*, 2022; Quitoco *et al.*, 2013). Esses achados reforçam a importância do monitoramento genômico na identificação de padrões específicos de resistência e na compreensão da disseminação de linhagens potencialmente mais virulentas, contribuindo assim para a formulação de estratégias mais eficazes no controle dessas infecções.

Essa abordagem não apenas aprimora nosso entendimento da biologia de *S. pseudintermedius*, mas também desempenha um papel crucial na orientação de práticas clínicas, políticas de saúde pública e estratégias de tratamento para a prevenção e controle de infecções em animais de companhia. O rastreamento de isolados resistentes a antimicrobianos é vital para formular estratégias eficazes, combatendo a propagação dessas variantes e oferecendo insights sobre virulência e disseminação em populações caninas, contribuindo assim para a mitigação de riscos zoonóticos.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 O gênero *Staphylococcus*

O gênero *Staphylococcus* pertence à família *Micrococcaceae* e é composto por microrganismos anaeróbios facultativos. Isso significa que eles possuem a capacidade de crescer tanto em ambientes aeróbios, utilizando oxigênio, quanto facultativamente crescer em ambientes anaeróbios. São cocos Gram-positivos que possuem aproximadamente 1 μm de diâmetro e tendem a formar agrupamentos em arranjos semelhantes a cachos de uva. A maioria dos estafilococos produzem a enzima catalase, responsável por converter peróxido de hidrogênio em água e oxigênio. A prova da catalase é uma ferramenta útil para distinguir o gênero *Staphylococcus* do gênero *Streptococcus*. Em geral, os estafilococos são catalase positivo, com exceção de *Staphylococcus aureus* subsp. *anaerobius* e *Staphylococcus saccharolyticus*, enquanto os estreptococos são catalase negativa (Quinn *et al.*, 2007).

Outra característica importante do gênero *Staphylococcus* é a produção de coagulase, que divide o gênero em dois grupos: *Staphylococcus* coagulase negativo (SCN) e *Staphylococcus* coagulase positiva (SCP). Embora o grupo SCN seja geralmente considerado como bactérias comensais, o aumento de infecções nosocomiais causadas por SCN tem gerado preocupações, exigindo uma reconsideração do *status* dessas bactérias (Argemi *et al.*, 2019). Por outro lado, o grupo SCP, também reconhecido como parte da microbiota, destaca-se como um significativo causador de infecções oportunistas, sendo de grande relevância no contexto hospitalar (Beça *et al.*, 2015).

O gênero *Staphylococcus* destaca-se como um grupo bacteriano de relevância crucial tanto na medicina humana quanto na veterinária, com seus patógenos desempenhando um papel significativo ao causar infecções estafilocócicas em diversos hospedeiros e sítios. A pele, seja nos seres humanos ou em outras espécies, atua como um reservatório natural para *Staphylococcus*, sendo frequentemente transmitidas por meio de contato direto. Essa capacidade de colonizar e persistir nos hospedeiros é um aspecto fundamental da epidemiologia dessas bactérias e destaca a importância de estratégias eficazes de prevenção e controle de doenças por *Staphylococcus* (Paharik; Horswill, 2016).

Entre as espécies mais proeminentes, destacam-se o *Staphylococcus aureus* e o *Staphylococcus epidermidis* considerados os agentes mais associados a infecções humanas. *S. aureus*, em particular, é conhecido por sua capacidade de causar uma variedade de infecções, abrangendo desde infecções superficiais da pele até casos mais graves, como

pneumonia e bacteremia (Sollid *et al.*, 2014). Já *S. epidermidis*, por sua vez, assume um papel crucial como um dos principais agentes causadores de infecções associadas a implantes de dispositivos médicos. A capacidade destas espécies de formar biofilme contribui para a persistência das infecções e representa um desafio no tratamento clínico (Farrington; Allon, 2019). A colonização de dispositivos médicos implantados permite o acesso de bactérias à corrente sanguínea, tornando-se um importante responsável pelas bacteremias (Kleinschmidt *et al.*, 2015)

Outro microrganismo relevante dentro do gênero é *Staphylococcus pseudintermedius*, que se destaca como um importante agente causador de infecções em animais de companhia, especialmente em caninos. Este microrganismo é amplamente reconhecido como um dos principais responsáveis por casos de piodermatite, sendo também associado a uma variedade de outras condições patológicas, incluindo otites, infecções no trato urinário e sistêmicas. Sua ampla gama de manifestações comprova sua significativa relevância clínica (Bannoehr; Guardabassi, 2012).

2.2 *Staphylococcus pseudintermedius*

S. pseudintermedius é reconhecida como comensal, habitando a pele e as mucosas de animais hígidos. Contudo, em condições específicas, pode se tornar patogênica, desencadeando infecções, especialmente em animais debilitados ou com sistemas imunológicos comprometidos. Destaca-se, sobretudo, como o principal agente causador da piodermatite em cães, e está também relacionado a otites, cistites, bacteremias e infecções pós-cirúrgicas (Bannoehr; Guardabassi, 2012; Devriese *et al.*, 2005; Penna *et al.*, 2022).

Anteriormente, *S. pseudintermedius* era descrito como *Staphylococcus intermedius*, o que levava a diagnósticos equivocados sobre o agente responsável pela patogênese. No entanto, avanços em estudos moleculares possibilitaram uma distinção precisa entre as espécies anteriormente classificadas como *Staphylococcus intermedius*, resultando na identificação de três novas espécies: *Staphylococcus delphini*, *S. pseudintermedius* e *S. intermedius*, que formam o grupo SIG (*S. intermedius Group*). Essa descoberta esclareceu suas identidades individuais e contribuiu para uma classificação mais precisa desses agentes (Devriese *et al.*, 2005).

Em um estudo conduzido por Sasaki *et al.* (2007a), foram examinadas 117 isolados inicialmente designadas como *S. intermedius*. Por meio de filogenias moleculares, esses isolados foram reclassificados no grupo SIG. Notavelmente, os isolados provenientes de

cães, gatos e humanos foram reclassificadas como *S. pseudintermedius*, enquanto os isolados de pombos selvagens foram identificadas como *S. intermedius*. Linhagens isoladas de pombos domésticos, um pombo selvagem, cavalos e um vison foram, por sua vez, identificadas como *S. delphini* (Sasaki *et al.*, 2007a).

Cães são as espécies animais frequentemente afetadas por *S. pseudintermedius*, com uma taxa de ocorrência de 84,7%, seguida de 22% em gatos e 12,2% em equinos (Ruscher *et al.*, 2009). Esta bactéria, embora predominantemente associada a infecções em animais, mostrou-se capaz de desencadear infecções em seres humanos. O primeiro relato de infecção por *S. pseudintermedius* em seres humanos foi publicado em 2005, estando associado ao uso de dispositivo cardiodesfibrilador implantável (Van Hoovels *et al.*, 2006).

2.2.1 Genômica de *Staphylococcus pseudintermedius*

O Sequenciamento de Nova Geração (NGS, do inglês *Next Generation Sequencing*) revolucionou os estudos de genômica comparativa, permitindo uma análise detalhada da composição genética de diferentes isolados bacterianas. O primeiro sequenciamento genômico completo de *S. pseudintermedius* foi conduzido por Zakour *et al.* (2011) utilizando a tecnologia de sequenciamento 454 da Roche.

Nesse estudo, a primeira sequência do genoma completo de um isolado clínico de *S. pseudintermedius* (ED99) foi detalhadamente analisada, revelando a presença de um único cromossomo circular com 2,572,216 pares de bases. Além disso, o conteúdo médio de G+C foi determinado como 37,6%, fornecendo informações cruciais sobre a composição genética desse isolados. Essa abordagem possibilitou uma visão geral da organização gênica de *S. pseudintermedius* (Zakour *et al.*, 2011).

Com o avanço dos estudos de genômica, foi possível observar que o tamanho do genoma de *S. pseudintermedius* pode variar de acordo com a origem e as características dos isolados, apresentando uma variação de 2,4 a 2,8 Mb (Fàbregas *et al.*, 2023; Ferrer *et al.*, 2021; Zakour *et al.*, 2011). Atualmente, 4.893 genomas de *S. pseudintermedius* estão depositados na plataforma do NCBI (*National Center for Biotechnology Information*) (dados coletados em 19/01/2024), o que ilustra o montante de pesquisa com esta bactéria, e a disponibilidade de dados para que seja possível, cada vez mais, se compreender o perfil genético e patogênico deste importante patógeno. Interessantemente, no que diz respeito ao tamanho do genoma, foi identificada uma diferença estatisticamente significativa entre os tamanhos dos genomas dos isolados MRSP (*Staphylococcus pseudintermedius* resistente à

meticilina) e MSSP (*Staphylococcus pseudintermedius* sensível à meticilina), sendo o genoma de cepas MRSP geralmente maiores (Ferrer *et al.*, 2021).

Além disso, foi constatado que, embora os isolados de *S. pseudintermedius* provenientes de casos clínicos e os comensais compartilhem semelhanças em sua arquitetura genética central e acessória, há distinções significativas em termos de presença de marcas de resistência a antimicrobianos. Os isolados clínicos abrigam mais genes que conferem resistência a antimicrobianos, potencialmente manifestando, assim, uma resistência fenotípica mais pronunciada, ao passo que os isolados colonizadores e de superfície abrigam sistemas de defesa semelhantes a CRISPR (Sawhney *et al.*, 2023).

2.2.2 Distribuição dos *Sequencing type* de *Staphylococcus pseudintermedius*

A tipagem de sequência multilocus (MLST, do inglês *Multi-Locus Sequence Typing*) é uma abordagem valiosa que possibilita a avaliação da diversidade genética populacional dos isolados. Essa técnica, ao analisar múltiplos *loci* genéticos, não apenas contribui para a identificação de diferentes linhagens, mas também desempenha um papel crucial no rastreamento da disseminação desses isolados ao longo do tempo e entre diferentes populações. A técnica de MLST tem sido fundamental para compreender a evolução, origem e propagação de isolados bacterianos, fornecendo informações valiosas para estudos epidemiológicos e de resistência antimicrobiana (Maiden, 2006). Os genes *housekeeping* para MLST de *S. pseudintermedius* incluem: *ack*, *cpn60*, *fdh*, *pta*, *purA*, *sar* e *tuf* (Solyman *et al.*, 2013)

O *Sequence Type* (ST) mais predominante de *S. pseudintermedius* é o clone ST71, notadamente associado a isolados de piodermatite, com uma presença geográfica amplamente difundida (Papić *et al.*, 2021). Diversos estudos indicam que o ST71 foi o clone mais comumente identificado na Europa. Em um estudo realizado na França em 2010, foi revelada uma prevalência de 16,9% de MRSP, sendo predominantemente do tipo ST71 (Haenni *et al.*, 2014). No Brasil, vários estudos relatam a presença do ST71 como o mais predominante, frequentemente acompanhado por uma variedade de outros STs (Breyer *et al.*, 2023; Penna *et al.*, 2022; Teixeira *et al.*, 2023).

Contudo, nos últimos anos, várias publicações também sugerem um declínio na prevalência do clone ST71, acompanhado pelo surgimento da linhagem ST258. Uma investigação mais recente na França mostrou que a coleção de *S. pseudintermedius* de 2012-2013 apresentou uma prevalência de 62,3% para o ST71, enquanto a coleção de 2015-

2016 registrou 55,2% para o mesmo ST71 (Bergot *et al.*, 2018).

Dentre os STs mais prevalentes nos isolados MRSP, além do ST71, estão o ST45, ST258, ST261, ST112, ST265, ST68, ST169 e ST181 (Dos Santos *et al.*, 2016). No Brasil, foram identificadas ocorrências do ST71, juntamente com outros STs, tais como ST2283, ST2285, ST2288, ST2124 e ST2287. Todos esses STs demonstraram resistência a pelo menos sete classes diferentes de antimicrobianos não beta-lactâmicos (Penna *et al.*, 2022; Teixeira *et al.*, 2023). Essa diversidade genética destaca a presença e distribuição variada de diferentes clones de *S. pseudintermedius* ao redor do mundo.

2.2.3 Determinantes previamente descritos de resistência a antimicrobianos e virulência em *Staphylococcus pseudintermedius*

Ao explorar os determinantes de resistência a antibióticos em isolados MRSP e MSSP, destaca-se que esses genes conferem resistência a uma ampla variedade de antimicrobianos, como beta-lactâmicos, aminoglicosídeos, macrolídeos, fosfomicina, cloranfenicol, quinolonas, entre outros. Nota-se a identificação consistente de cinco desses genes (*blaz*, *sdrM*, *norA*, *fosB* e *ykkcd*) em todos os isolados, tanto MRSP quanto MSSP (Teixeira *et al.*, 2023). Outros estudos corroboram esses achados, incluindo genes como *mecA*, *aac(6')-aph(2'')*, *aadD*, *ant6-Ia*, *aph3-III*, *cat*, *pC221*, *dfrG*, *ermB*, *ermC*, *sat4A* e *tet(M)* (Abdullahi *et al.*, 2022; Gómez-Sanz *et al.*, 2013).

A patogenicidade de *S. pseudintermedius* está ligada a habilidade de aderir e interagir com a matriz extracelular do hospedeiro, desencadeando assim o processo infeccioso que envolve a liberação de toxinas (Kmieciak; Szewczyk, 2018). O desenvolvimento desse processo é impulsionado pela capacidade dos isolados de invadir e evadir o sistema imune do hospedeiro (Pompilio *et al.*, 2015). No que diz respeito aos genes de virulência, leucotoxinas como *luk-S/FI* e toxinas esfoliativas como *siet* e *expA* são frequentemente identificadas nos genomas de *S. pseudintermedius* (Bannoehr; Guardabassi, 2012; Breyer *et al.*, 2023). Além disso, os genes de proteína de superfície (*spsC*, *spsE*, *spsH*, *spsK*, *spsA*, *spsB*, *spsG*, *spsI*, *spsM*, *spsN*, *spsQ* e *spsR*) e as toxinas pirogênicas *se-int* e *seh* também foram descritos (Abdullahi *et al.*, 2022; Bannoehr; Guardabassi, 2012).

Diversos estudos, por meio de análises fenotípicas *in vitro*, evidenciam que os isolados de *S. pseudintermedius*, tanto MSSP quanto MRSP, compartilham genes marcadores de virulência como *siet*, *lukS* e *lukF*. Notavelmente, observou-se que isolados MSSP apresentavam um perfil mais pronunciado de genes marcadores de virulência,

incluindo genes como *sel*, *seq* e *sem* (Breyer *et al.*, 2023).

Em relação à resistência fenotípica aos antimicrobianos, um estudo conduzido no Rio de Janeiro revelou que 63,5% dos isolados de *S. pseudintermedius* foram classificados como multirresistentes (MDR) (Teixeira *et al.*, 2023). Além disso, em Porto Alegre, outra investigação constatou que todos os isolados de MRSP e 77% dos isolados de MSSP também foram categorizados como MDR (Breyer *et al.*, 2023). Esses dados evidenciam uma preocupante disseminação da resistência antimicrobiana nessa espécie bacteriana em diferentes regiões.

O biofilme é crucial para a fisiologia e patogenicidade de *S. pseudintermedius*, representando uma comunidade bacteriana multicelular envolvida por uma matriz extracelular polissacarídica (Pompilio *et al.*, 2015). Essa estrutura proporciona vantagens adaptativas, favorecendo a sobrevivência em ambientes adversos. Essa característica é essencial não apenas para a persistência no hospedeiro, mas também para a resistência aos tratamentos antimicrobianos, tornando os biofilmes uma barreira desafiadora em contextos clínicos (Paharik; Horswill, 2016).

Em concordância, um estudo recente revelou que todos os isolados de *S. pseudintermedius*, tanto MRSP quanto MSSP, investigados demonstraram forte capacidade de formação de biofilme (Breyer *et al.*, 2023). Além disso, outro estudo evidenciou que todos os isolados clínicos de *S. pseudintermedius* formaram biofilme em diferentes materiais de sutura, independentemente da resistência à meticilina (Pesset *et al.*, 2022). É crucial destacar que a presença dos genes *icaA* e *icaD* tem sido consistentemente relacionada a esse fenômeno em diversos estudos, reforçando sua importância na formação de biofilme (Breyer *et al.*, 2023; Marques *et al.*, 2021; Pesset *et al.*, 2022).

Essas descobertas ressaltam não apenas a complexidade da resistência antimicrobiana em isolados de *S. pseudintermedius*, mas também a presença de fatores de virulência que podem influenciar a patogenicidade dessas bactérias. A compreensão abrangente desses aspectos é crucial para desenvolver estratégias eficazes de controle e tratamento, para infecção causadas por *S. pseudintermedius*, diante da crescente preocupação com a seleção de isolados resistentes a antimicrobianos.

2.2.4 Semelhanças na Resistência à Meticilina entre *Staphylococcus pseudintermedius* e *Staphylococcus aureus*

A patogênese e os fatores de virulência são semelhantes entre *S. pseudintermedius* e

S. aureus, incluindo a produção de toxinas, a capacidade de formar biofilmes e a habilidade de evadir o sistema imunológico. Dentre os fatores de virulência, destacam-se a protease, coagulase, fator de agregação, enterotoxinas, toxina esfoliativa, leucotoxina e hemolisinas alfa e beta (Futagawa-Saito *et al.*, 2006).

Ambos os isolados compartilham um fator significativo em termos de saúde pública: a capacidade de desenvolver resistência antimicrobiana devido à presença do gene *mecA*, que codifica a proteína de ligação à penicilina 2a (*PBP2a*), conferindo resistência à ação de antibióticos beta-lactâmicos, como a meticilina. Esses antibióticos constituem uma classe importante de medicamentos amplamente utilizados no tratamento de infecções bacterianas. Os isolados de *S. aureus* resistentes à meticilina são conhecidos como MRSA (*Staphylococcus aureus* resistente à meticilina) e os isolados de *S. pseudintermedius* resistentes são denominados MRSP (*Staphylococcus pseudintermedius* resistente à meticilina) (Kleinschmidt *et al.*, 2015).

A resistência a antimicrobianos tornou-se uma das preocupações mais proeminentes na atualidade. Desde 2006, estudos indicam um aumento frequente na prevalência de isolados resistentes à meticilina. O primeiro relato de MRSP em cães e humanos isolados em uma clínica veterinária foi publicado em 2007 (Sasaki *et al.*, 2007b). Em um estudo na China, que abrangeu cães e gatos coletados entre 2007 e 2009, foi revelada a ocorrência de MRSP em animais de companhia saudáveis, indicando que os isolados de MRSP já circulavam entre animais hígidos (Feng *et al.*, 2012). Mais recentemente, um estudo conduzido na África do Sul em 2022 identificou uma prevalência notável de 85,9% de MRSP provenientes de sítios como piodermatite e otite (Prior *et al.*, 2022). No Brasil, em um estudo com 123 isolados de *S. pseudintermedius* provenientes de amostras clínicas de processos infecciosos em animais de companhia, 40% deles foram identificados como MRSP (Holmström *et al.*, 2020).

Além disso, a crescente incidência de infecções por MRSA tem sido atribuída à identificação de novos clones, caracterizados como MRSA associado à comunidade (David; Daum, 2010). Enquanto a prevalência de *S. aureus* em pacientes humanos hospitalizados com pneumonia adquirida foi de 1,6%, incluindo 0,7% com MRSA e 1,0% com MSSA (Self *et al.*, 2016). Dados coletados em animais de companhia revelaram que a presença de MRSA foi observada em 2,13% dos cães, 1,5 dos gatos e 2% dos equinos (Loeffler *et al.*, 2011).

A importância de abordar a presença de MRSA e MRSP no ambiente doméstico é evidenciada por esses dados, enfatizando a necessidade de especial atenção à possibilidade

de transmissão bacteriana entre humanos e animais e vice-versa. A disseminação significativa desses isolados resistentes em contextos clínicos veterinários enfatiza a necessidade de compreender sua diversidade genética para identificar padrões de transmissão e desenvolver estratégias de controle eficazes.

2.2.5 Identificação de *Staphylococcus pseudintermedius*

A identificação de *S. pseudintermedius* envolve uma abordagem abrangente, iniciando com a coleta de amostras de tecidos afetados, *swabs* de superfícies cutâneas, material purulento, feridas ou outros fluidos corporais (Fazakerley *et al.*, 2010). Essas amostras são então cultivadas em meios de cultura apropriados através de técnicas microbiológicas. As colônias resultantes são identificadas quanto à morfologia das colônias através da coloração de Gram, características bioquímicas, envolvendo os testes de catalase e coagulase e muitos outros, e sensibilidade antimicrobiana (Devriese *et al.*, 2005).

Para confirmação precisa da espécie e a diferenciação do grupo SIG, torna-se necessário o uso de técnicas mais avançadas, como a Reação em cadeia da polimerase (PCR, do inglês *Polymerase Chain Reaction*) e a Espectrometria de Massa por Tempo de Voo de Ionização/Desorção por Laser Assistida por Matriz (MALDI-TOF, do inglês *Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Time-of-Flight*) (Bannoehr *et al.*, 2009; Nisa *et al.*, 2019). Além da PCR e MALDI-TOF, vale destacar tecnologias emergentes, como o NGS, que estão sendo exploradas para aprimorar a precisão e a eficiência no diagnóstico de patógenos (Hilt; Ferrieri, 2022). Em resumo, a aplicação de testes fenotípicos ou métodos moleculares são cruciais para a caracterização precisa desses isolados no contexto clínico.

No âmbito do diagnóstico fenotípico, os testes de sensibilidade antimicrobiana são essenciais para avaliar a resistência a antibióticos. A oxacilina é amplamente utilizada como indicador de resistência a meticilina devido à sua alta sensibilidade e estabilidade (Wu *et al.*, 2016). As técnicas comuns para essa identificação seguem as diretrizes do *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI) e incluem métodos como o teste de disco-difusão e a microdiluição (Holmström *et al.*, 2020). Essas práticas padronizadas garantem resultados confiáveis e comparáveis na determinação do perfil de resistência antimicrobiana de *S. pseudintermedius*.

Adicionalmente, é recomendada a utilização de técnicas moleculares, como a PCR, para amplificar e identificar o gene *mecA*, o qual é marcador de resistência à meticilina (Zhang *et al.*, 2005). A detecção desse gene, atualmente, confirma a resistência à meticilina,

permitindo a classificação do isolado como meticilina resistente (González-Domínguez *et al.*, 2020). Essa abordagem molecular oferece uma maior sensibilidade na identificação da resistência, contribuindo para uma avaliação mais precisa do perfil antimicrobiano do isolado.

3. HIPÓTESES CIENTÍFICAS

- Se há diferença nas origens clínicas e no perfil de suscetibilidade à meticilina dos isolados de *S. pseudintermedius*, então é possível que haja diferença no perfil genotípico.

4. OBJETIVOS

4.1 Objetivo geral

Comparar isolados de *S. pseudintermedius* originários de diferentes sítios de infecção canina através de análises *in silico* (análises genômicas).

4.2 Objetivos específicos

- Realizar a montagem e anotação de genomas de *S. pseudintermedius* MRSP e MSSP oriundos de infecções caninas.
- Analisar os genomas dos isolados de *S. pseudintermedius*, verificando e comparando características gerais da estrutura desses genomas, potencial de patogenicidade (ilhas genômicas, genes de virulência), elementos genéticos móveis e marcadores genéticos de resistência antimicrobiana.
- Analisar a presença de plasmídeos nos isolados de *S. pseudintermedius* e caracterizar suas propriedades genéticas.
- Realizar uma análise filogenômica para investigar a relação evolutiva e a diversidade genômica de *S. pseudintermedius*.

5. METODOLOGIA, RESULTADOS E DISCUSSÃO

Neste item são apresentados a metodologia, os resultados obtidos e a discussão do presente estudo, no formato de artigo científico.

A autora desta Dissertação teve participação absoluta em todas as etapas, desde a concepção até a execução e interpretação dos experimentos, bem como escrita do manuscrito, sob orientação e supervisão da orientadora de mestrado. Para a execução dos experimentos houve também colaboração direta ou indireta de outros pesquisadores.

6 CONCLUSÕES

- Os resultados obtidos neste trabalho contribuem significativamente para a compreensão da patogenicidade dos isolados de *S. pseudintermedius*. A presença de ilhas genômicas, sequências de inserção, a tipagem do SCCmec e a ocorrência do sistema CRISPR/Cas forneceram *insights* valiosos sobre a diversidade genética e os mecanismos de resistência dessa bactéria.
- A análise genômica abrangente dos isolados de *S. pseudintermedius* neste estudo revelou diferenças substanciais entre os grupos MRSP e MSSP, especialmente em relação a plasticidade genética, observada pelo *cloud* genoma, e a diversidade epidemiológica entre os isolados MRSP e MSSP.
- A análise dos genes marcadores de resistência a antimicrobianos e virulência revelou padrões distintos entre os grupos MRSP e MSSP.
- A observação de que todos os isolados eram multirresistentes (MDR) destaca a urgência de abordar a resistência antimicrobiana em ambientes veterinários.
- A análise revelou a presença de plasmídeos em ambos os grupos estudados, com particular destaque para o plasmídeo p222, carreador do gene *bcrA* que confere resistência à bacitracina. Esta descoberta indica a existência de um elemento comum, independente da resistência à meticilina, sugerindo a possível disseminação desse plasmídeo entre os isolados de *S. pseudintermedius* em contextos clínicos veterinários.

7 PERSPECTIVAS

- Aprofundar a investigação sobre a contribuição dos genes exclusivos identificados nos grupos MRSP e MSSP para a patogenicidade de *S. pseudintermedius*.
- Identificar o potencial de patogenicidade dos isolados MRSP e MSSP, em ensaios *in vitro*, incluindo potencial de formação de biofilme *in situ* e invasividade celular.
- Ampliar a coleção de isolados de *S. pseudintermedius*, incluindo isolados de diferentes regiões do Brasil, para a realização de análises de pangenoma, traçando assim o perfil epidemiológico desta bactéria no país.

8. REFERÊNCIAS

ABDULLAHI, I. N. *et al.* Nasal *Staphylococcus aureus* and *S. pseudintermedius* carriage in healthy dogs and cats: a systematic review of their antibiotic resistance, virulence and genetic lineages of zoonotic relevance. **Journal of Applied Microbiology**, v. 133, n. 6, p. 3368–3390, 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/jam.15803>.

ARGEMI, X. *et al.* Coagulase-negative staphylococci pathogenomics. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 20, n. 5, p. 1–19, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/ijms20051215>.

BANNOEHR, J. *et al.* Molecular diagnostic identification of *Staphylococcus pseudintermedius*. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 47, n. 2, p. 469–471, 2009. Disponível em: <https://doi.org/10.1128/jcm.01915-08>.

BANNOEHR, J.; GUARDABASSI, L. *Staphylococcus pseudintermedius* in the dog: Taxonomy, diagnostics, ecology, epidemiology and pathogenicity. **Veterinary Dermatology**, v. 23, n. 4, p. 1–16, 2012. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/j.1365-3164.2012.01046.x>.

BEÇA, N. *et al.* Coagulase-positive *Staphylococcus*: Prevalence and antimicrobial resistance. **Journal of the American Animal Hospital Association**, v. 51, n. 6, p. 365–371, 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.5326/JAAHA-MS-6255>.

BERGOT, M. *et al.* Evolution of the population structure of *Staphylococcus pseudintermedius* in France. **Frontiers in Microbiology**, v. 9, n. DEC, p. 1–10, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.03055>.

BREYER, G. M. *et al.* Virulent potential of methicillin-resistant and methicillin-susceptible *Staphylococcus pseudintermedius* in dogs. **Acta Tropica**, v. 242, n. March, p. 106911, 2023. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2023.106911>.

DAVID, M. Z.; DAUM, R. S. Community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: Epidemiology and clinical consequences of an emerging epidemic. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 23, n. 3, p. 616–687, 2010. Disponível em: <https://doi.org/10.1128/cmr.00081-09>.

DEVRIESE, L. A. *et al.* *Staphylococcus pseudintermedius* sp. nov., a coagulase-positive species from animals. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 55, n. 4, p. 1569–1573, 2005. Disponível em: <https://doi.org/10.1099/ijs.0.63413-0>.

DOS SANTOS, T. P. *et al.* Systematic review on global epidemiology of methicillin-resistant *Staphylococcus pseudintermedius*: Inference of population structure from multilocus sequence typing data. **Frontiers in Microbiology**, v. 7, n. OCT, p. 1–12, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.01599>.

FÀBREGAS, N. *et al.* Diverse Populations of *Staphylococcus pseudintermedius* Colonize the Skin of Healthy Dogs. **Microbiology Spectrum**, v. 11, n. 2, 2023. Disponível em: <https://doi.org/10.1128/spectrum.03393-22>.

FARRINGTON, C. A.; ALLON, M. Complications of Hemodialysis Catheter Bloodstream Infections: Impact of Infecting Organism. **American Journal of Nephrology**, v. 50, n. 2, p. 126–132, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1159/000501357>.

FAZAKERLEY, J. *et al.* Heterogeneity of *Staphylococcus pseudintermedius* isolates from atopic and healthy dogs. **Veterinary Dermatology**, v. 21, n. 6, p. 578–585, 2010. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/j.1365-3164.2010.00894.x>.

FENG, Y. *et al.* Prevalence and characterization of methicillin-resistant *Staphylococcus pseudintermedius* in pets from South China. **Veterinary Microbiology**, v. 160, n. 3–4, p. 517–524, 2012. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.vetmic.2012.06.015>.

FERRER, L. *et al.* Whole genome sequencing and de novo assembly of *Staphylococcus pseudintermedius*: a pangenome approach to unravelling pathogenesis of canine pyoderma. **Veterinary Dermatology**, v. 32, n. 6, p. 654–663, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/vde.13040>.

FUNGWITHAYA, P. *et al.* Antimicrobial resistance in *Staphylococcus pseudintermedius* on the environmental surfaces of a recently constructed veterinary hospital in Southern Thailand. **Veterinary World**, v. 15, n. 4, p. 1087–1096, 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.14202/vetworld.2022.1087-1096>.

FUTAGAWA-SAITO, K. *et al.* Prevalence of virulence factors in *Staphylococcus intermedius* isolates from dogs and pigeons. **BMC Veterinary Research**, v. 2, p. 5–8, 2006. Disponível em: <https://doi.org/10.1186/1746-6148-2-4>.

GÓMEZ-SANZ, E. *et al.* High diversity of *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus pseudintermedius* lineages and toxigenic traits in healthy pet-owning household members. Underestimating normal household contact?. **Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases**, v. 36, n. 1, p. 83–94, 2013. Disponível em:

<http://dx.doi.org/10.1016/j.cimid.2012.10.001>.

GONZÁLEZ-DOMÍNGUEZ, M. S. *et al.* Molecular Detection and Characterization of the *mecA* and *nuc* Genes From *Staphylococcus* Species (*S. aureus*, *S. pseudintermedius*, and *S. schleiferi*) Isolated From Dogs Suffering Superficial Pyoderma and Their Antimicrobial Resistance Profiles. **Frontiers in Veterinary Science**, v. 7, n. July, p. 1–11, 2020.

Disponível em:

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. Disponível em:

<https://doi.org/10.1016/j.jiph.2023.10.041>.

HAENNI, M. *et al.* Characterisation of clinical canine methicillin-resistant and methicillin-susceptible *Staphylococcus pseudintermedius* in France. **Journal of Global**

Antimicrobial Resistance, v. 2, n. 2, p. 119–123, 2014. Disponível em:

HILT, E. E.; FERRIERI, P. Next Generation and Other Sequencing Technologies in Diagnostic Microbiology and Infectious Diseases. **Genes**, v. 13, n. 9, 2022. Disponível em:

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

KLEINSCHMIDT, S. *et al.* *Staphylococcus epidermidis* as a cause of bacteremia. **Future Microbiology**, v. 10, n. 11, p. 1859–1879, 2015. Disponível em:

KMIECIAK, W.; SZEWCZYK, E. M. Are zoonotic *Staphylococcus pseudintermedius* strains a growing threat for humans?. **Folia Microbiologica**, v. 63, n. 6, p. 743–747, 2018. Disponível em:

LOEFFLER, A. *et al.* Prevalence of and risk factors for MRSA carriage in companion animals: A survey of dogs, cats and horses. **Epidemiology and Infection**, v. 139, n. 7, p. 1019–1028, 2011. Disponível em:

LOZANO, C. *et al.* *Staphylococcus pseudintermedius* Human Infection Cases in Spain: Dog-to-Human Transmission. **Vector-Borne and Zoonotic Diseases**, v. 17, n. 4, p. 268–270, 2017. Disponível em:

LYNCH, S. A.; HELBIG, K. J. The complex diseases of *Staphylococcus*

pseudintermedius in canines: Where to next?. **Veterinary Sciences**, v. 8, n. 1, p. 1–19, 2021. Disponível em:

MAIDEN, M. C. J. Multilocus sequence typing of bacteria. **Annual Review of Microbiology**, v. 60, p. 561–588, 2006. Disponível em: <https://doi.org/10.1146/annurev.micro.59.030804.121325>.

MARQUES, V. F. *et al.* Expression of *icaA* and *icaD* genes in biofilm formation in *Staphylococcus aureus* isolates from bovine subclinical mastitis1. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 41, 2021. Disponível em <https://doi.org/10.1590/1678-5150-PVB-6645>.

NAKAMINAMI, H. *et al.* Prevalence of antimicrobial-resistant staphylococci in nares and affected sites of pet dogs with superficial pyoderma. **Journal of Veterinary Medical Science**, v. 83, n. 2, p. 214–219, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1292/jvms.20-0439>.

NISA, S. *et al.* Combining MALDI-TOF and genomics in the study of methicillin resistant and multidrug resistant *Staphylococcus pseudintermedius* in New Zealand. **Scientific Reports**, v. 9, n. 1, p. 1–13, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/s41598-018-37503-9>.

PAHARIK, A. E.; HORSWILL, A. R. The staphylococcal biofilm: Adhesins, regulation, and host response. **Virulence Mechanisms of Bacterial Pathogens**, n. 3, p. 529–566, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1128/microbiolspec.vmbf-0022-2015>.

PAPÍĆ, B. *et al.* Genomic insights into the emergence and spread of methicillin-resistant *Staphylococcus pseudintermedius* in veterinary clinics. **Veterinary Microbiology**, v. 258, n. January, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2021.109119>.

PENNA, B. *et al.* Detection of the international lineage ST71 of methicillin-resistant *Staphylococcus pseudintermedius* in two cities in Rio de Janeiro State. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 53, n. 4, p. 2335–2341, 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s42770-022-00852-9>.

PESSET, C. M. *et al.* Characterizing biofilm formation of *Staphylococcus pseudintermedius* in different suture materials. **Microbial Pathogenesis**, v. 172, n. March, p. 105796, 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2022.105796>.

POMPILIO, A. *et al.* New insights in *Staphylococcus pseudintermedius* pathogenicity: Antibiotic-resistant biofilm formation by a human wound-associated strain. **BMC Microbiology**, v. 15, n. 1, p. 1–14, 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.1186/s12866->

015-0449-x.

PRIOR, C. D. *et al.* Prevalence of methicillin resistance in *Staphylococcus pseudintermedius* isolates from dogs with skin and ear infections in South Africa. **Journal of the South African Veterinary Association**, v. 93, n. 1, 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.36303/JSAVA.2022.93.1.505>.

QUINN, P. J., MARKEY, B. K., CARTER, M. E., DONNELLY, W. J., LEONARDO, F. C. **Microbiologia Veterinária e Doenças infecciosas**. [S. l.: s. n.], 2007.

QUITOCO, I. M. Z. *et al.* First report in South America of companion animal colonization by the USA1100 clone of community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (ST30) and by the European clone of methicillin-resistant *Staphylococcus pseudintermedius* (ST71). **BMC Research Notes**, v. 6, n. 1, 2013. Disponível em:

RANA, E. A. *et al.* Prevalence of coagulase-positive methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus pseudintermedius* in dogs in Bangladesh. **Veterinary Medicine and Science**, v. 8, n. 2, p. 498–508, 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/vms3.701>.

RUSCHER, C. *et al.* Prevalence of Methicillin-resistant *Staphylococcus pseudintermedius* isolated from clinical samples of companion animals and equidae. **Veterinary Microbiology**, v. 136, n. 1–2, p. 197–201, 2009. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2008.10.023>.

SASAKI, T. *et al.* Methicillin-resistant *Staphylococcus pseudintermedius* in a veterinary teaching hospital. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 45, n. 4, p. 1118–1125, 2007a. Disponível em: <https://doi.org/10.1128/jcm.02193-06>.

SASAKI, T. *et al.* Reclassification of phenotypically identified *Staphylococcus intermedius* strains. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 45, n. 9, p. 2770–2778, 2007b. Disponível em: <https://doi.org/10.1128/jcm.00360-07>.

SAWHNEY, S. S. *et al.* Diagnostic and commensal *Staphylococcus pseudintermedius* genomes reveal niche adaptation through parallel selection of defense mechanisms. **Nature Communications**, v. 14, n. 1, p. 1–14, 2023. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/s41467-023-42694-5>.

SELF, W. H. *et al.* *Staphylococcus aureus* Community-acquired Pneumonia: Prevalence, Clinical Characteristics, and Outcomes. **Clinical Infectious Diseases**, v. 63, n. 3, p. 300–309, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1093/cid/ciw300>.

- SOLLID, J. U. E. *et al.* *Staphylococcus aureus*: Determinants of human carriage. **Infection, Genetics and Evolution**, v. 21, p. 531–541, 2014. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.meegid.2013.03.020>.
- SOLYMAN, S. M. *et al.* Multilocus sequence typing for characterization of *Staphylococcus pseudintermedius*. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 51, n. 1, p. 306–310, 2013. Disponível em: <https://doi.org/10.1128/jcm.02421-12>.
- SOMAYAJI, R. *et al.* Exploring *Staphylococcus pseudintermedius* : an Emerging Zoonotic Pathogen ?. **Future Microbiology**, v. 11, n. 11, p. 1371–1374, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.2217/fmb-2016-0137>.
- TEIXEIRA, I. M. *et al.* Investigation of antimicrobial susceptibility and genetic diversity among *Staphylococcus pseudintermedius* isolated from dogs in Rio de Janeiro. **Scientific Reports**, v. 13, n. 1, p. 1–10, 2023. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/s41598-023-47549-z>.
- 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, 2006. Disponível em: <https://doi.org/10.1128/jcm.01308-06>.
- WU, M. T. *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**, v. 54, n. 3, p. 535–542, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1128/jcm.02864-15>.
- ZAKOUR, N. L. B. *et al.* Complete genome sequence of the canine pathogen *Staphylococcus pseudintermedius*. **Journal of Bacteriology**, v. 193, n. 9, p. 2363–2364, 2011. Disponível em: <https://doi.org/10.1128/jb.00137-11>.
- ZHANG, K. *et al.* Novel multiplex PCR assay for characterization and concomitant subtyping of staphylococcal cassette chromosome mec types I to V in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 43, n. 10, p. 5026–5033, 2005. Disponível em: <https://doi.org/10.1128/jcm.43.10.5026-5033.2005>.