

**UNIVERSIDADE DE CAXIAS DO SUL
ÁREA DO CONHECIMENTO DE CIÊNCIAS DA VIDA
INSTITUTO DE BIOTECNOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA
DOUTORADO EM BIOTECNOLOGIA**

**Diversidade de espécies e do perfil de resistência a antimicrobianos
de *Enterococcus* e *Staphylococcus* isolados de pequenos animais
(cães e gatos)**

Letícia da Silva

CAXIAS DO SUL

2025

Letícia da Silva

**Diversidade de espécies e do perfil de resistência a antimicrobianos
de *Enterococcus* e *Staphylococcus* isolados de pequenos animais
(cães e gatos)**

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação
em Biotecnologia da Universidade de Caxias do
Sul, visando a obtenção de grau de Doutora em
Biotecnologia.

Orientador Prof. Dr. Vagner Lunge

**CAXIAS DO SUL
2025**

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Universidade de Caxias do Sul
Sistema de Bibliotecas UCS - Processamento Técnico

S586d Silva, Leticia da

Diversidade de espécies e do perfil de resistência a antimicrobianos de *Enterococcus* e *Staphylococcus* isolados de pequenos animais (cães e gatos) [recurso eletrônico] / Leticia da Silva. – 2025.

Dados eletrônicos.

Tese (Doutorado) - Universidade de Caxias do Sul, Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, 2025.

Orientação: Vagner Ricardo Lunge.

Modo de acesso: World Wide Web

Disponível em: <https://repositorio.ucs.br>

1. Cocos Gram-Positivos. 2. Espectrometria de massas por ionização e dessorção a laser assistida por matriz. 3. *Staphylococcus*. 4. Cães - Doenças. 5. Gatos - Doenças. I. Lunge, Vagner Ricardo, orient. II. Título.

CDU 2. ed.: 579.86

Catalogação na fonte elaborada pela(o) bibliotecária(o)
Márcia Servi Gonçalves - CRB 10/1500

Letícia da Silva

**Diversidade de espécies e do perfil de resistência a antimicrobianos
de *Enterococcus* e *Staphylococcus* isolados de pequenos animais
(cães e gatos)**

Tese apresentada como requisito parcial para
obtenção do grau de doutora em biotecnologia ao
Programa de Pós-graduação em Biotecnologia da
Universidade de Caxias do Sul.

Aprovada em: 30/09/2025

Banca Examinadora

Orientador: Prof. Dr. Vagner Lunge
Universidade de Caxias do Sul

Dra. Antonella Souza Mattei
Universidade de Caxias do Sul

Prof. Dra. Suelen Osmarina Paesi
Universidade de Caxias do Sul

Dra. Tamiris Silva Lopes
Universidade de Caxias do Sul

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

µg	Microgramas
AMK	Amikacin
AMX	Amoxicillin
AMP	Ampicillin
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
AZM	Azithromycin
BHI	Brain Heart Infusion
CAZ	Ceftazidime
CFR	Cefadroxil
LEX	Cephalexin
CEF	Cephalothin
FOX	Cefoxitin
CFT	Ceftiofur
CIP	Ciprofloxacin
CHL	Chloramphenicol
CVE	Centro de Vigilância Epidemiológica
CoNS	Coagulase-negative <i>Staphylococci</i>
CoPS	Coagulase-positive <i>Staphylococci</i>
DME	Diagnósticos Microbiológicos Especializados
DOX	Doxycycline
ENR	Enrofloxacin
ERY	Erytromycin
STR	Streptomycin
GEN	Gentamicin
IH	Infecções hospitalares
IPM	Imipenem
ITU	Infecções do trato urinário
LNZ	Linezolid
MALDI-TOF	Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization–Time Of Flight
MDR	Multidrug-resistant
MXF	Marbofloxacin
MRSA	Methicillin-Resistant <i>Staphylococcus aureus</i>
MRS	Methicillin-Resistant <i>Staphylococcus</i>
NEO	Neomycin
NIT	Nitrofurantoin
NOR	Norfloxacin
OMS	Organização Mundial da Saúde
PMB	Polymyxin B
SIG	<i>Staphylococcus intermedius</i> group
PYR	L-pirrolidonil-beta-naftilamida
RIF	Rifampicin
TET	Tetracycline
TOB	Tobramycin

VAN
VRE

Vancomycin
Vancomycin-resistant *Enterococci*

INSTITUIÇÕES FINANCIADORAS

- Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES): concessão de Bolsa (Taxa acadêmica) durante todo o período de realização deste doutorado, código de financiamento 001.
- Universidade de Caxias do Sul (UCS): todo suporte necessário para realização deste trabalho.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	10
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	12
3 OBJETIVOS	29
4 RESULTADOS	30
5 DISCUSSÃO FINAL	56
6 CONCLUSÃO	61
7 PERSPECTIVAS	62
REFERÊNCIAS	63
ANEXO A	67

RESUMO

Bactérias dos gêneros *Enterococcus* e *Staphylococcus* são cocos Gram-positivos isolados frequentemente de humanos e animais, pois constituem parte da microbiota normal de diferentes tecidos e órgãos. No entanto, existem espécies destes gêneros bacterianos (como por exemplo *Enterococcus faecium*, *Enterococcus faecalis*, *Staphylococcus aureus* e *Staphylococcus pseudintermedius*) que são oportunistas e tem potencial patogênico, podendo causar manifestações clínicas mais graves no homem e nos animais de companhia (como cães e gatos). A preocupação é ainda maior com isolados não suscetíveis aos principais antibacterianos e com perfil de resistência a múltiplas drogas (MDR, *multidrug resistance*). O presente estudo teve como objetivo estudar a diversidade de espécies bacterianas e analisar o perfil de resistência aos antibacterianos de isolados de animais doentes e saudáveis identificados preliminarmente como *Enterococcus* spp. e *Staphylococcus* spp. que foram obtidos de amostras de cães e gatos. O total de 57 isolados de *Enterococcus* spp. e 78 de *Staphylococcus* spp. foram obtidos de microbiotas de diferentes cães (n=95) e gatos (n=40) aparentemente saudáveis e domiciliados em várias cidades do Rio Grande do Sul no período de 2016 a 2022. Estes isolados foram mantidos em coleções de cultura e reanalisados pela identificação bacteriológica tradicional, detecção de espécies bacterianas por espectrometria de massa (MALDI-ToF) e avaliação de resistência aos principais antibacterianos usados na rotina clínica de pequenos animais. Os resultados da análise de 57 isolados de *Enterococcus* spp. demonstrou a ocorrência de três espécies: *E. faecium* (39; 68,4%), *E. faecalis* (17; 29,8%) e *E. avium* (1; 1,8%), e que apresentaram resistência aos seguintes antibacterianos: rifampicina (46; 80,7%), tetraciclina e estreptomicina (42; 73,7%), ampicilina e imipenem (41; 71,9%), eritromicina (39; 68,4%), gentamicina (38; 66,7%), ciprofloxacina (36; 63,2%), norfloxacina (32; 56,1%), nitrofurantoína (10; 17,5%) e cloranfenicol (9; 15,7%). O perfil MDR foi identificado em 45 (78,9%) isolados. Os resultados da avaliação de 78 isolados previamente identificados como estafilococos demonstraram que 68 (87,2%) foram confirmados como *Staphylococcus* spp. incluindo 26 (38,2%) classificados como estafilococos coagulase-positivos (ECP) e 42 (61,8%) como estafilococos coagulase-negativos (ECN). CoPS incluiu *S. pseudintermedius* (n = 20; 29,4%), *S. aureus* (n = 3; 4,4%) e *S. schleiferi* (n = 2; 2,9%), enquanto CoNS foram *S. equorum* (n = 12; 17,6%), *S. felis* (n = 7; 10,3%), *S. sciuri* (n = 8; 11,8%), *S. simulans* (n = 4; 5,9%), *S. epidermidis* (n = 1; 1,5%), *S. haemolyticus* (n = 1; 1,5%), *S. saprophyticus* (n = 1; 1,5%) e *S. xylosus* (n = 1; 1,5%). Os oito isolados restantes foram identificados como *Staphylococcus* spp. As análises de resistência antimicrobiana (RAM) demonstraram que 17 (25%) isolados apresentaram sensibilidade a todos os antimicrobianos testados e 51 (75%) a um ou mais antimicrobianos. Vinte e quatro (35,6%) isolados foram multirresistentes (MDR) e 13 (19,1%) estafilococos resistentes à meticilina (MRS). *S. pseudintermedius* foi o CoPS mais frequentemente associado à RAM, incluindo nove (45%) MDR e quatro (20%) MRS, enquanto *S. equorum* foi o CoNS predominante com resistência antimicrobiana (RAM), destacando-se nove (75%) casos de MDR e quatro (33,3%) de MRS. Concluindo, diferentes espécies de *Enterococcus* spp. e *Staphylococcus* spp. são frequentes na microbiota normal e/ou infecções de cães / gatos e apresentam níveis de resistência variados aos antibacterianos ressaltando a importância da identificação e monitoramento destes microrganismos a fim de contribuir para maior compreensão destes na medicina veterinária e humana, dentro das diretrizes de saúde única.

Palavras-chave: pets, MALDI-TOF, bactérias comensais, cocos Gram-positivos, CoPS, CoNS.

ABSTRACT

Bacteria of the genera *Enterococcus* and *Staphylococcus* are Gram-positive cocci frequently isolated from humans and animals, as they are part of the normal microbiota of different tissues and organs. However, some species within these bacterial genera (such as *Enterococcus faecium*, *Enterococcus faecalis*, *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus pseudintermedius*) are opportunistic and have pathogenic potential, being capable of causing more severe clinical manifestations in humans and companion animals (such as dogs and cats). Concerns are even greater when isolates are not susceptible to the main antibacterial agents and display multidrug resistance (MDR). The present study aimed to investigate the diversity of bacterial species and analyze the antibacterial resistance profile of isolates from sick and healthy animals that were preliminarily identified as *Enterococcus spp.* and *Staphylococcus spp.* These isolates were obtained from samples collected from domiciled dogs and cats. A total of 57 *Enterococcus spp.* clinical isolates and 78 *Staphylococcus spp.* isolates were obtained from the microbiota of different apparently healthy dogs (n = 95) and cats (n = 40) living in various cities in Rio Grande do Sul between 2016 and 2022. These isolates were maintained in culture collections and reanalyzed for traditional bacteriological identification, species detection by mass spectrometry (MALDI-TOF), and assessment of resistance to the main antibacterial agents used in small-animal clinical practice. Analysis of the 57 *Enterococcus spp.* isolates revealed the occurrence of only three species: *E. faecium* (39; 68.4%), *E. faecalis* (17; 29.8%), and *E. avium* (1; 1.8%). These isolates showed resistance to the following antibacterial agents: rifampicin (46; 80.7%), tetracycline and streptomycin (42; 73.7%), ampicillin and imipenem (41; 71.9%), erythromycin (39; 68.4%), gentamicin (38; 66.7%), ciprofloxacin (36; 63.2%), norfloxacin (32; 56.1%), nitrofurantoin (10; 17.5%), and chloramphenicol (9; 15.7%). An MDR profile was identified in 45 isolates (78.9%). The results of the evaluation of 78 isolates previously identified as staphylococci demonstrated that 68 (87.2%) were confirmed as *Staphylococcus spp.*, including 26 (38.2%) classified as coagulase-positive staphylococci (CPS) and 42 (61.8%) as coagulase-negative staphylococci (CNS). CoPS included *S. pseudintermedius* (n = 20; 29.4%), *S. aureus* (n = 3; 4.4%) and *S. schleiferi* (n = 2; 2.9%), while CoNS were *S. equorum* (n = 12; 17.6%), *S. felis* (n = 7; 10.3%), *S. sciuri* (n = 8; 11.8%), *S. simulans* (n = 4; 5.9%), *S. epidermidis* (n = 1; 1.5%), *S. haemolyticus* (n = 1; 1.5%), *S. saprophyticus* (n = 1; 1.5%), and *S. xylosus* (n = 1; 1.5%). The remaining eight isolates were identified as *Staphylococcus spp.* antimicrobial resistance (AMR) analyses demonstrated that 17 (25%) isolates showed sensitivity to all drugs tested and 51 (75%) to one or more antimicrobials. Twenty-four (35.6%) isolates were multidrug-resistant (MDR) and 13 (19.1%) were methicillin-resistant staphylococci (MRS). *S. pseudintermedius* was the most frequently associated CoPS with AMR, including nine (45%) MDR and four (20%) MRS, while *S. equorum* was the predominant CoNS with antimicrobial resistance (AMR), highlighting nine (75%) cases of MDR and four (33.3%) of MRS. In conclusion, different species of *Enterococcus spp.* and *Staphylococcus spp.* are frequently found in the normal microbiota and/or infections of dogs and cats, and they exhibit varying levels of resistance to antibacterial agents. These findings highlight the importance of identifying and monitoring these microorganisms to improve understanding of their relevance in veterinary and human medicine, within the One Health framework.

Keywords: pets, MALDI-TOF, commensal bacteria, Gram-positive cocci, CoPS, CoNS.

1 INTRODUÇÃO

Os mamíferos possuem microbiotas complexas, onde diversos microrganismos convivem com seus hospedeiros e estão presentes nas superfícies externas e internas do corpo que são expostos ao ambiente externo (trato gastrointestinal e respiratório, mucosas e pele). Essas microbiotas possuem predominantemente microrganismos comensais, mas também podem estar presentes alguns patogênicos que causam doenças nos homens e nos animais de companhia, como cães e gatos. Desequilíbrios nas composições das microbiotas ou mesmo alterações nas condições do hospedeiro podem resultar em processos infecciosos (Tlaskalová-Hogenová *et al.*, 2004, Pereira; Clemente, 2021). Bactérias dos gêneros *Enterococcus* e *Staphylococcus* fazem parte da microbiota comensal de cães e gatos e, de modo oportunista, são responsáveis por diferentes tipos de infecções bacterianas (García-Fonticoba *et al.*, 2020).

As bactérias do gênero *Enterococcus* são associadas a processos patogênicos devido a fatores de virulência como enzimas (gelatinase, hemolisina, hialuronidase, etc.), adesinas, substâncias de agregação, entre outros tipos de proteínas. Estes fatores são codificados por genes cromossomais e muitas vezes plasmidiais, permitindo uma rápida disseminação entre isolados encontrados no ambiente natural. Já no gênero *Staphylococcus*, existe um grupo específico de espécies associadas à patogenicidade que possui fatores de virulência necessários para a formação de biofilme, produção de toxinas, evasão imunológica e invasão dos tecidos, resultando em abscessos e infecções sistêmicas (Cheung; Bae; Otto, 2021). Alguns estafilococos, chamados de *Staphylococcus* coagulase positivos (CoPS, *coagulase-positive Staphylococcus*) possuem a capacidade de promover a coagulação do plasma, um fenótipo associado à capacidade de causar doenças devido a sobrevivência bacteriana e persistência da infecção no hospedeiro (Pickering *et al.*, 2021).

Além disso, o uso intensivo de antibacterianos na medicina humana e veterinária tem levado a um processo de crescente resistência das bactérias de microbiotas humanas e animais aos antibacterianos. Bactérias do gênero *Enterococcus*, principalmente as espécies *E. faecium* e *E. faecalis*, são reconhecidamente resistentes à ação de muitos antibacterianos, inclusive com perfil de resistência a múltiplas drogas (MDR, *multidrug resistance*) (Moon, et al., 2023). É necessário destacar os *Enterococcus* spp. resistentes à vancomicina (VRE, *vancomycin resistant enterococci*) por sua disseminação fora do ambiente hospitalar, representando um grave risco à saúde pública, devido a este antibacteriano ser considerado a última linha de combate a diversas infecções bacterianas (El-Razik *et al.*, 2023). Espécies do gênero *Staphylococcus*, como *S. aureus* e *S. pseudintermedius*, também podem apresentar elevada resistência aos antibacterianos com destaque para os isolados de *Staphylococcus* spp. resistentes à meticilina (MRS, *meticilin resistant staphilococci*) (Ahmed Rana *et al.*, 2024; Dazio *et al.*, 2021). MRS normalmente apresentam resistência a todos β -Lactâmicos e têm sido associados a casos com taxas de morbidade e

mortalidade significativamente altas (Bilyk *et al.*, 2022).

A emergência e o constante aumento destas cepas resistentes, juntamente com a dificuldade em encontrar novos antimicrobianos, tem preocupado a comunidade científica (Montserrat-Martinez; Gambin; Sierceki, 2019). Portanto, espécies de *Enterococcus* e *Staphylococcus* estão listadas como agentes patogênicos prioritários para pesquisa e desenvolvimento de novos antibióticos pela Organização Mundial de Saúde (OMS) (OPAS, 2017).

Essas bactérias preocupantes apresentam interação com outras bactérias das microbiotas dos próprios animais (cães e gatos) e até dos seres humanos que convivem proximamente. Fatores de virulência e de resistência aos antibacterianos podem ser transferidos para outras bactérias por mecanismos genéticos microbianos, aumentando a ocorrência de possíveis bactérias patogênicas e reduzindo o número de antimicrobianos eficazes (Marques; Santos; Costa, 2023). Esses gêneros e espécies bacterianas com elevada patogenicidade e multirresistência precisam ser reconhecidos para que possam ser rastreados e investigados nos animais e nos ambientes de atendimento médico veterinário (hospitais, clínicas, ambulatórios, etc.) e de produção de alimentos de origem animal. Para que os sistemas de vigilância epidemiológica possam ocorrer de maneira efetiva, avaliar a diversidade da microbiota comum, assim como a caracterização do seu perfil de resistência deve ser realizado nas diferentes regiões geográficas (Moehring *et al.*, 2015; Kahn, 2017; Isaiah *et al.*, 2017).

Acordando com o conceito de saúde única, cuja compreensão de que a saúde humana está intrinsecamente conectada à de outros animais e ao ambiente em que habitam (Pitt; Gunn, 2024), onde animais de companhia podem compartilhar a microbiota com os seres humanos, impactando na saúde pública. Portanto, é de grande importância a identificação / caracterização de populações microbianas de animais domésticos, que podem também atuar como reservatórios para patógenos potenciais comuns a humanos (Abdolghanizadeh *et al.*, 2024).

Em consonância com o conceito de Saúde Única, que reconhece a interdependência entre a saúde humana, animal e ambiental (Pitt; Gunn, 2024), destaca-se que animais de companhia podem compartilhar microrganismos com seus tutores, ampliando o impacto dessas bactérias multirresistentes na saúde pública. Dessa forma, torna-se fundamental identificar e caracterizar as populações microbianas presentes em animais domésticos, uma vez que estes podem atuar como reservatórios de patógenos potencialmente zoonóticos (Abdolghanizadeh *et al.*, 2024). Tal compreensão complementa a necessidade, apontada anteriormente, de rastrear gêneros e espécies bacterianas de maior relevância sanitária e monitorar seu perfil de resistência e virulência em diferentes contextos, reforçando a importância de sistemas de vigilância epidemiológica regionais e contínuos (WHO, 2023).

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Microbiotas

Microbiota se refere ao conjunto de microrganismos (vírus, bactérias, fungos, outros) que colonizam os hospedeiros. Nos organismos dos animais, existem microbiotas específicas para cada tecido / órgão, como pele, estômago, intestino, pulmão, etc. (Pereira; Clemente, 2021; Faintuch, 2025). Outra expressão eventualmente usada é microbioma, sendo conjunto de microrganismos que vivem juntos. Comunidades microbianas são definidas como conjuntos multiespécies, nos quais microrganismos interagem entre si em um ambiente contíguo, podendo ser comensais, simbióticos e patogênicos, desempenhando papéis na saúde e na enfermidade (Berg *et al.*, 2020, Faintuch, 2025). Compreender a composição e a função da microbiota / microbioma auxilia na distinção entre saúde e doença, uma vez que interações cooperativas entre microrganismos e seus hospedeiros geralmente envolvem a participação microbiana em funções do hospedeiro, como defesa, metabolismo e reprodução (Cho; Blazer, 2012).

A microbiota pode ser dividida em dois tipos: espécies colonizadoras persistentes (PCS - *Persistent Colonizing Species*), equivalentes à microbiota residente (ou normal), onde permanecem por longos períodos e em espécies colonizadoras transitórias (TCS - *Transient Colonizing Species*), abrangem a microbiota transitória: presentes temporariamente, aparecem e desaparecem em amostras sucessivas (Lee *et al.*, 2024).

A composição e a distribuição da microbiota normal variam em diferentes áreas do corpo e entre indivíduos, ocorrendo influência de hábitos do hospedeiro (idade, sexo, dieta, higiene, estilo de vida, imunidade, etc.), características dos microrganismos (nutrientes, fatores físicos e químicos, pH, disponibilidade de oxigênio e dióxido de carbono, salinidade, luz solar) e até do ambiente externo (clima, localização geográfica, etc.). Consequentemente, os microrganismos colonizam apenas os sítios do corpo que podem supri-los com os nutrientes e condições apropriadas. Esses nutrientes podem ser derivados de células mortas, de alimentos no canal digestivo, de produtos de secreção e excreção das células, além de substâncias presentes nos fluidos corporais (Hoffmann, 2017).

A microbiota residente normalmente beneficia o hospedeiro agindo contra a colonização de patógenos ao competir por nutrientes, produzir substâncias prejudiciais aos microrganismos invasores e afetar condições como o pH e a disponibilidade de oxigênio, impedindo o crescimento excessivo de microrganismos potencialmente perigosos. Esse fenômeno é chamado de antagonismo microbiano, ou exclusão competitiva, pois envolve uma competição que exclui alguns microrganismos (Tortora *et al.*, 2025).

O impacto negativo dos microrganismos tem sido o foco principal há muito tempo, mas há um interesse crescente em explorar seus potenciais benefícios. Esses papéis benéficos incluem o apoio à maturação do sistema imunológico, a produção de metabólitos benéficos, a promoção da digestão de alimentos e da produção de vitaminas, o aprimoramento da função da barreira intestinal e a resistência à colonização de patógenos (Chen *et al.*, 2024).

Existem também patógenos chamados de oportunistas, presentes como parte da microbiota normal, mas podem causar doenças quando invadem o corpo, seja devido a trauma ou à resposta imunológica prejudicada do hospedeiro, como ocorre por exemplo com *Staphylococcus* spp., presente como parte da microbiota normal da pele, glândulas cutâneas e as membranas mucosas de humanos, outros mamíferos e aves, configurando clinicamente os patógenos oportunistas mais importantes em muitos animais e podem ser consideradas uma fonte potencial de infecção e disseminação para o meio ambiente (Mala *et al.*, 2021). Em contraponto, a disbiose foi definida como alterações composicionais e funcionais na microbiota impulsionadas por um conjunto de fatores ambientais e do hospedeiro, fatores relacionados que perturbam o ecossistema microbiano. Pode ser associado à perda de organismos comensais, crescimento excessivo de patógenos, ou redução geral na diversidade microbiana (Vientós-Plotts; Ericsson; Reiner, 2023).

Com os avanços nas tecnologias de sequenciamento de última geração, foi possível avaliar comunidades microbianas altamente complexas em vários órgãos dos animais (Kasai *et al.*, 2020), caracterizando as distinções de acordo com a localização, como a pele, os ouvidos, a conjuntiva, o trato respiratório, o trato geniturinário, o intestino etc. (Pereira e Clemente, 2021). A importância de estudos específicos para espécies animais e sua localidade são essenciais, uma vez que, a colonização bacteriana é altamente variável dependendo da localização topográfica, fatores endógenos do hospedeiro e fatores ambientais exógenos (Grice e Segre *et al.*, 2011).

Estudo realizado com 33 cães demonstrou a ocorrência de 29 filos bacterianos na caracterização da microbiota do canal auditivo de cães saudáveis e com otite, com 225 gêneros bacterianos em ambos os grupos (Kasai *et al.*, 2020). *Staphylococcus* (filo Firmicutes) e *Corynebacterium* (filo Actinobacteria) foram gêneros bacterianos abundantes e representados em todas as amostras. Já na microbiota oral de cães jovens, foi descrito o predomínio de bactérias Gram-negativas (90%), com o filo Proteobacteria apresentando mais abundância (54,1%) (Morita *et al.*, 2024). Em uma avaliação de amostras do reto e secreções de cada saco anal em 15 cães saudáveis, foram identificados 14 filos bacterianos diferentes (com destaque para

Firmicutes, Bacteroidetes, Proteobacteria, Actinobacteria e Fusobacteria) no reto e nos sacos anais (Bergeron *et al.*, 2021). Os gêneros predominantes encontrados nos sacos anais foram *Enterococcus*, *Bacteroides* e *Proteus*, enquanto no reto foram *Corynebacterium*, *Prevotella* e *Lactobacillus*. Os mesmos filos já citados, Firmicutes, Actinobacteria, Proteobacteria e Bacteroidetes também estão descritos na avaliação da microbiota pulmonar, que por muito tempo pensava-se ser estéril. Estudo da microbiota pulmonar de 45 cães saudáveis demonstrou a maior ocorrência dos gêneros *Cutibacterium*, *Staphylococcus*, *Streptococcus*, *Pseudomonas*, *Corynebacterium*, *Acinetobacter*, *Conchiformibius*, *Flavobacterium* e *Porphyromonas* (Fastrès *et al.*, 2020).

Os filos predominantes nas microbiotas intestinais de cães e gatos são Firmicutes, Fusobacteria e Bacteroidetes, porém ainda há limitações em diversos estudos, quanto a classificação dos gêneros bacterianos, acordando uma definição para microbiota de animais domésticos saudáveis (Suchodolki, 2021). Em um estudo com 20 cães saudáveis, um total de 131 gêneros bacterianos diferentes foram identificados nas amostras fecais sendo os gêneros predominantes; *Fusobacterium* e *Megamonas* (Thomsen *et al.*, 2023).

A sobrevivência de bactérias que habitam a pele necessita de competitividade quanto a espaço e nutrientes no seu ambiente. Na pele, a microbiota residente atua como uma defesa natural contra microrganismos oportunistas, através da resistência à colonização (Flower; Greice, 2020).

A microbiota epitelial tem sido bastante estudada e já existem alguns parâmetros de normalidade que podem ser usados para diagnosticar eventuais casos de disbiose e analisar microrganismos oportunistas que estejam causando ou contribuindo para infecções ou doenças (Older *et al.*, 2017). Na superfície da pele, algumas bactérias aeróbias produzem ácidos graxos que inibem o crescimento de muitos outros microrganismos e permitem a sobrevivência das bactérias mais adaptadas (Tortora *et al.*, 2025).

Outras estratégias utilizadas; são eliminar os microrganismos concorrentes diretamente, matando-os. Embora nem todas essas interações sejam bem compreendidas, uma das mais estudadas envolve espécies de *Staphylococcus* coagulase-negativas (CoNS), que inibem a ação do patógeno *S. aureus*. Um exemplo é através da produção de peptídeos antimicrobiano, como ocorre com certas cepas de *S. hominis* que produzem lantibióticos, que demonstraram proteger contra a colonização por *S. aureus* em modelos animais e em pessoas com dermatite atópica. Já cepas nasais de *S. lugdunensis* sintetizam a lugdunina, um novo peptídeo cíclico com forte ação antimicrobiana contra *S. aureus*. Além disso, modulinas solúveis em fenol (PSMs), produzidas por várias espécies de CoNS como *S. epidermidis* e *S. capitis*, ajudam a eliminar outros

microrganismos como *Streptococcus pyogenes*, *S. aureus* e *Cutibacterium acnes*. (Flower; Greice, 2020).

Ampliar o conhecimento sobre o microbiota da pele de animais domésticos saudáveis e em doenças, como dermatite atópica, pode auxiliar a compreender o trânsito de bactérias, o papel na resistência à colonização e até mesmo proteção contra patógenos invasores. A pele fornece uma interface entre o ambiente externo e um indivíduo. Ela atua como uma barreira física, imunológica e microbiana; um órgão sensorial; com um papel importante na regulação da temperatura corporal e proteção o corpo da desidratação (Whittle *et al.*, 2024).

O microbioma de pele é atualmente considerado um componente-chave na regulação imunológica e desequilíbrios nas populações microbianas estão sendo associados a processos inflamatórios (Hoffmann, 2017). Em cães, os locais da pele podem ser categorizados em grupos com populações microbianas distintas, como região interdigital da pata, axila, pavilhão auricular côncavo, canal auditivo, dorso lombar, secreção conjuntival, virilha, pele perianal, queixo, nasal e abdômen (Whittle *et al.*, 2024).

Em estudos mais antigos, que utilizavam os métodos bioquímicos clássicos, já possibilitavam identificar *S. pseudintermedius* como o microrganismo mais comum na pele de cães saudáveis (Hajek, 1976; Saijonmaa-Koulumies; Lloyd, 1996). Em outro estudo, *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus xylosus*, *Streptococcus* sp., *Clostridium* sp., *Propionibacterium acnes* e *Acinetobacter* sp. foram citados como participantes da microbiota comum da superfície epidérmica dos cães (Lima *et al.*, 2022). Outro estudo com isolados de *Staphylococcus* spp. recuperados de cães saudáveis, demonstrou a identificação de *S. intermedius*, *S. aureus* e *Staphylococcus xylosus* (Fazakerley *et al.*, 2009).

Estudos que utilizam tecnologias de sequenciamento de última geração (NGS, *next generation sequencing*) possibilitaram elucidar e ampliar o conhecimento sobre a microbiota da pele de animais domésticos, identificando os principais filos bacterianos encontrados em diferentes locais, tais como Proteobacteria, Actinobacteria, Firmicutes, Bacteroidetes e Fusobacteria. Grande diversidade de filos e famílias bacterianas têm sido encontrada na microbiota epitelial de cães, como Proteobacteria (Enterobacteriaceae, Moraxellaceae, Neisseriaceae, Oxalobacteraceae, Pasteurellaceae, Pseudomonadaceae e outros), Firmicutes (Bacillaceae, Clostridiaceae, Staphylococcaceae, Streptococcaceae e outros), Actinobacteria (Corynebacteriaceae, Nocardioideaceae, Propionibacteriaceae e outros) e Bacteroidetes (Bacteroidaceae, Paraprevotellaceae e outros) (Hoffmann *et al.*, 2014).

2.2. Bactérias patogênicas

Entre a ampla diversidade de bactérias isoladas em mamíferos, podemos classificar as patogênicas em dois grupos principais: exclusivas e oportunistas. Tanto as bactérias patogênicas exclusivas como as oportunistas possuem a capacidade de causar doenças no hospedeiro (Naor-Hoffmann *et al.*, 2022). Clinicamente, a virulência de um patógeno, de uma espécie específica ou mesmo de uma cepa clonal, pode se referir à sua capacidade inerente de provocar manifestações clínicas específicas que podem ser ligadas à produção de um ou mais fatores de virulência, muitas vezes proteínas específicas (Argemi *et al.*, 2019). Sendo um processo complexo e multifatorial, iniciando com fatores que proporcionam a adesão e fixação do microrganismo, seguido de colonização, invasão dos tecidos ou células, e diversos fatores de proteção contra o sistema imunológico, captação de nutrientes, assim como a produção de fatores que causam danos ao hospedeiro (Chiang; Mekalanos; Holden, 1999).

Bactérias patogênicas expressam uma ampla gama de moléculas que se ligam a alvos de células hospedeiras para facilitar uma variedade de respostas diferentes do hospedeiro. As estratégias moleculares usadas para interagir e causar doença no hospedeiro podem ser exclusivas ou compartilhadas com várias espécies diferentes, incluindo aspectos como cápsula, alterações na parede celular, toxinas, adesinas, etc. (Wilson *et al.*, 2002).

Muitas infecções bacterianas são causadas pela microbiota residente normal de membranas de mucosas e trato gastrointestinal. Casos de otite, infecções respiratórias, urinárias e dermatológicas em animais de estimação envolvem principalmente ambos os grupos de bactérias. Piodermite e otite externa em cães geralmente são causadas por bactérias Gram-positivas, onde algumas cepas podem produzir biofilme a apresentar resistência a antibióticos (Nocera *et al.*, 201). Em geral, *Enterococcus*, *Streptococcus* e *Staphylococcus* são as principais bactérias Gram-positivas envolvidas em infecções cutâneas e sistêmicas, também apresentando resistência aos antimicrobianos (Santos *et al.*, 2017, Guimarães *et al.*, 2017; Urban-Chmiel *et al.*, 2022). Destacando *Enterococcus* e *Staphylococcus*, principalmente em piodermites e otites em cães (Tanveer *et al.*, 2024).

As bactérias do gênero *Enterococcus* tornaram-se reconhecidos como patógenos nosocomiais Gram-positivos isolados em ambientes de assistência médica em todo o mundo. Este gênero possui diferentes fatores de virulência: toxinas, moléculas da superfície celular bacteriana, proteínas de resposta a estresse e de transporte (Gao; Howden; Stinear, 2018). Também pode apresentar características biológicas como gelatinase, que é uma zinco-metaloprotease extracelular que contribui para a virulência ao clivar substratos do hospedeiro, como colágeno, fibrinogênio, fibrina e componentes do complemento (Gok *et al.*, 2019). Além disso, as cepas que produzem bacteriocinas têm vantagens na competição pela colonização de

nicho ecológico, pois a atividade antibacteriana é considerada importante na regulação da dinâmica populacional em ecossistemas bacterianos. Muitas características biológicas que contribuem para a virulência em *Enterococcus* spp. são frequentemente associadas a plasmídeos (Iseppi *et al.*, 2015). Ainda, a produção de hemolisina é de grande importância na virulência enterocócica, por aumentar a gravidade da infecção, assim como, a produção de biofilme nas bactérias, protegendo as bactérias patogênicas de muitos desinfetantes e antimicrobianos, causando infecções crônicas difíceis de tratar (Gok *et al.*, 2019). Proteínas de superfície enterocócicas (esp), hialuronidase (hyl) e adesina de ligação ao colágeno (ace) também são proteínas de virulência ligadas à invasão do hospedeiro, persistência, formação de biofilme e patogenicidade (El-Razik *et al.*, 2023).

As bactérias do gênero *Staphylococcus* possuem uma variedade ainda maior de fatores de virulência. Esses fatores foram inicialmente descritos em *S. aureus* e incluem proteínas de superfície (proteína A, fator de aglomeração, proteínas de ligação de fibronectina ou determinantes de superfície regulados por ferro), polissacarídeos capsulares, moléculas envolvidas na formação de biofilme (por exemplo, adesina intercelular polissacarídica) ou toxinas (toxinas formadoras de poros, toxinas que atuam como superantígenos). As adesinas da parede celular que reconhecem proteínas da matriz extracelular também são chamadas de componentes de superfície microbiana que reconhecem moléculas de matriz adesiva. Algumas enzimas (coagulase, estafiloquinase e proteases) também contribuem para a evasão imunológica e penetração no tecido do hospedeiro (González-Martin *et al.*, 2020). Além disso, muitos isolados de *Staphylococcus* spp. apresentam resistência à meticilina que, combinada alto potencial de virulência de uma forma previamente desconhecida, representam uma grande ameaça para saúde humana e animal (Cheung; Bae; Otto, 2021).

2.2.1 *Enterococcus* spp.

O gênero *Enterococcus* pertence à ordem Lactobacillales e à família Enterococcaceae. São bactérias em forma de cocos em pares ou cadeias curtas, colônias amarelas, com cerca de 0,5mm de diâmetro e Gram-positivas. Multiplicam-se em meio contendo 6,5% de NaCl e na presença de 40% de sais biliares e hidrolisam pirrolidonil-beta-naftilamida (PYR). São anaeróbios facultativos e apresentam algumas espécies hemolíticas. Bioquimicamente, são catalase negativas ou fracamente positivas (Brasil, 2004; Oliveira e Vaz, 2018). O antígeno de superfície principal é o ácido lipoteicóico (LTA) e produzem leucina aminopeptidase (LAP) (Portenier *et al.*, 2003).

Atualmente, esse gênero contém mais de 50 espécies classificadas em seis ramos genômicos diversos (Zhong *et al.*, 2018). *E. faecalis* e *E. faecium* são as espécies isoladas predominantes, respondendo por mais de 80% dos isolados humanos e animais (Torres *et al.*, 2018). Além disso, essas duas espécies também são as mais prevalentes nos serviços de saúde (Jackson *et al.*, 2010; Bertelloni *et al.*, 2017).

A identificação de *Enterococcus* normalmente é realizada por técnicas clássicas de bacteriologia. Mais recentemente, métodos de biologia molecular têm sido utilizados para identificação e caracterização de espécies de *Enterococcus*. Procedimentos de PCR têm sido desenvolvidos tendo como alvos regiões de DNA específicas de *E. faecalis* e *E. faecium*, bem como genes associados à resistência para antibióticos (Abdel-Moein *et al.*, 2017; Park *et al.*, 2017). Uma alternativa de diagnóstico ainda mais recente é o procedimento de espectrometria de massa da MALDI-TOF (*Matrix Associated Laser Desorption-Ionization – Time of Flight*), que possibilita uma identificação no nível de espécies (Huang *et al.*, 2017; Wener *et al.* 2012), através da ionização por dessorção a laser assistida por matriz - espectrometria de massa, baseando-se na geração de espectros de massa a partir de células intactas ou extratos celulares e comparação com espectros de referência (Singhal *et al.*; 2015 e Sauget *et al.*; 2016).

Esses testes possibilitam uma otimização do diagnóstico clínico, uma vez que os métodos clássicos de cultivo bacteriológico juntamente com a avaliação de suscetibilidade levam de 2 a 4 dias para obtenção dos resultados (Brenciani *et al.*, 2016; Tan *et al.*, 2017).

Com relação à epidemiologia, *Enterococcus* spp. é encontrado em mamíferos e pássaros, solo, plantas e água (contaminada), sendo considerado patógeno oportunista. Também pode ocorrer em alimentos (carnes e derivados) contaminados no momento do abate do animal devido à presença de bactérias no intestino. *E. hirae* e *E. gallinarum* são comumente encontrados no intestino de animais, enquanto *E. faecalis*, *E. faecium*, *E. duranse* e *E. avium* são comensais do trato gastrointestinal humano (Oliveira, 2012).

Quanto aos antibióticos, *Enterococcus* spp. apresentam em geral resistência natural intrínseca aos β -Lactâmicos. *E. faecium* tem sido conhecido por sua resistência antimicrobiana desde a década de 1970. Mas a elevada resistência à ampicilina e à vancomicina foi registrada em hospitais nos Estados Unidos na década de 1980 e 1990, respectivamente, resultando em um número crescente infecções e surtos de *E. faecium* resistentes a esses antibióticos (Bunt *et al.*, 2017). O aumento da resistência à ampicilina em *E. faecium* é devido à expressão da penicilina-ligação de classe B de baixa afinidade proteína 5 (PBP5fm). PBP5fm foi implicado como sendo responsável por ambos os níveis intrínsecos de baixo nível de susceptibilidade à ampicilina e resistência de alto nível e é também responsável pela função de síntese da parede celular quando

o outro PBPs são saturados pela ampicilina (Galloway-Peña *et al.*, 2011; Prieto *et al.*, 2016). A aquisição de *pbp5* com mutações específicas tem sido o principal responsável pelas elevadas taxas de resistência a esta classe de antibióticos (Novais *et al.*, 2016).

Já a resistência à vancomicina se caracteriza de uma alteração do alvo D-alanil-D-alanina em D-alanil-D-lactato ou D-alanil-D-serina, que se ligam fracamente à vancomicina, devido à ausência de um local crítico para a ponte de hidrogênio, havendo 6 fenótipos de resistência, sendo os adquiridos; VanA, VanB, VanD, VanE e Van G, enquanto VanC caracteriza resistência intrínseca dos enterococos móveis. Muitos estudos têm focado na detecção de resistência à vancomicina em suínos, aves e animais produtores de alimentos, mas o papel dos animais na epidemiologia e a ocorrência de *E. faecalis* e *E. faecium* permanecem pouco compreendidos (Abdel-Moein *et al.*, 2017).

Em termos de saúde pública, é importante prevenir a transmissão de cepas de enterococcus multirresistentes (MDR) entre animais ou de animais para humanos. Estudos anteriores já observaram que animais que foram tratados com antibióticos em uma unidade de terapia intensiva eram transmissores zoonóticos de *Enterococcus* spp. MDR (Bang *et al.*, 2017). A transmissão de forma horizontal do *Enterococcus* spp. MDR exige cuidados especiais com pacientes e o ambiente hospitalar. A mesma situação ocorre com animais de companhia, que podem estar desempenhando um papel importante na emergência e disseminação de bactérias resistentes a antibióticos, portanto sistemas de vigilância de resistência antimicrobiana devem incluir animais de estimação (Kahn, 2017).

2.2.2 *Staphylococcus* spp.

Os *Staphylococcus* e mais outros oito gêneros (*Abyssicoccus*, *Aliicoccus*, *Auricoccus*, *Corticoccus*, *Jeotgalicoccus*, *Macrooccus*, *Nosocomiicoccus*, *Salinococcus*) pertencem à família *Staphylococcaceae* (Gherardi, Bonaventura, Savini, 2018). O gênero *Staphylococcus* possui 89 espécies/subespécies (Parte *et al.*, 2020). Caracterizam-se como cocos Gram-positivos com tamanhos variando de 0,5 a 2,5 µm, imóveis, anaeróbicos facultativos, catalase-positivos, não formadores de esporos. Ocorrem isoladamente, em pares ou tétrades, e podem ser estritamente aeróbicos ou facultativamente anaeróbicos (Kosecka-Strojek *et al.*, 2023). As células geralmente ocorrem como aglomerados semelhantes a cachos de uvas devido a planos de divisão perpendiculares. A parede celular é composta de peptidoglicano com predominância de l-lisina e as células crescem na presença de 10% de NaCl (p/v) e em temperaturas entre 18–40 °C, podendo sintetizar enterotoxinas termorresistentes (Moraes *et al.*, 2021; Madhaiyan; Wirth; Saravanan, 2020).

Os *Staphylococcus* spp. são usualmente classificados em dois grupos, conforme a presença de coagulase: CoPS (*coagulase-positive Staphylococcus*) e CoNS (*coagulase-negative Staphylococcus*) (Pickering *et al.*, 2021). A base genética do fenótipo positivo para coagulase é principalmente devido ao gene *vwb* que codifica a proteína de ligação de von Willebrand (vWbp), que é o fator de coagulação típico dos estafilococos (Pickering *et al.*, 2021). A avaliação da atividade de coagular o plasma é um critério muito utilizado para identificar estafilococos patogênicos associados com infecções agudas. como exemplo, as espécies patogênicas *S. aureus* e *S. pseudintermedius* são coagulase positivas. Outras espécies usualmente CoPS são *Staphylococcus schweitzeri*, *Staphylococcus argenteus*, *Staphylococcus roterodami* e *Staphylococcus singaporensis* (Oliveira e Vaz, 2018; Bilyk *et al.*, 2022).

Entre os CoPS, há um conjunto de bactérias conhecidas como SIG (*Staphylococcus intermedius group*) que engloba quatro espécies: *S. pseudintermedius* (associado a caninos, felinos, equinos, papagaios e humanos), *S. intermedius* (associado a pombos domésticos e selvagens), *S. delphini* (associado a golfinhos, equinos, papagaios domésticos e selvagens, visons e camelos) e *S. ursi* (Carroll; Burnham; Westbladel, 2021; Roberts *et al.*, 2024). *S. pseudintermedius* é considerado o SIG mais comum associado a animais domésticos, principalmente em cães (Lynch e Helbig, 2021). É descrita como uma das bactérias envolvidas em dermatopatias em cães (Weese; van Duijkeren, 2010; Carvalho *et al.*, 2019). Também constitui em um patógeno oportunista que causa infecções de pele, ouvido e local cirúrgico em gatos (Bellato *et al.*, 2022). Já os CoNS são normalmente considerados colonizadores inofensivos; no entanto, seu papel em infecções, assim como seu potencial para causar doenças graves, como endocardite e sepsis foi eventualmente demonstrado (Štempelová *et al.*, 2022). Eles têm sido implicados em infecções como infecções do trato urinário, infecções da corrente sanguínea e infecções relacionadas a dispositivos invasivos, tanto na medicina humana como veterinária e são responsáveis por perdas econômicas substanciais na produção pecuária (Asante *et al.*, 2020). *Staphylococcus epidermidis* é a espécie de CoNS mais frequentemente encontrada, mas existem outras espécies relevantes, como *Staphylococcus felis*, *Staphylococcus equorum*, *Staphylococcus saprophyticus*, *Staphylococcus haemolyticus*, *Staphylococcus schleiferi* (coagulase variável), *Staphylococcus xylosum*, *Staphylococcus hominis*, *Staphylococcus lugdunensis* e outras que são isoladas em animais domésticos e no homem (Becker; Heilmann; Peters, 2014; Asante *et al.*, 2020; Ma *et al.*, 2020; Santana *et al.*, 2023).

Estafilococos de diferentes espécies são bactérias das microbiotas epiteliais e mucosas de animais e humanos (Ma *et al.*, 2020). Em animais, as narinas, a boca e o períneo são locais

típicos de colonização e transporte de *Staphylococcus* (Misic *et al.*, 2015). Também podem ser encontrados em alimentos, esgoto, ar e fezes. (Moraes *et al.*, 2021).

Quanto ao diagnóstico laboratorial tradicional, utiliza-se basicamente a avaliação microscópica pelo método de Gram para verificar a morfologia da bactéria e a utilização de testes bioquímicos para avaliar a atividade de catalase e coagulase. Os meios de cultura usados para crescimento são o ágar sangue (no qual são observados os padrões hemolíticos), o ágar manitol salgado e o ágar DNase (Moraes *et al.*, 2021). Atualmente, metodologias moleculares como a reação em cadeia da polimerase (PCR, *Polymerase Chain Reaction*) e proteômicas como MALDI-TOF são usadas para identificação mais rápida e precisa (Castro-Rodríguez; Orner; Szymczak, 2021; Rosa *et al.*, 2022).

A resistência antimicrobiana entre estafilococos é baseada em uma ampla variedade de genes de resistência. O mais importante é a resistência à meticilina mediada principalmente pelo gene *mecA*, que codifica uma proteína de ligação à penicilina (PBP), PBP-2a que reduziu a afinidade por todos os antimicrobianos β -lactâmicos. (Loncaric *et al.*, 2019). A resistência a meticilina em *S. aureus* é bastante preocupante na medicina humana e veterinária (Beck; Waisglass; Weese, 2012; Bilik *et al.*, 2022). Mas também é encontrada em outros estafilococos, principalmente em *S. pseudintermedius* (Beck; Waisglass; Weese, 2012; Wang *et al.*, 2022). Os isolados de *Staphylococcus* spp. resistentes à meticilina são frequentemente multirresistentes, limitando extremamente as opções terapêuticas e portanto reconhecidos como um dos riscos mais importantes para a saúde humana e animal (Loncaric *et al.*, 2019).

2.3 Infecções bacterianas em animais

As infecções bacterianas humanas e animais podem acometer sistemas e separadamente levar a um quadro de sepse. As otites são as infecções frequentes em pequenos animais, geralmente ligadas a problemas dermatológicos subjacentes tendo como agentes *Staphylococcus*, *Enterococcus*, *Bacillus* e *Pseudomonas* (Silva *et al.*, 2017; Almeida *et al.*, 2016). As cistites também são normalmente causadas por bactérias, com predomínio de *Escherichia coli*, *Staphylococcus*, *Proteus*, *Enterococcus* e *Streptococcus* (Silva *et al.*, 2017; Guimarães *et al.*, 2017; Ferreira *et al.*, 2014). Já as infecções relacionadas ao sistema tegumentar apresentam *Staphylococcus*, *Pseudomonas*, *Enterococcus*, *Proteus* e *Escherichia coli* como principais agentes causais (Arias *et al.*, 2008).

As otites são as afecções mais frequentes na clínica de pequenos animais, podendo ser inflamações totais ou parciais, cursando muitas vezes com quadros recidivantes. O percentual de diagnósticos das afecções otológicas na rotina clínica de atendimento dos cães é de 10 a 20% do

total de casos atendidos (Gomes; Allendorf, 2018). O diagnóstico de rotina da otite em cães é realizado pelo exame clínico do paciente e do conduto auditivo, aliado às avaliações complementares como diagnóstico microbiológico e por imagem. *Staphylococcus* spp., *Streptococcus* spp. e *Enterococcus* spp. são os gêneros de bactérias Gram-positivas, normalmente isoladas. Além disso, as bactérias em forma de bastonete normalmente são Gram-negativas e pertencem à família Enterobacteriales e aos gêneros *Pseudomonas* e *Proteus* (Carvalho, 2017).

As infecções do trato urinário (ITUs) são normalmente de origem bacteriana em cães e gatos. Na suspeita clínica de uma cistite bacteriana é indicada a realização de uma cultura de amostra de urina para bactérias aeróbicas. A urocultura quantitativa é realizada pela avaliação de unidades formadoras de colônias por mililitro de urina (UFC/mL), considerando-se infecção, culturas com crescimentos superiores a 1.000 UFC/mL, sendo considerada como padrão-ouro para diagnóstico de ITU. Embora bactérias Gram-positivas como *Staphylococcus*, *Streptococcus* e *Enterococcus* possam ocasionar ITUs, as bactérias Gram-negativas (*Escherichia coli*, *Proteus*, *Klebsiella*, *Pseudomonas* e *Enterobacter*) ocorrem na grande maioria (aproximadamente 75%) dos casos (Ferreira *et al.*, 2014).

As infecções bacterianas epiteliais são comuns em cães e gatos (Souza *et al.*, 2019). Em geral, os gêneros *Staphylococcus*, *Streptococcus*, *Micrococcus* e *Acinetobacter* são consideradas da microbiota normal, enquanto *Escherichia coli*, *Proteus mirabilis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Corynebacterium*, *Bacillus*, *Streptococcus*, *Alcaligenes* são transitórias (Bryan *et al.*, 2012; Hiller *et al.*, 2014; Berck *et al.*, 2012). Os cães adquirem *Staphylococcus* spp. de suas mães no período ainda neonatal. Em cães, *S. pseudintermedius* e, em menor extensão, *Staphylococcus aureus* e *Staphylococcus schleiferi* ssp. *coagulans* são causas importantes de infecções de pele (Beck; Waisglass; Weese, 2012).

O termo piodermatite designa as doenças infecciosas bacterianas epiteliais, que geralmente ocorrem em decorrência do crescimento demasiado das bactérias consideradas residentes da microbiota normal ou contaminação transitória. Pode também se originar de feridas traumáticas, na maioria das vezes ocasionadas por mordidas de outros animais ou atropelamentos (Arias *et al.*, 2008). A piodermatite canina pode variar de infecções moderadas a infecções graves e é desencadeada por fatores subjacentes, como doença alérgica cutânea, ectoparasitas e endocrinopatias. *S. pseudintermedius* é um patógeno comumente associado a infecções cutâneas, sendo isolado em até 92% dos casos de (Lynch; Helbig, 2021).

O diagnóstico da maioria dos casos de piodermatites é baseado nos sinais clínicos e na presença de lesões características. Em alguns casos, há fatores predisponentes e outras doenças de base, como por exemplo, na dermatite atópica canina (DA), cursando com inflamação e prurido, associado a predisposição genética (Hillier *et al.*, 2014; Santoro *et al.*, 2015). Um estudo prévio em pequenos animais demonstrou o isolamento de *Proteus mirabilis* (15.5%), *Escherichia*

coli (15%), *Enterococcus* (14.5%), *Enterobacter* (8%) e *Acinetobacter baumannii* (5%). Além disso, também ocorrem *Klebsiella pneumoniae*, *Enterococcus faecalis* e *Escherichia coli* em feridas cutâneas com contaminação secundária por saliva e *Proteus mirabilis* e *Enterococcus faecalis* em ulcerações de tumor na região mamária (Lacerda, 2018). O tratamento é multifacetado e as intervenções devem ser combinadas, incluindo dieta adequada, banhos com shampoos indicados, glicocorticoides tópicos ou orais, aumento da ingestão de ácidos graxos essenciais além de antibioticoterapias (Medeiros, 2017). Em casos específicos, antibioticoterapia associada a cultura e antibiograma (Hillier *et al.*, 2014) e outras alternativas têm sido propostas, como a utilização de óleos essenciais, vacinas e bacteriófagos (Sim *et al.*, 2019; Lynch; Helbig, 2021).

2.4 Controle das infecções bacterianas

O controle das infecções bacterianas veterinárias tem se tornado um desafio igual ou maior do que no homem, devido ao aumento da resistência bacteriana (Heim; Kuster; Barbara, 2020; Marques; Santos; Costa, 2023). As terapias antibacterianas são essenciais no tratamento dos pacientes na erradicação de infecções. Consequentemente, os antibióticos devem ser usados depois que uma doença bacteriana é diagnosticada, exigindo o conhecimento de uma série de informações e princípios gerais para realização do uso racional e obtenção de resultados satisfatórios na terapia (Boothe, 2015). Na medicina humana esses critérios abrangem questões mais complexas, como as diretrizes do Grupo Consultivo de Vigilância Integrada à resistência antimicrobiana (WHO-AGISAR), que têm sido bastante ativo na determinação da significância de classes de antibióticos para terapias de infecções bacterianas (Silley; Stephan 2017). Já na prática veterinária, a Organização Mundial de Saúde Animal elaborou uma lista extremamente importante, com a classificação dos antibióticos de acordo com o risco da seleção da resistência, porém abrange apenas animais de produção (OIE, 2015). A Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) também tem normativas para antibióticos utilizados como aditivos e promotores de crescimento na produção animal (ANVISA, 2012). Assim como os documentos do Grupo de Trabalho da Sociedade Internacional para a Prevenção de Doenças Animais em Doenças Infecciosas (ISCAID) e o consenso do Colégio Americano de Medicina Interna Veterinária (ACVIM) fornecem diretrizes e sugestões de antibioticoterapia para cães e gatos, auxiliando no tratamento e controle de infecções bacterianas (Weese *et al.*, 2015; Weese *et al.*, 2019).

Os fármacos antimicrobianos podem ser substâncias naturais (antibióticos) ou sintéticas (quimioterápicos) que agem sobre microrganismos inibindo o seu crescimento ou causando a sua destruição. Podem ser classificados quanto a sua ação como bactericidas ou bacteriostáticos. Os

medicamentos antimicrobianos bactericidas têm concentrações inibitórias mínimas (CIMs) e concentrações bactericidas mínimas (MBCs) que são apenas algumas diluições de diferença quando avaliadas em laboratório. Os medicamentos antimicrobianos bacteriostáticos inibem ou impedem o crescimento sem realmente matar as bactérias e geralmente requerem um maior aumento na concentração para inibir o crescimento visível em cultura (MIC) (Morley *et al.*, 2005). Os principais modos de ação compreendem: inibição da síntese da parede celular, inibição da síntese proteica, danos à membrana plasmática, inibição da síntese de ácidos nucleicos e inibição da síntese de metabólicos essenciais (folato) (Tortora; Funke; Case, 2017).

Os β -lactâmicos constituem a principal classe de fármacos que agem inibindo a síntese da parede celular e incluem penicilinas, cefalosporinas, carbapenêmicos e monobactâmicos. Os inibidores da síntese proteica atuam sobre os ribossomos bacterianos e são representados por aminoglicosídeos, tetraciclina, anfenicóis, macrolídeos, lincosamidas e oxazolidinonas. As polimixinas correspondem aos principais fármacos que desestabilizam a membrana citoplasmática. Em relação à inibição da síntese de ácidos nucleicos, as quinolonas e fluoroquinolonas atuam bloqueando as enzimas DNA-girase e topoisomerase IV bacterianas. Já as sulfonamidas constituem a classe de antimicrobianos que inibem a síntese de folato, impedindo a formação do ácido di-hidrofólico, um pré-folato derivado do ácido p-aminobenzoico (PABA) e de precursores pteridínicos. Atuando como análogos do PABA, essas moléculas competem com o substrato pela enzima di-hidropteroato-sintetase, exercendo assim efeito bacteriostático (Nogueira *et al.*, 2016).

O uso de antibióticos necessita de decisões de diagnóstico, com a avaliação do grau de severidade do quadro clínico, do espectro antimicrobiano e mecanismo de ação, da posologia adequada, do controle bacteriológico necessário, da necessidade de associação de drogas, entre outros (Silley; Stephan, 2017). A administração de antimicrobianos pode ser empírica, baseando-se no sistema orgânico acometido, microrganismos suspeitos e no conhecimento dos fármacos disponíveis ou nos resultados de sensibilidade dos microrganismos envolvidos. Na terapia combinada, com a utilização de mais de um antimicrobiano, pode aumentar o espectro geral de atividade, além de possibilitar o sinergismo entre dois antimicrobianos, resultando na morte bacteriana. Nos pacientes em estado crítico, recomenda-se que a terapia combinada seja iniciada nos primeiros dias de tratamento, devendo ser ajustada para regime mais restrito nas primeiras 72 horas para minimizar a pressão de seleção de organismos resistentes (Marques; Santos; Costa, 2023).

O controle das infecções bacterianas exige estratégias bem definidas que envolvem prevenção, diagnóstico, uso criterioso de antimicrobianos e interrupção de transmissão. As ações preventivas incluem o uso de imunomoduladores, vacinas e medidas de profilaxia. O diagnóstico deve ser realizado por meio de métodos adequados e direcionados ao patógeno infectante,

garantindo maior assertividade na conduta clínica. O uso racional de antimicrobianos requer controle rigoroso da prescrição, fundamentado em dados epidemiológicos locais para orientar a terapia empírica ou dirigida, reduzindo o tempo de tratamento empírico sempre que possível. É essencial tratar infecções verdadeiras e não colonizações ou contaminações, priorizando antimicrobianos de espectro estreito quando adequados. Para interromper a transmissão, é necessário identificar fontes e rotas de disseminação, como por meio da realização de culturas de vigilância ativa em populações de alto risco, além de reconhecer pacientes colonizados por patógenos resistentes, especialmente bactérias multirresistentes (MDR), definidas como aquelas não suscetíveis a pelo menos um agente em três ou mais classes de antimicrobianos. Por fim, o treinamento contínuo de equipes e profissionais é fundamental para sustentar práticas eficazes de controle (Jarvis, 2004; Magiorakos *et al.*, 2012).

2.5 Resistências aos antibacterianos

A resistência bacteriana (RAM) é definida como a capacidade de um microrganismo crescer na presença de uma determinada concentração antibiótica (Gómez, Vásques e Gómez, 2008). Esta resistência pode ser intrínseca, pois muitas bactérias já apresentavam mecanismos naturais de resistências antes do uso dos antimicrobianos na prática médica e veterinária (Munita; Arias, 2016; Fuzeta, 2017). Mas também pode ser adquirida devido a mutações espontâneas ou aquisição de genes de outras bactérias, decorrente do uso excessivo de antimicrobianos (Tortora; Funke; Case, 2017; Gómez; Vásques; Gómez, 2008). A exposição contínua de populações bacterianas a medicamentos antimicrobianos ou outros fatores que afetam a sobrevivência (como desinfetantes, metais, pH e presença de nutrientes específicos) oferece uma pressão de seleção resultando em um aumento da prevalência de resistência entre populações dessas bactérias (Morley *et al.*, 2005).

O uso indiscriminado de antimicrobianos é, portanto, fator determinante no aumento da resistência bacteriana (Sillely; Stephan, 2017). Medidas para evitar o aumento da resistência bacteriana devem ser aplicadas, especialmente em ambientes de amplo uso de antimicrobianos. O controle da infecção hospitalar na medicina veterinária deve ser aprimorado, pois ainda se trata de algo novo, uma mudança que ainda traz resistência, sendo um ponto crítico que exige maior percepção dos profissionais envolvidos (Moehring *et al.*, 2015).

O primeiro relato de resistência à penicilina foi em 1947, quando 4 cepas de estafilococos foram isoladas de pacientes após um ano de uso deste fármaco na clínica. Em 1959, a indústria farmacêutica desenvolveu a meticilina, disponibilizando-a para o mercado em 1960. Mas cepas resistentes também a esse fármaco surgiram anos depois (Monserrat-Martinez, Gambin, Sieracki, 2019). O surgimento de resistência à vancomicina em cepas de *Enterococcus* também foi outro

marco importante, sendo relatado pela primeira vez na Inglaterra em 1986 (Miller *et al.*, 2020; Monserrat-Martinez; Gambin; Sierecki, 2019). Desde então, há uma crescente de microrganismos patogênicos e resistentes a um ou mais medicamentos antimicrobianos. Como consequência, algumas infecções comuns se tornaram extremamente difíceis e, em alguns casos, quase impossíveis de tratar (Prestinaci; Pezzotti; Pantosti, 2015).

À medida que esse problema aumenta, definições harmonizadas com as quais permitem descrever e classificar bactérias que são resistentes a múltiplos agentes antimicrobianos são necessárias, para caracterizar os diferentes padrões de resistência encontrados e padronizar os dados de vigilância epidemiológica de forma confiável a comparar cenários de saúde única e países distintos. Organismos multirresistentes são rotulados como tal devido à sua resistência *in vitro* a mais de um agente antimicrobiano, sendo; bactérias multirresistentes (MDR) definida como não suscetibilidade adquirida a pelo menos um agente em três ou mais categorias antimicrobianas, bactérias extensivamente resistentes (XDR) foi definida como não suscetibilidade a pelo menos um agente em todas as categorias antimicrobianas, exceto duas ou menos (ou seja, isolados bacterianos permanecem suscetíveis a apenas uma ou duas categorias) e pan-resistentes (PDR) foi definida como não suscetibilidade a todos os agentes em todas as categorias antimicrobianas (Magiorakos *et al.*, 2011). Infecções causadas por organismos multirresistentes (MDR) estão associadas a um aumento de mortalidade comparada àquelas causadas por bactérias suscetíveis. Além disso, resultam em importante custo econômico associado a um maior tempo de hospitalização (Munita; Arias, 2016).

De modo geral, isolados de *Enterococcus* spp. com multirresistência são frequentemente encontrados, tornando um desafio constante em unidades hospitalares e na comunidade, com ênfase em reservatórios em animais de produção e estimação (Turner *et al.*, 2021). Animais de companhia como cães e gatos, podem atuar como reservatórios assintomáticos para espécies enterocócicas virulentas e com perfil MDR, como *E. faecalis* e *E. faecium*. Ainda mais preocupantes são os *Enterococcus* spp. resistentes a vancomicina (VRE, *vancomycin resistant enterococci*) (Köck; Cuny, 2018; Dazio *et al.*, 2021). *E. faecium* resistente à vancomicina é o segundo patógeno mais comum na lista de prioridades da Organização Mundial da Saúde (OMS) de patógenos resistentes a antimicrobianos que ameaçam seriamente a saúde pública. Elevada porcentagem de cepas de MDR isoladas de animais de companhia já foram descritas, no entanto, cepas de VRE ainda são pouco reportadas em cães saudáveis, pois os estudos foram realizados com em suínos, aves e animais produtores de alimentos (El-Razik *et al.*, 2023). O uso de avoparcina (um antimicrobiano da classe dos glicopeptídeos) como promotor de crescimento em gado é outro fator que favorece o aparecimento de VRE (Sfaciotte *et al.*, 2025).

Existem vários mecanismos de resistências nos enterococos, podendo ocorrer via transferência genética por meio dos plasmídeos e transposons contendo genes de resistência (resistência adquirida) e de formas intrínsecas, incluem-se a resistência às cefalosporinas, aztreonam, clindamicina, trimetoprim-sulfametoxazol e às penicilinas semissintéticas (oxacilina, carbenicilina, nafcilina e ticarcilina), portanto, essas drogas não são utilizadas no tratamento das infecções enterocócicas. Excepcionalmente, a resistência intrínseca aos aminoglicosídeos que é detectada para baixas concentrações, permite a sua utilização quando associados aos β -lactâmicos (penicilina G, ampicilina, ureidopenicilinas) ou à vancomicina como opção terapêutica das infecções enterocócicas mais graves, configurando um desafio para cepas VRE (Rice, 2001).

Outra preocupação importante em termos de saúde pública são os *Enterococos spp.* resistentes à linezolida (LRE), pois estão aumentando e espalhando-se pelo mundo entre humanos, animais e produtos alimentares (Ngbede *et al.*, 2023). As oxazolidinonas, como a linezolida e a tedizolida, são opções terapêuticas que atuam por ligação ao rRNA 23S da subunidade 50S, evitando a formação de um complexo de iniciação funcional 70S e inibindo a síntese de proteínas (Ngbede *et al.*, 2023).

Por outro lado, os *Staphylococcus spp.* resistentes à meticilina (MRS, *meticilin resistant staphilococci*) são os mais preocupantes nesse gênero (Köck; Cuny, 2018; Dazio *et al.*, 2021). O mecanismo genético principal envolve a aquisição do gene *mecA* que é transportado em um elemento móvel conhecido como cassete cromossômico estafilocócico. A origem do *mecA* e dos outros genes tem sido objeto de muita investigação (Moellering Jr, 2011). A resistência conferida pela presença do gene *mecA*, codifica para a produção de uma proteína de ligação à penicilina alterada (PBP) (PBP2a ou PBP2') que tem uma baixa afinidade para todos os antimicrobianos β -lactâmicos (penicilinas, cefalosporinas, carbapenêmicos). O mecanismo de ação dos antimicrobianos β -lactâmicos é pela capacidade de ligar a PBP nativa, impedindo a correta montagem do peptideoglicano da parede celular bacteriana e assim, rompendo a bactéria. Essa modificação introduzida pelo gene *mecA* impede essa ligação, tendo como consequência a sobrevivência do microrganismo, conferindo a resistência. Esse gene pode ser transmitido horizontalmente entre bactérias, além de transportar genes para resistência a outros grupos químicos (Weese e van Duijkeren, 2010). Em 2011, um novo cassete genético (SCCmec, tipo XI), carregando um homólogo chamado *mecC* foi descoberto em *S. aureus*. Este gene compartilha aproximadamente 70% de identidade de sequência de nucleotídeos com o gene *mecA* clássico, causando resultados falso-negativos ao usar métodos moleculares para detectar MRSA. PBP2c é o PBP alterado codificado pelo gene cromossômico *mecC*, sendo também responsável pela resistência à meticilina em alguns isolados clínicos estafilocócicos (Abdelwahab *et al.*, 2023).

Os primeiros relatos foram de isolados de *S. aureus* resistentes à meticilina, mas logo *S. pseudintermedius* resistentes também foram publicados em casos de doenças de pele em cães em muitos países. Além disso, os isolados de MRS frequentemente apresentam um perfil de multirresistência que inclui a maioria dos medicamentos usados para o tratamento de doenças de pele. A distribuição de grupos clonais também varia de acordo com a região geográfica (Lopes *et al.*, 2015). Além de *S. aureus* e *S. pseudintermedius*, outras espécies do SIG foram relatadas com resistência à meticilina (Paul *et al.*, 2011; Bhooshan; Negi; Khatri, 2021).

O perfil MDR também tem sido observado em *Staphylococcus* spp., o que dificulta ainda mais o tratamento dessas infecções. Nos últimos anos, a resistência às oxazolidinona, especialmente à linezolida e à tedizolida, também tem sido relatada. Em *Staphylococcus aureus*, entretanto, a resistência à linezolida permanece relativamente baixa quando comparada às resistências já consolidadas a outras classes de antimicrobianos, como β -lactâmicos, macrolídeos, lincosamidas e fluoroquinolonas (Shariati *et al.*, 2020).

A identificação rápida destas resistências é uma questão essencial para tratamento e monitoramento epidemiológico. Existem muitos métodos laboratoriais diferentes para detecção de MRS, incluindo métodos fenotípicos (difusão em disco e microdiluição) e genotípicos (detecção dos genes de resistência) (Koupahil; Jahromy; Rahbar, 2016; Bilyk *et al.*, 2022). O sequenciamento do genoma inteiro é uma alternativa para identificação mais completa do perfil genético de resistência e tem sido usado para investigações epidemiológicas (Papic *et al.*, 2021).

É importante prevenir a transmissão de cepas de *Enterococcus* e *Staphylococcus*, especialmente os altamente resistentes a antimicrobianos, entre animais e para o homem. A transmissão de forma horizontal e o aumento da resistência exigem cuidados especiais nos ambientes hospitalares animais e humanos. Especialmente nos ambientes hospitalares, pacientes animais e humanos com imunidade comprometida e/ou graves patologias podem disseminar bactérias resistentes (Guimarães, Horácio e Junior, 2017). Animais de companhia também podem estar desempenhando um papel importante na emergência e disseminação de bactérias resistentes a antimicrobianos (Kahn, 2017).

3 OBJETIVOS

a. Objetivo geral

Estudar a diversidade de espécies e o perfil de resistência a antimicrobianos de *Enterococcus* spp. e *Staphylococcus* spp. isolados de pequenos animais (cães e gatos).

b. Objetivos específicos

- Identificar as espécies de *Enterococcus* spp. de amostras clínicas de cães e gatos.
- Determinar o perfil de resistência a antimicrobianos de *Enterococcus* de amostras de cães e gatos.
- Isolar e identificar as espécies de *Staphylococcus* isolados de cães e gatos saudáveis.
- Determinar o perfil de resistência a antimicrobianos de *Staphylococcus* da microbiota de cães e gatos saudáveis.
- Ampliar os estudos sobre bactérias Gram-positivas da microbiota de cães e gatos na região Sul do Brasil.

4 RESULTADOS

Os estudos realizados resultaram em dois artigos científicos conforme abaixo:

1: “Multidrug-Resistant *Enterococcus faecium* and *Enterococcus faecalis* Isolated from Dogs and Cats in Southern Brazil” – publicado na revista *Microbiology Research* (apresentado na íntegra entre as páginas 31 e 39).

2: “*Staphylococcus* species diversity and antimicrobial resistance in healthy dogs and cats from Brazil” – publicado na revista *Microbiology Research* (apresentado na íntegra entre as páginas 40 e 55).

Communication

Multidrug-Resistant *Enterococcus faecium* and *Enterococcus faecalis* Isolated from Dogs and Cats in Southern Brazil

Leticia da Silva ^{1,2}, Cristina Zaffari Grecelle ¹, Ana Paula Guedes Frazzon ³, Andre Felipe Streck ², Diessy Kipper ⁴, Andre Salvador Kazantzi Fonseca ⁴, Nilo Ikuta ⁴ and Vagner Ricardo Lunge ^{1,2,4,*}

- ¹ Laboratorio de Diagnostico Molecular, Hospital Veterinario, Universidade Luterana do Brasil (ULBRA), Canoas 92425-020, RS, Brazil; lsilva44@ucs.br (L.d.S.); czaffarigrecelle@gmail.com (C.Z.G.).
- ² Laboratorio de Diagnostico em Medicina Veterinaria, Programa de Pos-Graduacao em Biotecnologia (PPGBIO), Universidade de Caxias do Sul (UCS), Caxias do Sul 95070-560, RS, Brazil; afstreck@ucs.br (A.F.S.).
- ³ Departamento de Microbiologia, Imunologia e Parasitologia, Instituto de Ciencias Basicas da Saude, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Porto Alegre 90010-150, RS, Brazil; ana.frazzon@ufrgs.br (A.P.G.F.).
- ⁴ Simbios Biotecnologia, Cachoeirinha 94940-030, RS, Brazil; diessykipper@hotmail.com (D.K.); fonseca@simbios.com.br (A.S.K.F.); ikuta@simbios.com.br (N.I.).
- * Correspondence: vrlunge@ucs.br (V.R.L.).

Abstract: *Enterococcus* spp. are isolated from infections of domestic animals and can present resistance to different antimicrobials. This study aimed to identify the main species of *Enterococcus* and determine the phenotypic resistance to antimicrobials of isolates of this bacterial genus obtained from dogs and cats admitted to a veterinary hospital in southern Brazil. A total of 57 *Enterococcus* spp. were isolated from different clinical samples (urine, feces, ears and skin) in domestic animals admitted to the hospital over a period of three years (2016 to 2019). MALDI-TOF results demonstrated the occurrence of *Enterococcus faecium* (39; 68.4%), *Enterococcus faecalis* (17; 29.8%) and *Enterococcus avium* (1; 1.8%). In an overall analysis, resistance was observed to the antimicrobials rifampicin (46; 80.7%), tetracycline and streptomycin (42; 73.7%), ampicillin and imipenem (41; 71.9%), erythromycin (39; 68.4%), gentamicin (38; 66.7%), ciprofloxacin (36; 63.2%), norfloxacin (32; 56.1%), nitrofurantoin (10; 17.5%) and chloramphenicol (9; 15.7%). None of the *Enterococcus* spp. showed resistance to vancomycin and linezolid. Multidrug resistance (MDR) was detected in 45 (78.9%) isolates. In conclusion, *E. faecium* and *E. faecalis* with MDR are frequent in infections of hospitalized dogs and cats from southern Brazil.

Keywords: multidrug resistance (MDR); MALDI-TOF; pets; veterinary hospital

Citation: da Silva, L.; Grecelle, C.Z.; Frazzon, A.P.G.; Streck, A.F.; Kipper, D.; Fonseca, A.S.K.; Ikuta, N.; Lunge, V.R. Multidrug-Resistant *Enterococcus faecium* and *Enterococcus faecalis* Isolated from Dogs and Cats in Southern Brazil. *Microbiol. Res.* 2024, 15, x.
<https://doi.org/10.3390/xxxx>

Academic Editor(s): Name

Received: 19 May 2024

Revised: 21 June 2024

Accepted: 21 June 2024

Published: date



Copyright: © 2024 by the authors. Submitted for possible open access publication under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

1. Introduction

Enterococcus spp. are Gram-positive commensal bacteria generally present in the intestine of animals. In veterinary hospitals, this bacterial genus is also frequently detected in cutaneous and systemic infections of small pets, such as dogs and cats [1]. Nosocomial infections caused by this genus can result in septicemia, endocarditis and urinary tract diseases in hospitalized animals [2,3]. Furthermore, pets are reservoirs of *Enterococcus* spp., including strains associated with human infections [4].

Currently, the genus *Enterococcus* has more than 50 bacterial species [5]. *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium* have been more frequently isolated from animals in veterinary hospitals [6–8]. Antimicrobial resistance is also a remarkable characteristic of many *Enterococcus* spp. isolates. The ability of this bacterium to acquire antimicrobial resistance and transfer it to other bacterial species makes it difficult to control and treat the enterococcal infections. Previous studies have already demonstrated the high resistance of this genus to a wide range of antimicrobial agents from different classes [2,9,10]. Antimicrobial resistance was even demonstrated for “last choice” antimicrobials, such as vancomycin and linezolid [11,12].

The present study aimed to determine the bacterial species and phenotypic antimicrobial resistance of *Enterococcus* spp. isolated from dogs and cats admitted to a veterinary faculty hospital in southern Brazil.

2. Materials and Methods

A total of 2223 bacterial isolates were obtained from different animals (mainly dogs and cats) with bacterial infections, which were routinely treated at the Veterinary University Hospital of the Lutheran University of Brazil (ULBRA, Canoas, RS, Brazil), Southern Brazil, in the period from January 2016 to June 2019 (Table 1). Clinical samples included urine and swabs of ears, wound secretions and skin. These samples were collected and immediately streaked onto blood agar (Acumedia®, Lansing, MI, USA) or MacConkey plates (Kasvi®, São José dos Pinhais, Brazil) and incubated overnight (18 to 24 h) at 37 °C. Swabs and urine aliquots of 0.5 mL of each sample were kept in Brain Heart Infusion (BHI, Himedia®, Mumbai, India) until the end of laboratory analysis.

Bacterial isolates were classified as *Enterococcus* spp. or another genus according to traditional bacteriological analysis. All isolates identified as *Enterococcus* spp. presented the microscopic (spherical or ovoid Gram-positive cells arranged in pairs or chains) and biochemical (negative catalase reaction, growth in broth containing 6.5% NaCl, esculin hydrolysis in the presence of 40% bile salts) characteristics expected for this genus, as previously described [13].

Table 1. Number of *Enterococcus* spp. isolates according to the year.

Year	Total Bacterial n	<i>Enterococcus</i> sp p. n (%)	Dogs n (%)	Cats n (%)	Horses n (%)	Cows n (%)	Missing n (%)
2016	485	59 (12.2)	48 (81.3)	5 (8.5)	5 (8.5)	1 (1.7)	0 (0)
2017	646	76 (11.8)	59 (77.6)	10 (13.1)	6 (7.9)	0 (0)	1 (1.3)
2018	778	68 (8.7)	53 (77.9)	9 (13.2)	3 (4.4)	0 (0)	3 (4.4)
2019	314	29 (9.2)	20 (68.9)	6 (20.7)	2 (5.8)	1 (3.4)	1 (3.4)
Total	2223	232 (10.4)	180 (77.6)	30 (12.9)	16 (6.9)	2 (0.9)	5 (2.1)

Missing: host metadata not available.

In the study period, 57 randomly isolates of *Enterococcus* spp. were selected and stored at -20 °C in BHI agar supplemented with 30% glycerol. These bacterial species were further identified by Matrix-Assisted Laser Desorption and the Ionization Time-Of-Flight technique (MALDI-TOF). Briefly, each individual colony was transferred onto main-spectrum-profile 96 target polished steel (Bruker Daltonik, Bremen, Germany) using a toothpick. To crystalize bacterial components, 1 µL of saturated α -cyano-4-hydroxy- cinnamic acid matrix solution in 50% acetonitrile-2.5% trifluoroacetic acid was overlaid on each well and air-dried at room

temperature (25 °C). Spectrum profiles of isolates were obtained using a mass spectrometer (Bruker Daltonik) with default identification standard settings. Bacteria were identified by analyzing spectra according previously described [14].

The antimicrobial resistance profile against 13 antimicrobials frequently used in veterinary medicine was further evaluated using the Kirby–Bauer disk diffusion method. The following antimicrobials were included in the analysis: ampicillin (10 µg), ciprofloxacin (5 µg), chloramphenicol (30 µg), erythromycin (15 µg), gentamycin (120 µg), imipenem (4 µg), linezolid (30 µg), nitrofurantoin (300 µg), norfloxacin (10 µg), rifampicin (5 µg), streptomycin (300 µg), tetracycline (30 µg), and vancomycin (30 µg) [15]. Multidrug resistance (MDR) was defined as non-susceptibility to at least three agents from three or more different antimicrobial categories, while not-MDR was defined as susceptibility to all drugs tested or non-susceptibility to a maximum of agents from one to two antimicrobial categories [16].

3. Results

The bacteriological records demonstrated that 232 (10.4%) of the 2223 isolates were identified as *Enterococcus* spp. The percentage per year ranged from 8.7% in 2018 to 12.2% in 2016. *Enterococcus* spp. was isolated from dogs, cats and other animals (Table 1). The 57 previously stored *Enterococcus* spp. isolates (47 from dogs and 10 from cats) were further characterized with MALDI-TOF. *E. faecium* was the predominant species (n = 39; 68.4%), followed by *E. faecalis* (n = 17; 29.8%) and *E. avium* (n = 1; 1.8%) (Table 2).

Table 2. Number and frequency of *Enterococcus* species isolates in dogs and cats.

	<i>E. faecium</i>	<i>E. faecalis</i>	<i>E. avium</i>	Total
Dogs	32 (68.1%)	14 (29.8%)	1 (2.1%)	47
Cats	7 (70%)	3 (30%)	4 (0%)	10
Total	39 (68.4%)	17 (29.8%)	1 (1.8%)	57

The antimicrobial susceptibility profiles of these *Enterococcus* spp. isolates demonstrated that 56 (98.2%) were resistant to at least one drug (Figure 1), i.e., only one sample (*E. faecalis* isolate 107/19) presented an overall susceptible profile to all tested antimicrobials (it also presented an intermediate resistance to ciprofloxacin and chloramphenicol). *E. faecium* isolates presented a high frequency of resistance to streptomycin, ampicillin and imipenem (n = 38; 97.4%), followed by rifampicin (n = 35; 89.7%), erythromycin and gentamycin (n = 34; 87.2%), tetracycline (n = 33; 84.6%), ciprofloxacin (n = 32; 82.1%), norfloxacin (n = 28; 71.8%), nitrofurantoin (n = 10; 25.6%) and chloramphenicol (n = 6; 15.4%). In addition, there was also intermediate resistance for six antibiotics: chloramphenicol (n = 10; 25.6%), norfloxacin (n = 7; 23.3%), ciprofloxacin (n = 6; 15.4%), erythromycin (n = 4; 10.2%), rifampicin (n = 2; 5.1%) and nitrofurantoin (n = 1; 2.6%). A total of 38 *E. faecium* isolates (97.4%) presented an MDR profile. On the contrary, *E. faecalis* isolates frequently presented resistance to rifampicin (n = 11; 64.7%), followed by tetracycline (n = 8; 47%), erythromycin (n = 5; 29.4%), gentamycin, streptomycin, ciprofloxacin and norfloxacin (n = 4; 23.5%), chloramphenicol (n = 3; 17.6%), imipenem and ampicillin (n = 2; 11.8%). There were also isolate samples with intermediate resistance for ciprofloxacin (n = 8; 47%), norfloxacin (n = 6; 35.2%), erythromycin (n = 5; 29.4%), rifampicin (n = 3; 17.6%), streptomycin, chloramphenicol and

tetracycline (n = 1; 5.9%). Six (35.3%) *E. faecalis* isolates showed resistance to three or more antibiotics (MDR profile). The unique *E. avium* isolate was obtained from a dog sample and presented resistance to ampicillin, imipenem and tetracycline, as well as an MDR profile (Figure 1).

The overall analysis according to the antimicrobial classes demonstrated a high frequency of resistance to rifampicin (80%), β -lactams, aminoglycosides and tetracyclines (70–79%), and fluoroquinolones and macrolides (55–69%). The resistance to phenols, nitrofurans and oxazolidinones was below 20%. Noteworthy, all *Enterococcus* spp. were susceptible to vancomycin and linezolid. In a comparative analysis between the two frequent *Enterococcus* species, *E. faecium* presented a more concerning profile, with resistance to two (only one isolate) to eleven (two isolates) out of the thirteen tested antimicrobials (mean = 6.1; median = 9), while *E. faecalis* presented resistance to one (in only one isolate) to nine (also one isolate) antimicrobials (mean = 1.7; median = 1), but there was also one isolate with resistance to nine drugs (Figure 1). Importantly, *E. faecium* had a higher frequency of MDR (97.4%) than *E. faecalis* (35.3%).

Figure 1. Multiple and individual non-susceptibility profiles of the tested antimicrobials of the *Enterococcus* isolates from hospitalized dogs and cats; n (%) is the total number of non-susceptible tested antimicrobials (%). Black—multidrug-resistant (MDR) isolates. Green—not-MDR isolates. Red—complete resistance. Yellow—intermediate resistance. Gray—no resistance (susceptible). RIF = rifampicin; STR = streptomycin; TET = tetracycline; AMP = ampicillin; IMP = imipenem; ERY = erythromycin; GEN = gentamycin; CIP = ciprofloxacin; NOR = norfloxacin; NIT = nitrofurantoin; CHL = chloramphenicol; LNZ = linezolid; VAN = vancomycin.

4. Discussion

Enterococcus spp. are usually recognized as commensal bacteria. However, different *Enterococcus* species can cause diarrhea, endocarditis and even septicemia in dogs and cats [8]. In addition, cystitis and skin lesions may result from opportunistic *Enterococcus* spp. present in the normal buccal microbiota of domestic animals [17]. This ability of *Enterococcus* spp. to cause infections has been related to the intrinsic robustness of this bacterial genus, persisting in animal populations and hospital environments [18,19]. This concerning Gram-positive bacteria species was frequently detected in hospitalized dogs and cats in this study, reaching a total of 10.4% of the bacterial isolates in the routine microbiological service at a veterinary teaching hospital over a period of three years. *Enterococcus* spp. isolates were obtained from different animal species and distinct tissue systems, such as urinary, otological and cutaneous systems. Previous studies have shown similar frequencies of isolation (between 5 and 25%) of *Enterococcus* sp. in different animal clinical specimens [2,18,20].

In the analysis of *Enterococcus* species, the frequency of *E. faecium* (68.4%) was higher than *E. faecalis* (29.8%), with similar results in both sampled animal species (dogs and cats). This result contrasts to other studies that demonstrated a higher frequency of *E. faecalis* than *E. faecium* in veterinary hospitals as well as in humans [8,18,20–22]. In addition, one isolate of *E. avium* was detected in a dog sample. This bacterial species had already been detected in pets and was also demonstrated to be associated with an emphysematous pyometra in a dog [8,23].

Enterococci also serve as the indicator of bacterial resistance both in human and veterinary resistance surveillance systems [24,25]. Therefore, the present study also focused on the evaluation of the bacterial antimicrobial resistance profiles of these hospital isolates. They demonstrated resistance to different classes: rifampicin, β -lactams, aminoglycosides and tetracyclines. For *E. faecium*, the median resistance was to 9 out of 13 antibiotics tested (including 1 with resistance to 12 antimicrobials), with an MDR profile in 38 out of 39 (97.4%) isolates. A previous study demonstrated that dogs and cats treated with antibiotics are commonly colonized with antimicrobial-resistant enterococci [20]. *E. faecalis* had a much lower resistance level, with a median of one out of thirteen antimicrobials tested and with an MDR profile in six of the seventeen isolates (35.3%). *E. faecium* is less susceptible to antimicrobials than *E. faecalis*, with more than half expressing resistance to ampicillin and aminoglycosides. This high level of antibiotic resistance has already been observed in other animal health care facilities and in human medical settings [20,24].

Enterococci are pathogens of huge clinical concern for the development and dissemination of MDR [25,26]. Other studies seem to reinforce this scenario, demonstrating an MDR profile in more than 60% of the enterococci isolates in the last decade [7,9,24]. *E. faecium* is also considered a bacterial pathogen by the World Health Organization with priority status,

as it presents unique resistance profiles and constitutes a central concern in the global health scenario [27]. The results presented here are concerning, since they also demonstrate the high frequency of multidrug-resistant *E. faecium* in pets from Brazil, many of them living in close contact with humans. Noteworthy, all strains here-characterized were susceptible to vancomycin—the antibiotic most widely used to control the MDR of bacteria in hospital clinical settings. Previous reports have even demonstrated the occurrence of vancomycin resistance in enterococci isolated from domestic animals [28,29]. Therefore, ongoing surveillance studies of these bacterial pathogens are needed in both human and veterinary medical settings.

The present study also highlights the importance of MALDI-TOF for the identification of enterococci, as previously reported [14]. The use of this technique can be associated with molecular biology methods, which have also been very useful in the identification of bacterial infections. PCR methods are described for the detection of the genus *Enterococcus* and its main species [30]. More recently, next-generation sequencing approaches have also made it possible to obtain important genomic information on the pathogenic mechanisms, virulence and antimicrobial resistance of this concerning bacterial genus [30]. Taken together, this arsenal of molecular diagnostic methods can help in the rapid diagnosis of any enterococci infection to initiate appropriate therapy as early as possible, reducing the use of unnecessary antibiotics.

5. Conclusions

In conclusion, we demonstrated the occurrence of two main enterococci species (*E. faecium* and *E. faecalis*) in infections of hospitalized dogs and cats. Also, several enterococci isolates presented an MDR profile. The present findings are also important for public health, since the identification and characterization of antimicrobial resistance profiles evidence which drugs have higher and lower resistance, maximizing the success of empirical therapies. Finally, these results reinforce the importance of constantly surveilling the enterococci resistance profiles in veterinary facilities.

Author Contributions: L.d.S., conceptualization and design of the study; sample collection; methodology; formal analysis; review and approval of the final manuscript; C.Z.G., methodology; data analysis; and review and approval of the final manuscript; A.P.G.F., formal analysis; data collection; review and approval of the final manuscript; A.F.S., supervision; review and approval of the final manuscript; D.K., validation; review and approval of the final manuscript; A.S.K.F., validation; funding acquisition, review and approval of the final manuscript; N.I., methodology; data analysis; and review and approval of the final manuscript; V.R.L., conceptualization and design of the study; sample collection; methodology; formal analysis; review and approval of the final manuscript. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This research project was supported by Lutheran University of Brazil (ULBRA - Universidade Luterana do Brasil) and SIMBIOS Biotecnologia. L.d.S. was financed in part by the Coordination for the Improvement of Higher Education Personnel (CAPES - Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil—Finance Code 001. V.R.L. was financially supported by the National Council for Scientific and Technological Development from Brazil (CNPq—Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico; process numbers 311010/2017-2 and CNPq 308445/2020-1).

Institutional Review Board Statement: Ethical review and approval were waived for this study, as it did not use animals (only bacterial isolates).

Informed Consent Statement: Not applicable.

Data Availability Statement: Data are contained within the article.

Acknowledgments: The authors thank the members of the Laboratório de Diagnóstico Molecular and Laboratório de Microbiologia—Hospital Veterinário (ULBRA) for collaboration and technical support in the development of this study.

Conflicts of Interest: A.S.K.F. and N.I. work at the company Simbios Biotecnologia. D. K. is a CNPq scholarship holder and develops projects at the same company. The other authors declare that the research was carried out in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

References

1. Stull, J.W.; Weese, J.S. Hospital-associated infections in small animal practice. *Vet. Clin. N. Am. Small Anim. Pract.* 2015, *45*, 217–233. <https://doi.org/10.1016/j.cvsm.2014.11.009>.
2. Jackson, C.R.; Fedorka-Cray, P.J.; Davis, J.A.; Barrett, J.B.; Frye, J.G. Prevalence, species distribution and antimicrobial resistance of enterococci isolated from dogs and cats in the United States. *J. Appl. Microbiol.* 2009, *107*, 1269–1278. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2009.04310.x>.
3. Ghosh, A.; Dowd, S.E.; Zurek, L. Dogs leaving the ICU carry a very large multi-drug resistant enterococcal population with capacity for biofilm formation and horizontal gene transfer. *PLoS ONE* 2011, *6*, e22451. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0022451>.
4. Damborg, P.; Top, J.; Hendrickx, A.P.A.; Dawson, S.; Willems, R.J.; Guardabassi, L. Dogs are a reservoir of ampicillin-resistant *Enterococcus faecium* lineages associated with human infections. *Appl. Environ. Microbiol.* 2009, *75*, 2360–2365. <https://doi.org/10.1128/AEM.02035-08>.
5. Torres, C.; Alonso, C.A.; Ruiz-Ripa, L.; León-Sampedro, R.; Del Campo, R.; Coque, T.M. Antimicrobial Resistance in *Enterococcus* spp. of animal origin. *Microbiol. Spectr.* 2018, *6*, 10.1128. <https://doi.org/10.1128/microbiolspec.ARBA-0032-2018>.
6. Jackson, C.; Fedorka-Cray, P.; Davis, J.; Barrett, J.; Brousse, J.; Gustafson, J.; Kucher, M. Mechanisms of antimicrobial resistance and genetic relatedness among enterococci isolated from dogs and cats in the United States. *J. Appl. Microbiol.* 2010, *108*, 2171–2179. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2009.04619.x>.
7. Bertelloni, F.; Salvadori, C.; Lotti, G.; Cerri, D.; Ebani, V.V. Antimicrobial resistance in *Enterococcus* strains isolated from healthy domestic dogs. *Acta Microbiol. Immunol. Hung.* 2017, *64*, 301–312. <https://doi.org/10.1556/030.63.2016.021>.
8. Miranda, C.; Silva, V.; Igrejas, G.; Poeta, P. Impact of European pet antibiotic use on enterococci and staphylococci antimicrobial resistance and human health. *Future Microbiol.* 2021, *16*, 185–201. <https://doi.org/10.2217/fmb-2020-0119>.
9. Leite-Martins, L.; Meireles, D.; Bessa, L.J.; de Matos, A.J.; da Costa, P.M. Spread of multidrug-resistant *Enterococcus faecalis* within the household setting. *Microb. Drug Resist.* 2014, *20*, 501–507. <https://doi.org/10.1089/mdr.2013.0217>.
10. Marques, C.; Belas, A.; Franco, A.; Aboim, C.; Gama, L.T.; Pomba, C. Increase in antimicrobial resistance and emergence of major international high-risk clonal lineages in dogs and cats with urinary tract infection: 16 year retrospective study. *J. Antimicrob. Chemother.* 2018, *73*, 377–384. <https://doi.org/10.1093/jac/dkx401.11>.
11. Ben Said, L.; Dziri, R.; Sassi, N.; Lozano, C.; Ben Slama, K.; Ouzari, I.; Torres, C.; Klibi, N. Species distribution, antibiotic resistance and virulence traits in canine and feline enterococci in Tunisia. *Acta Vet. Hung.* 2017, *65*, 173–184. <https://doi.org/10.1556/004.2017.018>.
12. van den Bunt, G.; Top, J.; Hordijk, J.; de Greeff, S.C.; Mughini-Gras, L.; Corander, J. Intestinal carriage of ampicillin- and vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* in humans, dogs and cats in the Netherlands. *J. Antimicrob. Chemother.* 2018, *73*, 607–614. <https://doi.org/10.1093/jac/dkx455>.
13. Gilmore, M.S.; Clewell, D.B.; Ike, Y.; Shankar, N. (Eds.) *Enterococci: From Commensals to Leading Causes of Drug Resistant Infection [Internet]*; Massachusetts Eye and Ear Infirmary: Boston, MA, USA, 2014.
14. Kim SH, Chon JW, Jeong HW; et al. Identification and phylogenetic analysis of *Enterococcus* isolates using MALDI-TOF MS and VITEK 2. *AMB Express* 2023, *13*, 21. <https://doi.org/10.1186/s13568-023-01525-y>.
15. CLSI—Clinical and Laboratory Standards Institute. *Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing* 2016, 26th ed.; 100S; CLSI: Wayne, PA, USA, 2016.
16. Magiorakos, A.-P.; Srinivasan, A.; Carey, R.B.; Carmeli, Y.; Falagas, M.E.; Giske, C.G.; Harbarth, S.; Hindler, J.F.; Kahlmeter, G.; Olsson-Liljequist, B.; et al. Multidrug-resistant, extensively drug-resistant and pandrug-resistant

- bacteria: An international expert proposal for interim standard definitions for acquired resistance. *Clin. Microbiol. Infect.* 2012, 18, 268–281. <https://doi.org/10.1111/j.1469-0691.2011.03570.x>.
17. Rantala, M.; Lahti, E.; Kuhalampi, J.; Pesonen, S.; Järvinen, A.-K.; Saijonmaa-Koulumies, L.; Honkanen-Buzalski, T. Antimicrobial resistance in *Staphylococcus* spp., *Escherichia coli* and *Enterococcus* spp. in dogs given antibiotics for chronic dermatological disorders, compared with non-treated control dogs. *Acta Vet. Scand* 2004, 45, 37–45. <https://doi.org/10.1186/1751-0147-45-37>.
 18. KuKanich, K.S.; Lubbers, B.V. Review of enterococci isolated from canine and feline urine specimens from 2006 to 2011. *J. Am. Anim. Hosp. Assoc.* 2015, 51, 148–154. <https://doi.org/10.5326/JAAHA-MS-6070>.
 19. Isaiah, A.; Hoffmann, A.R.; Kelley, R.; Mundell, P.; Steiner, J.M.; Suchodolski, J.S. Characterization of the nasal and oral microbiota of detection dogs. *PLoS ONE* 2017, 12, e0184899. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0184899>.
 20. Kataoka, Y.; Umino, Y.; Ochi, H.; Harada, K.; Sawada, T. Antimicrobial susceptibility of Enterococcal species isolated from antibiotic-treated dogs and cats. *J. Vet. Med. Sci.* 2014, 76, 1399–1402. <https://doi.org/10.1292/jvms.13-0576>.
 21. da Costa, L.B.; Corá, L.F.; Correa, F.E.L.; Gabrielli, L.C.; de Oliveira, M.R.; Conceição, N.; Oliveira, A.G. High Prevalence of the *aac(6′)-Ie-aph(2′)-Ia* gene in hospital isolates of *Enterococcus faecalis* co-resistant to gentamicin and penicillin. *Microb. Drug Resist.* 2019, 25, 1275–1281. <https://doi.org/10.1089/mdr.2018.0466>.
 22. Bang, K.; An, J.-U.; Kim, W.; Dong, H.-J.; Kim, J.; Cho, S. Antibiotic resistance patterns and genetic relatedness of *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium* isolated from military working dogs in Korea. *J. Vet. Sci.* 2017, 18, 229–236. <https://doi.org/10.4142/jvs.2017.18.2.229>.
 23. Cheng, C.-C.; Wang, H.-C.; Lee, W.-M.; Shyu, C.-L.; Lin, C.-C.; Chen, K.-S.; Chang, A.-C. Emphysematous pyometra secondary to *Enterococcus avium* infection in a dog. *Tieraerztliche Prax. Ausg. Kleintiere Heimtiere* 2016, 44, 195–199. <https://doi.org/10.15654/TPK-150214>.
 24. Ghosh, A.; KuKanich, K.; Brown, C.E.; Zurek, L. Resident cats in small animal veterinary hospitals carry multi drug resistant enterococci and are likely involved in cross-contamination of the hospital environment. *Front. Microbiol.* 2012, 3, 62.

Article

Diversity and antimicrobial resistance of staphylococci isolated from healthy dogs and cats in southern Brazil

Letícia da Silva¹, Tamiris Silva Lopes¹, Gustavo Brambatti¹, Aline de Barros Moyses¹, Leandro do Monte Ribas¹, Diéssy Kipper², André Felipe Streck¹, Vagner Ricardo Lunge^{1,2,*}

¹ Universidade de Caxias do Sul (UCS), Laboratório de Diagnóstico em Medicina Veterinária, Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia (PPGBIO), Caxias do Sul, RS, Brasil; lsilva44@ucs.br (L.d.S.); tslopes@ucs.br (T.S.L.); gbrambatti@ucs.br (G.B.); alinebmoyses@hotmail.com (A.B.M.); lmribas@ucs.br (L.d.M.R.); afstreck@ucs.br (A.F.S.); vrlunge@ucs.br (V.R.L.).

² Simbios Biotecnologia, Cachoeirinha, RS, Brasil; diessykipper@hotmail.com (D.K.).

* Correspondence: vrlunge@ucs.br

Abstract

Staphylococcus spp. is a potential pathogen classified into more than 50 species, frequently presenting antimicrobial resistance (AMR) to several drugs. The present study aimed to identify the *Staphylococcus* species and their AMR in staphylococci isolated from healthy companion animals (pets) in southern Brazil. A total of 78 presumptive *Staphylococcus* spp. isolates (from 48 dogs and 30 cats) were obtained in a period of five years (2018-2022). All isolates were analyzed by Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Time-of-Flight (MALDI-ToF) and tested with a panel of antimicrobials frequently used in pets' treatment in Brazil. The results demonstrated that 68 isolates were identified as *Staphylococcus* spp., including 26 (38.2%) classified as coagulase-positive staphylococci (CoPS) and 42 (61.8%) as coagulase-negative staphylococci (CoNS). CoPS included *S. pseudintermedius* ($n = 20$; 29.4%), *S. aureus* ($n = 3$; 4.4%) and *S. schleiferi* ($n = 2$; 2.9%), while CoNS were *S. equorum* ($n = 12$; 17.6%), *S. felis* ($n = 7$; 10.3%), *S. sciuri* ($n = 8$; 11.8%), *S. simulans* ($n = 4$; 5.9%), *S. epidermidis* ($n = 1$; 1.5%), *S. haemolyticus* ($n = 1$; 1.5%), *S. saprophyticus* ($n = 1$; 1.5%), and *S. xylosus* ($n = 1$; 1.5%). The remaining eight isolates were identified as *Staphylococcus* spp. AMR analyses demonstrated that 17 (25%) isolates presented susceptibility to all tested drugs, and 51 (75%) to one or more antimicrobials. Twenty four (35.6%) isolates were multidrug resistant (MDR) and 13 (19.1%) methicillin resistant staphylococci (MRS). *S. pseudintermedius* was the CoPS most frequently with AMR, including nine (45%) MDR and four (20%) MRS, while *S. equorum* was the predominant CoNS with AMR, highlighting nine (75%) MDR and four (33.3%) MRS. *Staphylococcus* species diversity identified here highlights the importance of studying the microorganisms circulating in healthy companion animals and their characteristics concerning pathogenicity and AMR.

Keywords: Multidrug resistance; MDR; methicillin-resistant *Staphylococcus*; MALDI-ToF; commensal bacteria; companion animals

Citation: To be added by editorial staff during production.

Academic Editor: Firstname Lastname

Received: date

Revised: date

Accepted: date

Published: date

Copyright: © 2024 by the authors. Submitted for possible open access publication under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

1. Introduction

Staphylococcus spp. is a genus belonging to the family *Staphylococcaceae* and characterized as Gram-positive, non-motile, cocci-shaped bacteria usually arranged in clusters as “grape-like” when visualized in the microscope. One of its main biochemical characteristics of this bacterial genus is the synthesis of the enzyme catalase, which degrades hydrogen peroxide [1]. Taxonomically, it is classified into 89 recognized species and 30 subspecies presenting different levels of pathogenicity and living in a high diversity and environments of animals hosts [2]. The different *Staphylococcus* species are usually divided into two main groups according to the ability to clot blood: coagulase-positive staphylococci (CoPS) and coagulase-negative staphylococci (CoNS). CoPS are considered more virulent pathogens as blood clotting protects the bacteria from the host immune defenses [3]. They are also frequently associated with more serious infections in mammals [4]. CoPS species include *S. aureus* and the five members of the *S. intermedius* group (SIG): *S. intermedius*, *S. pseudintermedius*, *S. delphini*, *S. cornubiensis* and *S. ursi* [5-9]. On the other hand, CoNS species comprises a large and expanding group of generally non-pathogenic bacteria, with more than 50 species and at least 20 subspecies [9].

Overall, CoPS and CoNS were already detected in the normal skin and

mucous microbiotas from mammals [10]. Noteworthy, pathogenic and commensal staphylococci can coexist in different animal tissues with other microorganisms, with some species more adapted to specific hosts. For example, *S. pseudintermedius*, *S. epidermidis*, *S. aureus* and *S. sciuri* are frequently detected in dogs [11-13], while *S. felis*, *S. pseudintermedius* and *S. schleiferi* in cats [14,15]. In addition, CoPS have been observed in skin lesions, abscesses and other internal body parts (nose, mouth, perineum-rectum, groin) of both dogs and cats [12].

S. aureus has generally been considered the most concerning pathogenic species in domestic animals because it carries important virulence factors [16]. *S. aureus* has also been associated with human community-acquired and nosocomial infections, causing serious and even fatal infections [17,18]. However, other potentially pathogenic *Staphylococcus* spp. (highlighting *S. pseudintermedius* and *S. felis*) were already detected in pets, associated with pyoderma, otitis media, postoperative wounds and infections in the urinary tract [19-22].

The increasing use of drugs in veterinary medicine of companion animals has contributed to the emergence of antimicrobial resistance (AMR) in *Staphylococcus* spp. [23]. Many staphylococci species have acquired AMR to a large extent of antimicrobials over time due to the selective pressure from the excessive and inappropriate use of antimicrobials in both veterinary and human medicine. Consequently, antibacterial treatment options have become more limited, making infections difficult to treat, especially those caused by methicillin-resistant staphylococcus (MRS) [24]. MRS isolates are also usually resistant to several other classes of antimicrobials and present a multidrug resistance (MDR) profile [25,26]. The identification of MRS and MDR in *Staphylococcus* isolated from animals is necessary for continued monitoring of the spread and control of AMR strains [27].

In Brazil, few studies have investigated *Staphylococcus* spp. from companion animals (highlighting dogs and cats) microbiota [22, 28-30]. The present study aimed to determine the diversity of the *Staphylococcus* species and to evaluate the AMR in a sample of healthy dogs and cats from southern Brazil.

2. Materials and Methods

2.1 Sampling population

This study was performed with a convenience sampling of 117 different healthy animals (80 dogs and 37 cats) treated in routine check-ups or neutering procedures in five different cities (Caxias do Sul, Canela, Farroupilha, Bom Jesus and Veranópolis) from southern Brazil in the period of November 2018 to August 2022 (Figure 1). The samples were collected mainly from males (70 dogs and 34 cats), but there were also samples from females (10 dogs and 3 cats). The study was approved by the Ethics Committee on the Use of Animals (CEUA) of the University of Caxias do Sul (UCS) under the number 21/2018. Samples for bacteria isolation were collected using swabs previously moistened with sterile saline solution and passed over the mouth, skin, eyes, ears, rectum, and nose (intranasal). The swabs were maintained in Stuart transport medium (Absorve®, Jiangsu, PR, China) for no more than 24 hours before cultivation.

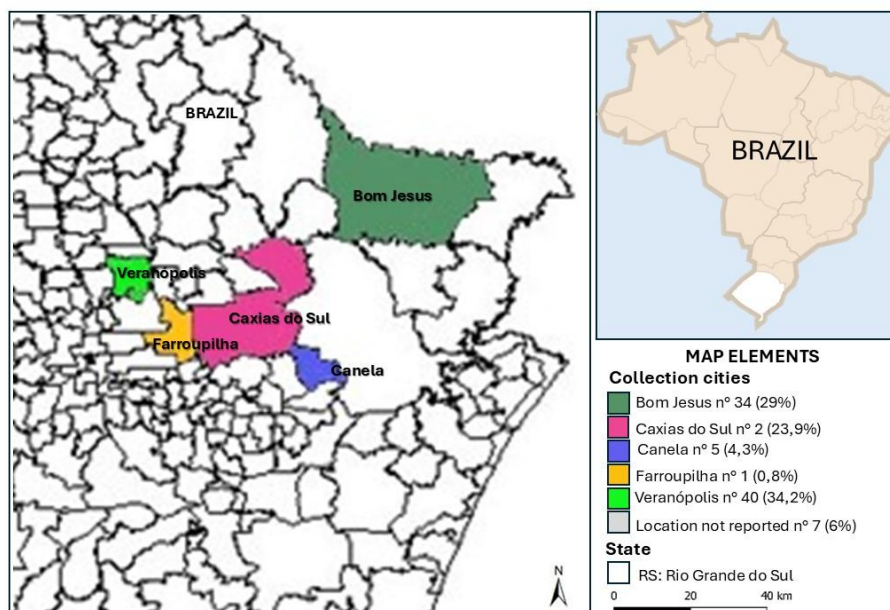


Figure 1. Location and respective number of collections carried out between 2018 and 2022.

2.2 Bacteriological culture and staphylococci isolation

The culture was performed by streaking the swabs on Blood Agar Base plates (Acumedia®, Lansing, MI, EUA) and incubating at 37°C for 24 hours as the routine procedure of the laboratory. Suspected *Staphylococcus* spp. isolates were evaluated for macroscopic (colony morphology on blood agar) and microscopic (Gram staining) characteristics. Briefly, the first isolated colonies were seeded to obtain pure cultures. Colonies with a cream to slightly grayish color, flat, with smooth and regular edges were selected for further evaluation. In the microscopic analysis, only isolates that presented spherical or ovoid Gram-positive cells, with small variation in the diameter of the cocci in some isolates, in a typical staphylococcal arrangement (bunch of grapes), diplococci (cocci grouped in pairs), tetrads (groups of four cocci) and micrococci (isolated cocci), were selected to be used in the study.

All these isolates were tested for catalase activity with 35% of Hydrogen Peroxide (Neon®, Suzano, SP, Brazil) and coagulation reaction with rabbit plasma (Newprow®, Pinhais, PR, Brazil). The catalase test was performed on sterilized microscope slides by adding half of a colony of the isolate to a drop of hydrogen peroxide and classifying catalase-positive bacteria as those exhibiting bubbling. The coagulase test was performed with a bacterial cell suspension obtained after inoculating half of a colony in 0.5 mL of Brain Heart Infusion broth (BHI, Himedia®, Mumbai, India), incubated at 37°C for eight hours. 0.2 mL of each cell suspension was then added to a sterilized test tube with 0.5 mL of rabbit plasma, followed by incubation at 37°C for 24h. The tubes were evaluated after 1h, 4h and 24h of incubation, gently tilted to the side, classifying them as coagulase positive (clotting) or negative (not clotting). All isolates were classified as catalase positive and negative, as well as CoPS and CoNS. The isolates were also maintained on BHI agar supplemented with 30% glycerol at -20°C for further analysis.

2.3 Bacterial species identification by MALDI-ToF

The bacterial isolates presumptively identified as *Staphylococcus* spp. were further identified by MALDI-ToF (Matrix-Assisted Laser Desorption and the Ionization Time-of-Flight). The microbiological preparation included the cultivation of bacteria on blood agar culture medium up to 24h (fresh culture), followed by protein extraction. A typical colony was transferred to a tube with 0.3 mL of water and homogenized until the solution became cloudy, followed by the addition of 900 µL of absolute ethanol. These tubes were centrifuged for 2 minutes at 13,000 rotations per minute (rpm), the supernatant was removed and 50 µL of 70% formic acid was added and mixed with the pellet. After 30 minutes, 50 µL of

acetonitrile was added, mixed and centrifuged for 2 minutes at 13,000 rpm. The supernatant with the protein extract was pipetted (1 μ L) onto a spot of the 96-well polished steel plate (Bruker Daltonik, Bremen, Germany). Finally, 1 μ L of saturated α -cyano-4-hydroxy-cinnamic acid matrix solution in 50% acetonitrile-2.5% trifluoroacetic acid was overlaid in each well and air-dried at room temperature (25 °C). Spectrum profiles of isolates were obtained using a mass spectrometer (Bruker Daltonik, Bremen, Germany) with default identification standard settings. Bacteria were identified by analyzing their unique protein profiles spectra according to previously described [31]. Standard Bruker interpretative criteria were applied and scores ≥ 2.0 were considered to identify all strains [32] (Table S1).

2.4 AMR testing

All isolates were tested against a panel of 16 antimicrobials frequently used in human/veterinary medicine using the Kirby–Bauer disk diffusion method following CLSI guidelines (M100 and VET01 2020) to evaluate breakpoints. The following antimicrobials were included in the analysis: penicillin 10 μ g (PEN), oxacillin 1 μ g (OXA), cefoxitin 30 μ g (CFX), azithromycin 15 μ g (AZM), erythromycin 15 μ g (ERY), rifampin 5 μ g (RIF), gentamicin 10 μ g (GEN), chloramphenicol 30 μ g (CHL), ciprofloxacin 5 μ g (CIP), orbifloxacin 5 μ g (ORB), doxycycline 30 μ g (DOX), tetracycline 30 μ g (TET), sulfazotrim 25 μ g (SUT), clindamycin 2 μ g (DA), nitrofurantoin 300 μ g (NFT) and linezolid 30 μ g (LZD). The results were recorded as susceptible, intermediate, or resistant according the diameter of the inhibition zone. Multidrug resistance (MDR) was defined as non-susceptibility to at least three agents from three or more different antimicrobial categories [33]. Classification for methicillin-resistant *Staphylococcus* (MRS) and methicillin-susceptible *Staphylococcus* (MSS) was defined by antimicrobial susceptibility testing (AST) for cefoxitin and oxacillin, according to previously published criteria for specific *Staphylococcus* species [34].

3. Results

3.1 Diversity of staphylococci species

Of the 117 isolates detected as *Staphylococcus* spp. by classical bacteriological analysis, 39 were missed in the recovery of the cultures and the analytical procedures (Figure 2). Therefore, the final number of presumptively *Staphylococcus* spp. isolates analyzed by all procedures were 78, including 48 (61.5%) from dogs and 30 (38.5%) from cats. The biochemical analyses demonstrated that 71 (91%) isolates were catalase positive and seven (9%) catalase negative, while 33 (42.3%) isolates were coagulase positive and 45 (57.7%) coagulase negative.

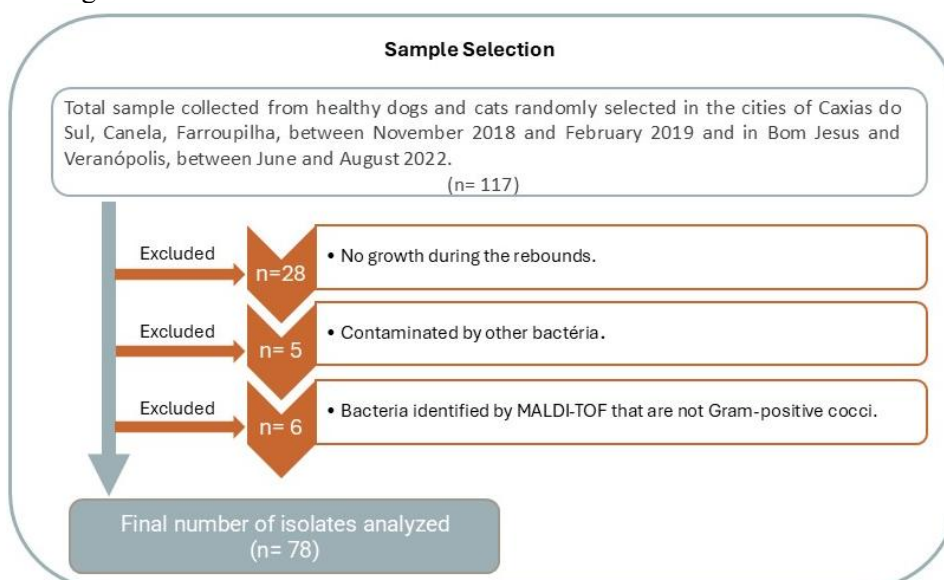


Figure 2. Description of the samples selected for this study.

The results obtained by MALDI-ToF showed that 68 isolates (87.2%) were *Staphylococcus* spp., including 11 different species: *S. pseudintermedius* ($n = 20$; 29.4%), *S. equorum* ($n = 12$; 17.6%), *S. sciuri* ($n = 8$; 11.8%), *S. felis* ($n = 7$; 10.3%), *S. simulans* ($n = 4$; 5.9%), *S. aureus* ($n = 3$; 4.4%), *S. schleiferi* ($n = 2$; 2.9%), *S. epidermidis* ($n = 1$; 1.5%), *S. haemolyticus* ($n = 1$; 1.5%), *S. saprophyticus* ($n = 1$; 1.5%) and *S. xylosus* ($n = 1$; 1.5%). Furthermore, 8 (11.8%) isolates could only be detected as *Staphylococcus* spp., without an assertive identification of the species (Table 1 and Figure 3a). In the remaining ten isolates, four other genera/species were identified in six isolates: *Aerococcus viridans* ($n = 2$; 2.6%), *Enterococcus faecalis* ($n = 2$; 2.6%), *Macrocooccus* spp. ($n = 1$; 1.3%) and *Rothia nasimurium* ($n = 1$; 1.3%). It was not possible to identify genus and species in four (5.1%) isolates.

Seven different *Staphylococcus* species were identified in cats' samples: *S. equorum* ($n = 11$; 37.9%), *S. felis* ($n = 7$; 24.1%), *S. pseudintermedius* ($n = 2$; 6.9%), *S. epidermidis* ($n = 1$; 3.4%), *S. saprophyticus* ($n = 1$; 3.4%), *S. schleiferi* ($n = 1$; 3.4%), *S. sciuri* ($n = 1$; 3.4%) (Figure 3b). Eight different *Staphylococcus* species were identified in dogs' samples: *S. pseudintermedius* ($n = 18$; 46.2%), *S. sciuri* ($n = 7$; 17.9%), *S. simulans* ($n = 4$; 10.3%), *S. aureus* ($n = 3$; 7.7%), *S. equorum* ($n = 1$; 2.6%), *S. haemolyticus* ($n = 1$; 2.6%), *S. schleiferi* ($n = 1$; 2.6%) and *S. xylosus* ($n = 1$; 2.6%) (Figure 3c).

Table 1. *Staphylococcus* species identified by MALDI-ToF

	Canine n (%)	Feline n (%)	Total n (%)
<i>Staphylococcus</i> spp.	3 (7.7)	5 (17.2)	8 (11.8)
<i>Staphylococcus aureus</i>	3 (7.7)	0	3 (4.4)
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	0	1 (3.4)	1 (1.5)
<i>Staphylococcus equorum</i>	1 (2.6)	11 (37.9)	12 (17.6)
<i>Staphylococcus felis</i>	0	7 (24.1)	7 (10.3)
<i>Staphylococcus haemolyticus</i>	1 (2.6)	0	1 (1.5)
<i>Staphylococcus pseudintermedius</i>	18 (46.2)	2 (6.9)	20 (29.4)
<i>Staphylococcus saprophyticus</i>	0	1 (3.4)	1 (1.5)
<i>Staphylococcus schleiferi</i>	1 (2.6)	1 (3.4)	2 (2.9)
<i>Staphylococcus sciuri</i>	7 (17.9)	1 (3.4)	8 (11.8)
<i>Staphylococcus simulans</i>	4 (10.3)	0	4 (5.9)
<i>Staphylococcus xylosus</i>	1 (2.6)	0	1 (1.5)
Total	39	29	68

In addition, MALDI-ToF results were compared with the previous bacteriological results, highlighting catalase and coagulase reactions. The catalase test results among the *Staphylococcus* species ($n = 68$) showed that 64 were positive, including 19 *S. pseudintermedius*, 12 *S. equorum*, eight *S. sciuri*, five *S. felis*, four *S. simulans*, three *S. aureus*, two *S. schleiferi*, one *S. haemolyticus*, one *S. saprophyticus*, one *S. xylosus* and eight *Staphylococcus* spp. But there were also four catalase-negative isolates, including two *S. felis*, one *S. epidermidis* and one *S. pseudintermedius*.

Coagulase test results allowed classifying the 68 *Staphylococcus* spp. into CoPS and CoNS. The first group comprised the species *S. pseudintermedius* ($n = 20$; 29.4%), *S. aureus* ($n = 3$; 4.4%), *S. schleiferi* ($n = 2$; 2.9%) and *Staphylococcus* spp. ($n = 1$; 1.8%). The CoNs group included *S. equorum* ($n = 12$; 17.6%), *S. sciuri* ($n = 8$; 11.8%), *S. felis* ($n = 7$; 10.3%), *S. simulans* ($n = 4$; 5.9%), *S. haemolyticus* ($n = 1$; 1.5%), *S. epidermidis* ($n = 1$; 1.5%), *S. saprophyticus* ($n = 1$; 1.5%), *S. xylosus* ($n = 1$; 1.5%) and *Staphylococcus* spp. ($n = 7$; 10.3%).

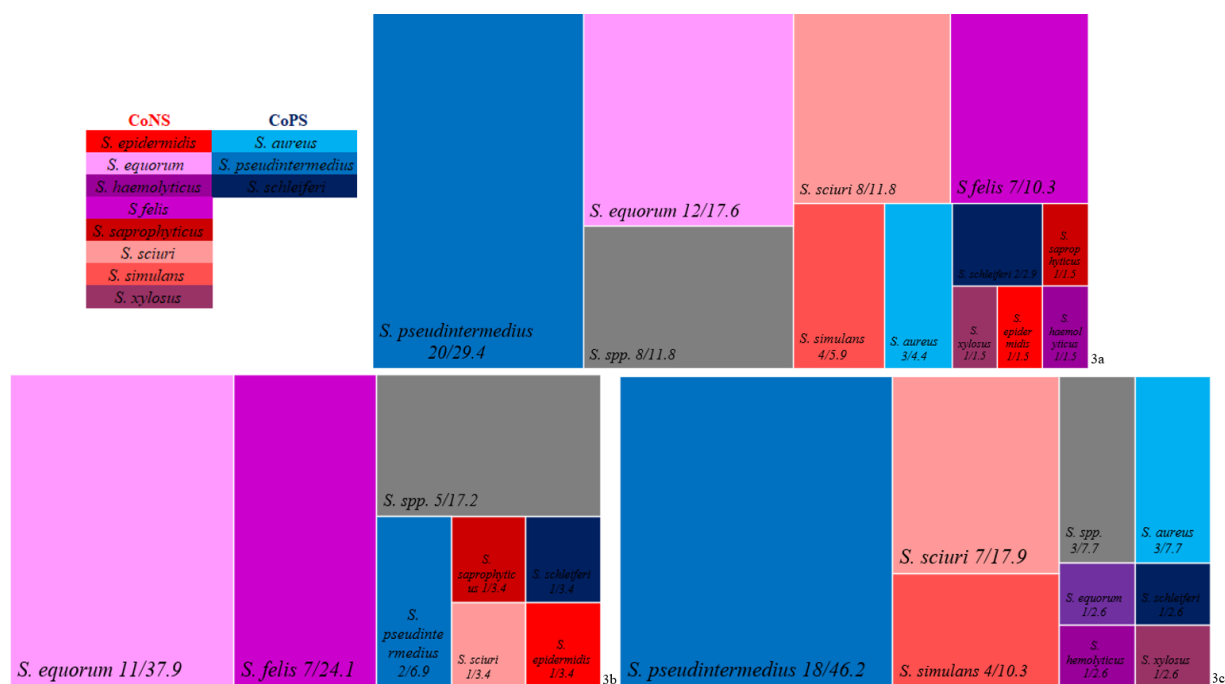


Figure 3. Treemapping presenting the 11 species identified by MALDI-ToF in all *Staphylococcus* isolates (3a) as well as in these same genus isolates from cats (3b) and dogs (3c). The red palette represents the species identified in the CoNS group and the blue palette the species found in the CoPS group. Gray represents *Staphylococcus* spp. isolates.

3.2 Antimicrobial susceptibility

Seventeen (25%) *Staphylococcus* spp. isolates showed susceptibility to all tested antimicrobials, while 51 (75%) had resistance from one to twelve antimicrobials (mean=3 and median=3). Furthermore, 42 (61.8%) were resistant to PEN, 28 (41.2%) to OXA, 14 (20.6%) to SUT, AZM and DOX. Resistance to the other antimicrobials was below 20%. It was also observed intermediate resistance to 12 antimicrobials (Figure 4 and Figure 5).

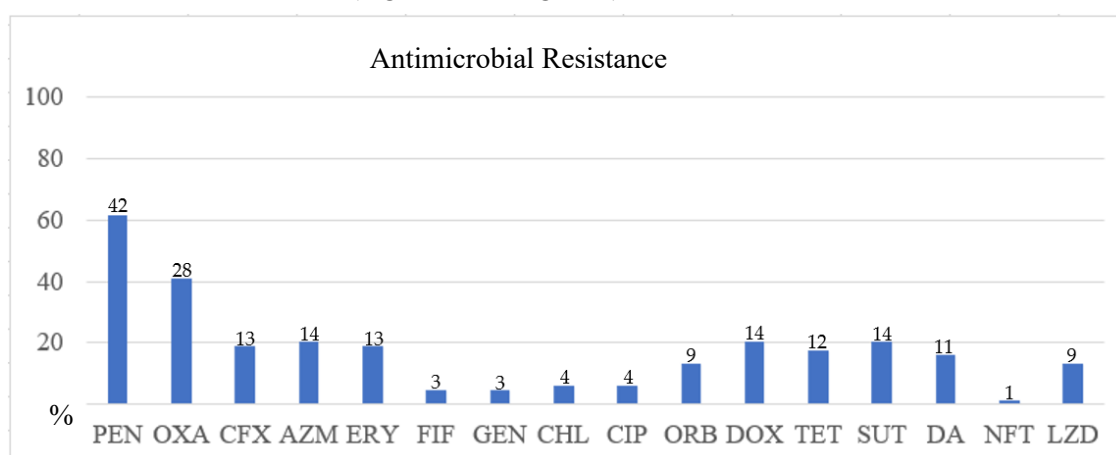


Figure 4. Susceptibility test result of the 68 isolates. Graph Y-axis represents the percentage of isolates resistant to the antimicrobial on the X-axis. PEN = penicillin; OXA= oxacillin; CFX = ceftiofloxacin; AZM = azithromycin; ERY = erythromycin; RIF = rifampin; GEN = gentamycin; CHL = chloramphenicol; CIP = ciprofloxacin; ORB = orbifloxacin; DOX = doxycycline; TET = tetracycline; SUT = sulfazotrim; DA = clindamycin; NFT = nitrofurantoin; LZD = linezolid; NA = Not applicable. The isolates number that shows resistance to the antimicrobial is at the top of the bar.

Moreover, 24 (35.3%) isolates were classified as MDR, showing resistance from three ($n = 14$) to eight ($n = 1$) classes (mean=2.6 and median=2), and 13

(19.1%) were MRS. The most frequently observed MDR patterns were beta-lactams+macrolides+tetracyclines, beta-lactams+tetracyclines+sulfonamides and beta-lactams+lincosamides+macrolides+ tetracyclines+sulfonamides.

In the CoPS group ($n = 26$), there were 8 (30.8%) isolates susceptible to all tested antimicrobials and 18 (69.2%) resistant from one to nine drugs (mean=2.6 and median=1.5). In a comparative analysis between the three CoPS species, SIG *S. pseudintermedius* was the most frequent ($n = 20$; 77%), including 6 isolates with susceptibility to all antimicrobials and 14 with resistance from one to nine drugs (mean=3.1; median=2.5). Also, this species had nine MDR isolates and four MRS, while *S. schleiferi* showed one MDR isolate. *S. aureus* did not present MDR and MRS profiles (Figure 5a).

In the CoNS group ($n = 42$), susceptibility testing analysis demonstrated that the isolates showed resistance between none ($n = 9$) and 12 ($n = 1$) antimicrobials (mean=2.8 and median=2.5) and 25 (59.5%) isolates were resistant to PEN and 23 (54.8%) isolates were resistant to OXA. Resistance to the other antimicrobials tested was less than 27%. In a comparative analysis between the eight CoNS species, *S. equorum* was the most frequent 12 (28.6%), with resistance ranging from three ($n = 2$) to 12 ($n = 1$) of the sixteen antimicrobials tested (mean=5.4; median=4.5), and PEN, OXA and AZM presenting a higher frequency resistance (83.3%, 75% and 75%, respectively). Followed by *S. sciuri* eight (19%), with resistance ranging from one ($n = 1$) to six ($n = 1$) antimicrobials (mean=2.6; median=2), OXA and PEN presented a higher frequency of resistance (100% and 75%, respectively). After *S. felis* seven (16.7%), with resistance ranging from none ($n = 3$) to four ($n = 2$) antimicrobials (mean=1.4; median=1), none showing high frequency. Four *S. simulans* (9.5%) with resistance ranging from none ($n = 2$) to three ($n = 1$) antimicrobials (mean=1; median=1), none showing high frequency. Finally, seven *Staphylococcus* spp. (16.7%), with resistance ranging from none ($n = 4$) to two ($n = 2$) antimicrobials (mean=0.7; median=0), none showing high frequency (Figure 5b).

S. equorum showed nine (75%) of isolates with MDR profile and four (33.3%) MRS, *S. sciuri* showed two (25%) of isolates with MDR profile and two (25%) MRS, *S. felis* showed one (14.3%) of isolates with MDR profile and one (14.3%) MRS, *S. simulans* showed one (25%) of isolates with MRS profile and none MDR (Figure 5b).

Figure 5. Susceptibility test result profile of the 26 CoPS (coagulase-positive staphylococci) [5a] and 42 CoNS (coagulase-negative staphylococci) [5b] in comparison to *Staphylococcus* species. Green, yellow and red squares mean susceptibility, intermediate resistance and resistance, respectively. Black squares means MDR (Multidrug-resistance) and MRS (methicillin-resistant *Staphylococcus*). Antimicrobials abbreviations: PEN = penicillin; OXA = oxacillin; CFX = cefoxitin; AZM = azithromycin; ERY = erythromycin; RIF = rifampin; GEN = gentamycin; CHL = chloramphenicol; CIP = ciprofloxacin; ORB = orbifloxacin; DOX = doxycycline; TET = tetracycline; SUT = sulfazotrim; DA = clindamycin; NFT = nitrofurantoin; LZD = linezolid; NA = Not applicable.

4. Discussion

The animal skin microbiota comprises a diverse range of microorganisms inhabiting this tissue. This microbial community plays a crucial role in skin health, acting as a protective barrier and influencing the animal's immune response. The microbiota composition of each animal species and even of individual animals is influenced by several factors, such as diet, animal's habits, climate, environment, among others [35,36]. In the veterinary medicine of companion animals, previous studies have already been carried out to characterize the microbial populations of skin microbiota, contributing to a better understanding of situations of normality (health) and imbalance, which can result in infections by pathogenic or even opportunistic microorganisms [37].

In the present study, eleven different *Staphylococcus* spp. were found in the skin of apparently healthy dogs and cats, predominantly isolated in the skin of the evaluated animals. Other *Staphylococcus* spp. are probably present there, since some bacteria of this genus could not be identified by the MALDI-ToF method at the species level. The number of *Staphylococcus* spp. or even other similar bacteria present in the skin of these animals' microbiotas is probably even higher as reported in other studies in healthy and diseased animals worldwide [37-39]. In Brazil, previous studies detected eight species in dogs, including *S. pseudintermedius*, *S. delphini*, *S. schleiferi*, *S. aureus*, *S. capitis*, *S. epidermidis*, *S. warneri* and *S. simulans*, identified in the skin and also other tissues (ear, urogenital tract, surgical wounds, etc.) [28, 40]. Noteworthy, *S. pseudintermedius* was the most prevalent staphylococci here detected, with 20 isolates (29.4%), including 18 from dogs. A similar result was observed in a previous study, which isolated *Staphylococcus* from rectal and axillary samples [41]. Other studies highlighted *S. pseudintermedius* as a pathogenic bacterium in pets and also detected it in humans [42].

Staphylococcus spp. is frequently considered a concerning bacterial genera on the skin of healthy dogs and cats. However, commensal and pathogenic *Staphylococcus* species have already been demonstrated to be present in this tissue of healthy animals [43-46]. In dogs, they are associated with pyoderma, otitis externa and media, cystitis, and other systemic and respiratory infections [20,47]. Notably, three species (*S. pseudintermedius*, *S. aureus*, and *S. schleiferi*) have been more commonly associated with prosthetic infections, wound infections, postsurgical infections, bacteremia, and endocarditis, also in humans [48]. The occurrence of these bacteria has also been a concern in veterinary care settings, as they can cause nosocomial infections. A previous study identified 10 *Staphylococcus* spp. (*S. pseudintermedius*, *S. haemolyticus*, *S. epidermidis*, *S. schleiferi*, *S. capitis*, *S. sciuri*, *S. warneri*, *S. lutrae*, *S. xylosus*, and *S. hominis*) in different sampling sites (superficial surgical site, surgical site infection, surgeon, and environment) in an operating room. *S. pseudintermedius* was more frequently found in surgical sites, whereas CoNS were predominant in samples from surgeons and the environment [32].

In an attempt to separate pathogenic and commensal *Staphylococcus* spp., the coagulase test has been routinely performed in the laboratory. CoPS have been considered the most concerning bacteria for animal health. However, there are some isolates with confusing coagulation profiles, such as *S. schleiferi* [20]. In this study, the two isolates from this species tested positive for the coagulase test, which

can be interpreted as *S. schleiferi* subsp. *coagulans*. The other subspecies, *S. schleiferi* subsp. *schleiferi*, can result positive in the slide (agglutination factor) but tests negative in the tube coagulase test [49]. Both subspecies are important pathogens for dogs [50].

CoNS are also long regarded as harmless colonizers; however, their involvement in infections and their potential to cause serious conditions such as endocarditis and sepsis were already recognized [51]. Among the eight CoNS species identified in this study, *S. equorum* and *S. felis* were the most prevalent, both mostly isolated from cats. These species were also reported in other studies that detected an even higher number of species, such as *S. warneri*, *S. succinus*, *S. capitis*, *S. hominis*, *S. cohnii*, *S. vitulinus*, *S. arlettae*, *S. pettenkoferi*, *S. fleurettii*, *S. nepalensis*, *S. lentus*, *S. lutetiensis*, and *S. muscae* [10,52]. In Brazil, a previous study with dogs admitted to hospitals demonstrated six CoNS species: *S. haemolyticus*, *S. felis*, *S. epidermidis*, *S. simulans*, *S. saprophyticus*, *S. equorum*, *S. hominis* and *S. devriesei* [41]. These studies highlight the considerable diversity of *Staphylococcus* spp. with different metabolic characteristics (such as coagulase and catalase) present in the microbiota of companion animals.

In studies evaluating the microbiota of healthy animals, *S. felis* was predominantly isolated from cats, along with other species such as *S. epidermidis*, *S. simulans*, and *S. haemolyticus* [10,38]. Additionally, *S. haemolyticus*, *S. xylosus*, *S. capitis*, *S. gallinarum*, *S. lentus*, *S. equorum* were detected in feline samples [10]. The same occurs with *S. equorum* isolated predominantly from felines, but also in canines [10,41]. *S. sciuri*, *S. simulans*, and *S. haemolyticus* have been isolated from dogs, and are part of the cutaneous, nasal, and oral microbiota of healthy dogs [53]. They are also known to be causative agents of infections [54]. *S. chromogenes*, *S. intermedius* and *S. xylosus* have been isolated only from canines, and *S. saprophyticus* has been isolated only from felines. Similar findings were reported in a previous study [11].

It is noteworthy that other non-*Staphylococcus* Gram-positive bacteria (n = 10) were identified by MALDI-ToF here. Six isolates could be properly classified as bacteria already detected in the microbiota of companion animals: *Aerococcus viridans* has been isolated from the oral cavity of stray dogs and cats; *Enterococcus* spp. is commonly isolated from dog skin [55–57]; *Macrococcus caseolyticus* and other *Macrococcus* species are also found in the skin microbiota of canines and felines [58]; and *Rothia nasimurium* is also a commensal microorganism in dogs. The other 4 isolates did not present valid identification results. This misidentification of other bacteria as *Staphylococcus* spp. emphasizes the need for improved bacterial species identification techniques. Traditional methods based on macroscopic colony evaluation, morphology, staining, and basic biochemical tests have been widely used in routine laboratories and are likely reporting erroneous laboratory results for Gram-positive bacteria. In addition, a high diversity of enzymatic activities among *Staphylococcus* (highlighting catalase and coagulase profiles) can further complicate the correct identification of the bacterial genus / species [59,60]. Most veterinary laboratories still rely on classical methods for the identification and classification of bacteria, such as morphological analysis, staining techniques, and biochemical testing. The growing use of modern techniques, as MALDI-ToF, will certainly improve bacterial identification in veterinary medicine routine [61,62].

Regarding AMR, patterns varied considerably within both CoPS and CoNS, with 65.4% of CoPS isolates showing resistance to PEN, while resistance to other antimicrobials remained below 31%. *S. pseudintermedius* was the most concerning CoPS species, with 45% (9/20) isolates with MDR, while *S. aureus* did not present MDR. Reports of *S. pseudintermedius* isolated from dogs and cats also demonstrated high MDR rates (63.3 to 89.2%) [28,45]. Although *S. aureus* is often cited as an important and resistant pathogen in human infections [63], dogs and cats are not typically colonized by this species. Instead, they may form transient associations with strains acquired from their owners, which can lead to opportunistic infections [39,64].

CoPS isolates are historically associated with pathogenic potential and clinical relevance, making their identification and characterization essential [65].

Among them, *S. pseudintermedius* and *S. schleiferi* can exhibit methicillin resistance through the production of another penicillin-binding protein (PBP2a), similarly to methicillin-resistant *S. aureus* (MRSA). Interestingly, only four (15.4%) CoPS isolates here were MRS, a notably lower rate compared to previous reports [20, 66]. These differences may reflect variations in sampling sources, geographic distribution, and antimicrobial usage practices across animal populations. In addition, CoNS are also resistant to different antimicrobials (highlighting methicillin), acting as reservoirs of AMR [50]. In this study, *S. equorum* strains exhibited the most concerning profile, with 75% classified as MDR and 33.3% as MRS. Similar patterns have been reported elsewhere [56, 67]. These findings highlight the increasing concern over CoNS as opportunistic pathogens due to their growing resistance and potential for horizontal gene transfer [52]. However, it is important to highlight that intrinsic variations may have occurred in the disk diffusion test for the isolates tested here, due to a resistance that is inherent to the microorganism or to a specific biological or genetic characteristic that may be difficult to detect using the traditional disk diffusion method.

Finally, this study brings scientific insights into the diversity of staphylococci in domestic animals, reinforcing the existence of several species specific to the two domestic animal species studied (dogs and cats). It also presents important antimicrobial resistance data for managing infections in these animals and even their owners. However, it is necessary to highlight some important limitations. First, a limited number of isolates were sampled from clinically healthy animals, which may not reflect the full spectrum of *Staphylococcus* spp. diversity and resistance profiles in diseased dogs and cats. Furthermore, it was a pilot study using convenience sampling, without statistical calculation of the number of samples needed for a more definitive estimate of the frequency of bacterial species or even more definitive information about AMR in these bacteria. More detailed analyses of AMR with minimum inhibitory concentrations and using more up-to-date resistance data, such as those recently published for fluoroquinolones and chloramphenicol, should be the focus of future, more robust studies. Also in-depth genetic analyses, such as whole-genome sequencing (WGS), were also not performed, which could provide insights into the genetic relatedness, virulence factors, presence of genes for AMR, and sequence types of the isolates. Future studies should include broader sampling and genetic analyses to better characterize the strains and understand their epidemiological and clinical significance.

5. Conclusions

Eleven different *Staphylococcus* species were detected by MALDI-ToF in the microbiota of healthy dogs and cats from southern Brazil. Assertive identification of *Staphylococcus* spp. in animals is necessary to understand the epidemiology of this potentially pathogen and to detect more concerning species, as *S. pseudintermedius* and *S. aureus*. Furthermore, the study demonstrated isolates with high AMR, including resistance to methicillin and an MDR profile. AMR assessment studies are needed to help in the control and treatment of staphylococcal infections and prevent the spread of these bacteria in veterinary clinical settings and in the community within a One Health context.

Funding: This research project was supported by Universidade de Caxias do Sul (UCS). L.d.S. was financed in part by the Coordination for the Improvement of Higher Education Personnel (CAPES—Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior—Brasil—Finance Code 001. D.K. and V.R.L. were financially supported by the National Council for Scientific and Technological Development from Brazil (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico [CNPq]; process numbers 350153/2025-6 and 303647/2023-0).

Conflicts of Interest: The authors declare no conflicts of interest.

Ethics approval: The study was approved by the Ethics Committee on the Use of Animals (CEUA) of the University of Caxias do Sul (UCS) under the number 21/2018.

Supplementary Material: Table S1 - MALDI-TOF results of the 78 isolates showing the top 10 matches.

References

1. Wolska-Gębarzewska, M.; Międzobrodzki, J.; Kosecka-Strojek, M. Current types of staphylococcal cassette chromosome mec (SCCmec) in clinically relevant coagulase-negative staphylococcal (CoNS) species. *Crit Rev Microbiol* **2024**, *50*, 1020-1036. doi: 10.1080/1040841X.2023.2274841.
2. Parte, A.C.; Sardà Carbasse, J.; Meier-Kolthoff, J.P.; Reimer, L.C.; Göker, M. List of Prokaryotic names with Standing in Nomenclature (LPSN) moves to the DSMZ. *Int J Syst Evol Microbiol* **2020**, *70*, 5607-5612. doi: 10.1099/ijsem.0.004332.
3. Loof, T.G.; Goldmann, O.; Naudin, C.; Mörgelin, M.; Neumann, Y.; Pils, M.C.; Foster, S.J.; Medina, E.; Herwald, H. Staphylococcus aureus-induced clotting of plasma is an immune evasion mechanism for persistence within the fibrin network. *Microbiology* **2015**, *161*, 621-627. doi: 10.1099/mic.0.000019.
4. Platenik, M.O.; Archer, L.; Kher, L.; Santoro, D. Prevalence of mecA, mecC and Panton-Valentine-Leukocidin Genes in Clinical Isolates of Coagulase Positive Staphylococci from Dermatological Canine Patients. *Microorganisms* **2022**, *10*, 2239. doi: 10.3390/microorganisms10112239.
5. Sasaki, T.; Kikuchi, K.; Tanaka, Y.; Takahashi, N.; Kamata, S.; Hiramatsu, K. Reclassification of phenotypically identified staphylococcus intermedius strains. *J Clin Microbiol* **2007**, *45*, 2770-8. doi: 10.1128/JCM.00360-07.
6. Murray, A.K.; Lee, J.; Bendall, R.; Zhang, L.; Sunde, M.; Schau Slettemeås, J.; Gaze, W.; Page, A.J.; Vos, M. Staphylococcus cornubiensis sp. nov., a member of the Staphylococcus intermedius Group (SIG). *Int J Syst Evol Microbiol* **2018**, *68*, 3404-3408. doi: 10.1099/ijsem.0.002992.
7. Perreten, V.; Kania, S.A.; Bemis, D. Staphylococcus ursi sp. nov., a new member of the 'Staphylococcus intermedius group' isolated from healthy black bears. *Int J Syst Evol Microbiol* **2020**, *70*, 4637-4645. doi: 10.1099/ijsem.0.004324.
8. Carroll, K.C.; Burnham, C.D.; Westblade, L.F. From canines to humans: Clinical importance of Staphylococcus pseudintermedius. *PLoS Pathog* **2021**, *17*, e1009961. doi: 10.1371/journal.ppat.1009961.
9. Becker, K.; Both, A.; Weißelberg, S.; Heilmann, C.; Rohde, H. Emergence of coagulase-negative staphylococci. *Expert Rev Anti Infect Ther* **2020**, *18*, 349-366. doi: 10.1080/14787210.2020.1730813.
10. Ma, G.C.; Worthing, K.A.; Ward, M.P.; Norris, J.M. Commensal Staphylococci Including Methicillin-Resistant Staphylococcus aureus from Dogs and Cats in Remote New South Wales, Australia. *Microb Ecol* **2020**, *79*, 164-174. doi: 10.1007/s00248-019-01382-y.
11. Thomson, P.; García, P.; Miles, J.; Isla, D.; Yáñez, C.; Santibáñez, R.; Núñez, A.; Flores-Yáñez, C.; Del Río, C.; Cuadra, F. Isolation and Identification of Staphylococcus Species Obtained from Healthy Companion Animals and Humans. *Vet Sci* **2022**, *9*, 79. doi: 10.3390/vetsci9020079.
12. Miszczak, M.; Korzeniowska-Kowal, A.; Wzorek, A.; Gamian, A.; Rypuła, K.; Bierowiec, K. Colonization of methicillin-resistant Staphylococcus species in healthy and sick pets: prevalence and risk factors. *BMC Vet Res* **2023**, *19*, 85. doi: 10.1186/s12917-023-03640-1.
13. Nocera, F.P.; De Martino, L. Methicillin-resistant Staphylococcus pseudintermedius: epidemiological changes, antibiotic resistance, and alternative therapeutic strategies. *Vet Res Commun* **2024**, *48*, 3505-3515. doi: 10.1007/s11259-024-10508-8.
14. Moon, D.C.; Choi, J.H.; Boby, N.; Kim, S.J.; Song, H.J.; Park, H.S.; Gil, M.C.; Yoon, S.S.; Lim, S.K. Prevalence of Bacterial Species in Skin, Urine, Diarrheal Stool, and Respiratory Samples in Cats. *Pathogens* **2022**, *11*, 324. doi: 10.3390/pathogens11030324.
15. Sips, G.J.; van Dijk, M.A.M.; van Westreenen, M.; van der Graaf-van Bloois, L.; Duim, B.; Broens, E.M. Evidence of cat-to-human transmission of Staphylococcus felis. *J Med Microbiol* **2023**, *72*. doi: 10.1099/jmm.0.001661.
16. Ebani, V.V. Staphylococci, Reptiles, Amphibians, and Humans: What Are Their Relations? *Pathogens* **2024**, *13*, 607. doi: 10.3390/pathogens13070607.
17. Otto, M. Staphylococci in the human microbiome: the role of host and interbacterial interactions. *Curr Opin Microbiol* **2020**, *53*, 71-77. doi: 10.1016/j.mib.2020.03.003.
18. Bellis, K.L.; Dissanayake, O.M.; Harrison, E.M.; Aggarwal, D. Community methicillin-resistant Staphylococcus aureus outbreaks in areas of low prevalence. *Clin Microbiol Infect* **2025**, *31*, 182-189. doi: 10.1016/j.cmi.2024.06.006.
19. Ruiz-Ripa, L.; Simón, C.; Ceballos, S.; Ortega, C.; Zarazaga, M.; Torres, C.; Gómez-Sanz, E. S. pseudintermedius and S. aureus lineages with transmission ability circulate as causative agents of infections in pets for years. *BMC Vet Res* **2021**, *17*, 42. doi: 10.1186/s12917-020-02726-4.
20. Kunder, D.A.; Cain, C.L.; O'Shea, K.; Cole, S.D.; Rankin, S.C. Genotypic relatedness and antimicrobial resistance of Staphylococcus schleiferi in clinical samples from dogs in different geographic regions of the United States. *Vet Dermatol* **2015**, *26*, 406-10, e94. doi: 10.1111/vde.12254.
21. Nocera, F.P.; Meroni, G.; Fiorito, F.; De Martino, L.; Martino, P.A. Occurrence and antimicrobial susceptibility patterns of canine Staphylococcus pseudintermedius strains isolated from two different Italian university veterinary hospitals. *Vet Ital* **2020**, *56*, 263-269. doi: 10.12834/VetIt.2195.12897.1.
22. Breyer, G.M.; Saggin, B.F.; de Carli, S.; da Silva, M.E.R.J.; da Costa, M.M.; Brenig, B.; Azevedo, V.A.C.; Cardoso, M.R.I.; Siqueira, F.M. Virulent potential of methicillin-resistant and methicillin-susceptible Staphylococcus pseudintermedius in dogs. *Acta Trop* **2023**, *242*, 106911. doi: 10.1016/j.actatropica.2023.106911.

23. Caneschi, A.; Bardhi, A.; Barbarossa, A.; Zaghini, A. The Use of Antibiotics and Antimicrobial Resistance in Veterinary Medicine, a Complex Phenomenon: A Narrative Review. *Antibiotics* **2023**, *12*, 487. doi: 10.3390/antibiotics12030487.
24. Loeffler, A.; Lloyd, D.H. What has changed in canine pyoderma? A narrative review. *Vet J* **2018**, *235*, 73-82. doi: 10.1016/j.tvjl.2018.04.002.
25. Lee, A.S.; de Lencastre, H.; Garau, J.; Kluytmans, J.; Malhotra-Kumar, S.; Peschel, A.; Harbarth, S. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Nat Rev Dis Primers* **2018**, *4*, 18033. doi: 10.1038/nrdp.2018.33.
26. de Carvalho, S.P.; de Almeida, J.B.; Andrade, Y.M.F.S.; Silva, L.S.C.D.; Chamon, R.C.; Santos, K.R.N.D.; Marques, L.M. Molecular characteristics of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates from hospital and community environments in northeastern Brazil. *Braz J Infect Dis* **2019**, *23*, 134-138. doi: 10.1016/j.bjid.2019.04.005.
27. Lynch, S.A.; Helbig, K.J. The Complex Diseases of *Staphylococcus pseudintermedius* in Canines: Where to Next? *Vet Sci* **2021**, *8*, 11. doi: 10.3390/vetsci8010011.
28. Viegas, F.M.; Santana, J.A.; Silva, B.A.; Xavier, R.G.C.; Bonisson, C.T.; Câmara, J.L.S.; Rennó, M.C.; Cunha, J.L.R.; Figueiredo, H.C.P.; Lobato, F.C.F.; Silva, R.O.S. Occurrence and characterization of methicillin-resistant *Staphylococcus* spp. in diseased dogs in Brazil. *PLoS One* **2022**, *17*, e0269422. doi: 10.1371/journal.pone.0269422.
29. Teixeira, I.M.; de Moraes Assumpção, Y.; Paletta, A.C.C.; Aguiar, L.; Guimarães, L.; da Silva, I.T.; Côrtes, M.F.; Botelho, A.M.N.; Jaeger, L.H.; Ferreira, R.F.; de Oliveira Ferreira, E.; Penna, B. Investigation of antimicrobial susceptibility and genetic diversity among *Staphylococcus pseudintermedius* isolated from dogs in Rio de Janeiro. *Sci Rep* **2023**, *13*, 20219. doi: 10.1038/s41598-023-47549-z.
30. Souza, T.G.V.; Santana, J.A.; Claudino, M.M.S.; Pereira, S.T.; Xavier, R.G.C.; do Amarante, V.S.; de Castro, Y.G.; Dorneles, E.M.S.; Aburjaile, F.F.; de Carvalho, V.A.; Brenig, B.; Silva, R.O.S. Occurrence, genetic diversity, and antimicrobial resistance of methicillin-resistant *Staphylococcus* spp. in hospitalized and non-hospitalized cats in Brazil. *PLoS One* **2024**, *19*, e0309711. doi: 10.1371/journal.pone.0309711.
31. Kim, S.H.; Chon, J.W.; Jeong, H.W.; Song, K.Y.; Kim, D.H.; Bae, D.; Kim, H.; Seo, K.H. Identification and phylogenetic analysis of *Enterococcus* isolates using MALDI-TOF MS and VITEK 2. *AMB Express* **2023**, *13*, 21. doi: 10.1186/s13568-023-01525-y.
32. Possa de Menezes, M.; Vedovelli Cardozo, M.; Pereira, N.; Bugov, M.; Verbisck, N.V.; Castro, V.; Figueiredo de Castro Nassar, A.; Castro Moraes, P. Genotypic profile of *Staphylococcus* spp., *Enterococcus* spp., and *E. coli* colonizing dogs, surgeons, and environment during the intraoperative period: a cross-sectional study in a veterinary teaching hospital in Brazil. *BMC Vet Res* **2025**, *21*, 147. doi: 10.1186/s12917-025-04611-4.
33. Magiorakos, A.P.; Srinivasan, A.; Carey, R.B.; Carmeli, Y.; Falagas, M.E.; Giske, C.G.; Harbarth, S.; Hindler, J.F.; Kahlmeter, G.; Olsson-Liljequist, B.; Paterson, D.L.; Rice, L.B.; Stelling, J.; Struelens, M.J.; Vatopoulos, A.; Weber, J.T.; Monnet, D.L. Multidrug-resistant, extensively drug-resistant and pandrug-resistant bacteria: an international expert proposal for interim standard definitions for acquired resistance. *Clin Microbiol Infect* **2012**, *18*, 268-81. doi: 10.1111/j.1469-0691.2011.03570.x.
34. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). 2019. *Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing*, 29th ed. Clinical and Laboratory Standards Institute: Philadelphia, PA, USA.
35. Grice, E.A.; Segre, J.A. The skin microbiome. *Nat Rev Microbiol* **2011**, *9*, 244-53. doi: 10.1038/nrmicro2537. Erratum in: *Nat Rev Microbiol*. 2011 Aug;9(8):626.
36. Cosseau, C.; Romano-Bertrand, S.; Duplan, H.; Lucas, O.; Ingrassia, I.; Pigasse, C.; Roques, C.; Jumas-Bilak, E. Proteobacteria from the human skin microbiota: Species-level diversity and hypotheses. *One Health* **2016**, *2*, 33-41. doi: 10.1016/j.onehlt.2016.02.002.
37. Banks, K.C.; Giuliano, E.A.; Busi, S.B.; Reinero, C.R.; Ericsson, A.C. Evaluation of Healthy Canine Conjunctival, Periocular Haired Skin, and Nasal Microbiota Compared to Conjunctival Culture. *Front Vet Sci* **2020**, *7*, 558. doi: 10.3389/fvets.2020.00558.
38. Bierowiec, K.; Korzeniowska-Kowal, A.; Wzorek, A.; Rypuła, K.; Gamian, A. Prevalence of *Staphylococcus* Species Colonization in Healthy and Sick Cats. *Biomed Res Int* **2019**, *2019*, 4360525. doi: 10.1155/2019/4360525.
39. Afshar, M.F.; Zakaria, Z.; Cheng, C.H.; Ahmad, N.I. Prevalence and multidrug-resistant profile of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and methicillin-resistant *Staphylococcus pseudintermedius* in dogs, cats, and pet owners in Malaysia. *Vet World* **2023**, *16*, 536-545. doi: 10.14202/vetworld.2023.536-545.
40. González-Domínguez, M.S.; Carvajal, H.D.; Calle-Echeverri, D.A.; Chinchilla-Cárdenas, D. 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. *Front Vet Sci* **2020**, *7*, 376. doi: 10.3389/fvets.2020.00376.
41. Santana, J.A.; Paraguassu, A.O.; Santana, R.S.T.; Xavier, R.G.C.; Freitas, P.M.C.; Aburjaile, F.F.; Azevedo, V.A.C.; Brenig, B.; Bojesen, A.M.; Silva, R.O.S. Risk Factors, Genetic Diversity, and Antimicrobial Resistance of *Staphylococcus* spp. Isolates in Dogs Admitted to an Intensive Care Unit of a Veterinary Hospital. *Antibiotics* **2023**, *12*, 621. doi: 10.3390/antibiotics12030621.
42. Guimarães, L.; Teixeira, I.M.; da Silva, I.T.; Antunes, M.; Pesset, C.; Fonseca, C.; Santos, A.L.; Côrtes, M.F.; Penna, B. Epidemiologic case investigation on the zoonotic transmission of Methicillin-resistant *Staphylococcus pseudintermedius* among dogs and their owners. *J Infect Public Health* **2023**, *1*, 183-189. doi: 10.1016/j.jiph.2023.10.041.

43. Horsman, S.; Meler, E.; Mikkelsen, D.; Mallyon, J.; Yao, H.; Magalhães, R.J.S.; Gibson, J.S. Nasal microbiota profiles in shelter dogs with dermatological conditions carrying methicillin-resistant and methicillin-sensitive *Staphylococcus* species. *Sci Rep* **2023**, *13*, 4844. doi: 10.1038/s41598-023-31385-2.
44. Abdullahi, I.N.; Zarazaga, M.; Campaña-Burguet, A.; Eguizábal, P.; Lozano, C.; Torres, C. 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. *J Appl Microbiol* **2022**, *133*, 3368-3390. doi: 10.1111/jam.15803.
45. Rana, E.A.; Nizami, T.A.; Islam, M.S.; Sarker, S.; Rahman, H.; Hoque, A.; Rahman, M. Antimicrobial resistance and virulence profiling of *Staphylococcus pseudintermedius* isolated from cats, Bangladesh. *Vet Q* **2024**, *44*, 1-11. doi: 10.1080/01652176.2024.2326848.
46. Bromfield, J.I.; Zaugg, J.; Straw, R.C.; Cathie, J.; Krueger, A.; Sinha, D.; Chandra, J.; Hugenholtz, P.; Frazer, I.H. Characterization of the skin microbiome in normal and cutaneous squamous cell carcinoma affected cats and dogs. *mSphere* **2024**, *9*, e0055523. doi: 10.1128/msphere.00555-23.
47. Penna, B.; Varges, R.; Martins, G.M.; Martins, R.R.; Lilenbaum, W. In vitro antimicrobial susceptibility of staphylococci isolated from canine pyoderma in Rio de Janeiro, Brazil. *Braz J Microbiol* **2009**, *40*, 490-494. doi: 10.1590/S1517-838220090003000011.
48. Sewid, A.H.; Kania, A.S. Distinguishing characteristics of *Staphylococcus schleiferi* and *Staphylococcus coagulans* of human and canine origin. *PLoS One* **2024**, *19*, e0296850. doi: 10.1371/journal.pone.0296850.
49. Lainhart, W.; Yarbrough, M.L.; Burnham, C.A. The Brief Case: *Staphylococcus intermedius* Group—Look What the Dog Dragged In. *J Clin Microbiol* **2018**, *56*, e00839-17. doi: 10.1128/JCM.00839-17.
50. Cain, C.L.; Morris, D.O.; O'Shea, K.; Rankin, S.C. Genotypic relatedness and phenotypic characterization of *Staphylococcus schleiferi* subspecies in clinical samples from dogs. *Am J Vet Res* **2011**, *72*, 96-102. doi: 10.2460/ajvr.72.1.96.
51. Štempelová, L.; Kubašová, I.; Bujňáková, D.; Kačírová, J.; Farbáková, J.; Maďar, M.; Karahutová, L.; Strompřová, V. Distribution and Characterization of *Staphylococci* Isolated From Healthy Canine Skin. *Top Companion Anim Med* **2022**, *49*, 100665. doi: 10.1016/j.tcam.2022.100665.
52. Schmidt, V.M.; Williams, N.J.; Pinchbeck, G.; Corless, C.E.; Shaw, S.; McEwan, N.; Dawson, S.; Nuttall, T. Antimicrobial resistance and characterisation of staphylococci isolated from healthy Labrador retrievers in the United Kingdom. *BMC Vet Res* **2014**, *10*, 17. doi: 10.1186/1746-6148-10-17.
53. Stepanović, S.; Dimitrijević, V.; Vuković, D.; Dakić, I.; Savić, B.; Svabic-Vlahović, M. *Staphylococcus sciuri* as a part of skin, nasal and oral flora in healthy dogs. *Vet Microbiol* **2001**, *82*, 177-85. doi: 10.1016/s0378-1135(01)00377-7.
54. Chah, K.F.; Gómez-Sanz, E.; Nwanta, J.A.; Asadu, B.; Agbo, I.C.; Lozano, C.; Zarazaga, M.; Torres, C. Methicillin-resistant coagulase-negative staphylococci from healthy dogs in Nsukka, Nigeria. *Braz J Microbiol* **2014**, *45*, 215-20. doi: 10.1590/S1517-83822014005000034.
55. García-Fonticoba, R.; Ferrer, L.; Francino, O.; Cuscó, A. The microbiota of the surface, dermis and subcutaneous tissue of dog skin. *Anim Microbiome* **2020**, *2*, 34. doi: 10.1186/s42523-020-00050-8.
56. Razali, K.; Nalbone, L.; Giarratana, F. *Aerococcus viridans* and Public Health: Oral Carriage and Antimicrobial Resistance in Stray Dogs and Cats in Algeria. *Microb Drug Resist* **2023**, *29*, 576-581. doi: 10.1089/mdr.2022.0165.
57. Silva, L.; Grecellé, C.Z.; Frazzon, A.P.G.; Streck, A.F.; Kipper, D.; Fonseca, A.S.K.; Ikuta, N.; Lunge, V.R. Multidrug-Resistant *Enterococcus faecium* and *Enterococcus faecalis* Isolated from Dogs and Cats in Southern Brazil. *Microbiol Res* **2024**, *15*, 1083-1090. doi.org/10.3390/microbiolres15030071.
58. Gobeli Brawand, S.; Cotting, K.; Gómez-Sanz, E.; Collaud, A.; Thomann, A.; Brodard, I.; Rodriguez-Campos, S.; Strauss, C.; Perreten, V. *Macrococcus canis* sp. nov., a skin bacterium associated with infections in dogs. *Int J Syst Evol Microbiol* **2027**, *67*, 621-626. doi: 10.1099/ijsem.0.001673.
59. Bemis, D.A.; Bryant, M.J.; Reed, P.P.; Brahmhatt, R.A.; Kania, S.A. Synergistic hemolysis between β -lysin-producing *Staphylococcus* species and *Rothia nasimurium* in primary cultures of clinical specimens obtained from dogs. *J Vet Diagn Invest* **2014**, *26*, 437-441. doi: 10.1177/1040638714532098.
60. Fatahi-Bafghi, M. Characterization of the *Rothia* spp. and their role in human clinical infections. *Infect Genet Evol* **2021**, *93*, 104877. doi: 10.1016/j.meegid.2021.104877.
61. Croxatto, A.; Prod'homme, G.; Greub, G. Applications of MALDI-TOF mass spectrometry in clinical diagnostic microbiology. *FEMS Microbiol Ver* **2012**, *36*, 380-407. doi: 10.1111/j.1574-6976.2011.00298.x.
62. Guimarães, M.L.; Júnior, M.A.B.; de Almeida, V.M.; Pereira, W.V.S. MALDI-TOF as a tool for microbiological monitoring in areas considered aseptic. *Braz J Microbiol* **2023**, *54*, 761-768. doi: 10.1007/s42770-023-00987-3.
63. Antonello, R.M.; Riccardi, N. How we deal with *Staphylococcus aureus* (MSSA, MRSA) central nervous system infections. *Front Biosci* **2022**, *14*, 1. doi: 10.31083/j.fbs1401001.
64. Haag, A.F.; Fitzgerald, J.R.; Penadés, J.R. *Staphylococcus aureus* in Animals. *Microbiol Spectr* **2019**, *7*, 10.1128/microbiolspec.gpp3-0060-2019. doi: 10.1128/microbiolspec.GPP3-0060-2019.
65. Pickering, A.C.; Yebra, G.; Gong, X.; Goncheva, M.I.; Wee, B.A.; MacFadyen, A.C.; Muehlbauer, L.F.; Alves, J.; Cartwright, R.A.; Paterson, G.K.; Fitzgerald, J.R. Evolutionary and Functional Analysis of Coagulase Positivity among the *Staphylococci*. *mSphere* **2021**, *6*, e0038121. doi: 10.1128/mSphere.00381-21.
66. Santos, I.C.; Barbosa, L.N.; da Silva, G.R.; Otutumi, L.K.; Zaniolo, M.M.; Dos Santos, M.C.; de Paula Ferreira, L.R.; Gonçalves, D.D.; de Almeida Martins, L. Pet dogs as reservoir of oxacillin and vancomycin-resistant *Staphylococcus* spp. *Res Vet Sci* **2022**, *143*, 28-32. doi: 10.1016/j.rvsc.2021.12.005.

67. Khanal, M.; Joshi, P.R.; Paudel, S.; Acharya, M.; Rijal, K.R.; Ghimire, P.; Banjara, M.R. Methicillin-Resistant Coagulase Negative Staphylococci and Their Antibiotic Susceptibility Pattern from Healthy Dogs and Their Owners from Kathmandu Valley. *Trop Med Infect Dis* **2021**, *6*, 194. doi: 10.3390/tropicalmed6040194.

5 DISCUSSÃO FINAL

Os gêneros bacterianos *Enterococcus* e *Staphylococcus* são amplamente estudados devido ao seu impacto significativo na saúde humana. Apesar de pertencerem a grupos distintos, ambos desempenham um papel crucial na microbiota normal de humanos e animais, assim como em infecções hospitalares apresentando elevada resistência (Hackmann *et al.*, 2024).

Uma compreensão mais aprofundada do surgimento e disseminação dos enterococos na interface humano-animal, de seu papel como comensais ubíquos capazes de se tornarem patógenos oportunistas, e do seu notório potencial de desenvolver e disseminar resistência antimicrobiana, corresponde a um modelo ideal dentro da abordagem de saúde única, reconhecendo a interligação entre saúde humana, animal e ambiental (Monteiro Marques *et al.*, 2023). De forma semelhante, os estafilococos, também considerados patógenos condicionais, apresentam importância crescente pelo seu papel na interface humano-animal e pelo desenvolvimento de resistência antimicrobiana, reforçando igualmente a necessidade de uma visão integrada da saúde de humanos, animais domésticos e selvagens, plantas e do meio ambiente (incluindo ecossistemas) como interdependentes (Cuny *et al.*, 2024).

Na medicina veterinária, especialmente em unidades hospitalares, ambos os gêneros consistem em preocupação quanto à disseminação, resistência antibacteriana e problemas de controle de infecção, assim como na comunidade, uma vez que cepas resistentes tem sido isoladas de pessoas e animais saudáveis (Bhat, 2021).

E. faecium e *E. faecalis* são classificadas como comensais do trato gastrointestinal de humanos e animais, mas podem se tornar patógenos oportunistas e causar infecções (Oliveira e Vaz, 2018). Portanto existe uma grande preocupação com estas duas espécies, principalmente com as cepas que apresentam perfil MDR. Estas bactérias têm sido isoladas até mesmo de amostras de animais sadios, de forma que cães, gatos e outros animais domésticos podem ser reservatórios de enterococos resistentes, inclusive para contaminação humana, por meio do contato direto com os tutores ou através de seus habitantes, além de poderem contribuir para a disseminação horizontal de genes de resistência entre cepas de animais e humanos. A disseminação desses patógenos é ainda mais favorecida em ambientes clínicos hospitalares, portanto é essencial compreender o papel de animais de companhia nesse processo, já que a maioria das pesquisas sobre essas bactérias patogênicas zoonóticas têm focado os animais de produção (Herrero *et al.*, 2004 e Jackson *et al.*, 2009).

No primeiro estudo da presente Tese, foram demonstradas as principais espécies de enterococos isoladas de animais domésticos doentes e o respectivo perfil de resistência a antibacterianos. Foram analisadas 58 amostras, selecionadas a partir de 232 isolados de *Enterococcus* sp., (10,4% das bactérias isoladas na rotina laboratorial, num período de 3 anos).

Foram detectadas 39 (67,2%) *E. faecium*, 17 (29,3%) *E. faecalis* e uma (1,7%) *E. avium*. O dado interessante é que foi observada uma maior frequência de *E. faecium*, que não era o mais frequentemente reportado em amostras veterinárias nos estudos anteriores. A identificação dos patógenos envolvidos nas infecções é crucial para maximizar as condutas clínicas, uma vez que o controle das infecções hospitalares ainda é realizado de forma empírica em muitos locais (Silva *et al.*, 2017).

Em relação ao perfil de resistência, 43 (75,4%) amostras demonstraram ser MDR. Estudos prévios também demonstram elevada frequência de *E. faecium* MDR (Magiorakos *et al.*, 2011; Chung *et al.*, 2013; Pillay, Zishiri e Adeleke, 2018). Na avaliação do perfil de resistência individual a cada droga testada, o presente estudo evidenciou resistência antimicrobiana a rifampicina (46, 80,7%), ampicilina e imipenem (41, 71,9%), tetraciclina (42, 73,7%), estreptomicina (42, 73,7%), eritromicina (39, 68; 4%), gentamicina (38, 66,7%), ciprofloxacina (36, 63,1%), norfloxacina (32, 56,1%), nitrofurantoína (10, 17,5%), cloranfenicol (9, 15,7%) e oxazolidinona (1, 1,7%). Estes resultados estão de acordo com diversos trabalhos, inclusive em humanos (Sun *et al.*, 2018). Com relação à vancomicina, nenhum dos isolados avaliados apresentou resistência. Esse resultado também foi observado em estudo prévio realizado em hospitais veterinários, provavelmente devido a vancomicina não ser uma droga usualmente aplicada na clínica de pequenos animais (Chung *et al.*, 2013). Em contraponto, houve divergência referente a gentamicina de alto nível, ue foi a droga mais eficaz contra os *Enterococcus* isolados de cães (95% eram sensíveis) em um estudo eslovaco (Kubašová; Strompfová; Lauková, 2017). O presente estudo evidenciou 66,7% de resistência nos isolados, ressaltando a importância de analisar esses patógenos conforme a região geográfica (Moehring *et al.*, 2015).

No segundo estudo da presente Tese, foram avaliados isolados de estafilococos obtidos de animais saudáveis, com o respetivo perfil de resistência a antibacterianos. Inicialmente, 117 amostras foram classificadas de forma presuntiva como pertencentes ao gênero *Staphylococcus* pela microbiologia clássica, das quais 78 foram confirmadas e selecionadas para análise detalhada. A identificação por MALDI-TOF revelou que 4 amostras permaneceram não identificadas, enquanto 6 correspondiam a cocos Gram-positivos de outros gêneros (*Aerococcus viridans*, *Enterococcus faecalis*, *Macrococcus spp.*, *Rothia nasimurium*). Entre os estafilococos, 8 foram classificados apenas ao nível de gênero (*Staphylococcus spp.*), e 60 foram identificados ao nível de espécie, distribuídos em 11 espécies distintas. As mais frequentes foram *S. pseudintermedius* (n=20; 25,6%), *S. equorum* (n=12; 15,4%), *S. sciuri* (n=8; 10,3%) e *S. felis*

(n=7; 9%). Em menor frequência, foram identificados *S. simulans* (n=4; 5,1%), *S. aureus* (n=3; 3,8%), *S. schleiferi* (n=2; 2,6%), *S. epidermidis* (n=1; 1,3%), *S. haemolyticus* (n=1; 1,3%), *S. saprophyticus* (n=1; 1,3%) e *S. xylosus* (n=1; 1,3%).

Os resultados obtidos com esta técnica apresentam elevada rapidez e avaliação da precisão. Este é o primeiro estudo realizado na região da Serra Gaúcha que informa sobre a diversidade de espécies de CoPS e CoNS presentes nas narinas, pele e anexos de cães e gatos saudáveis e que também relata o perfil de resistência obtida contra 16 antimicrobianos. Os dados evidenciados corroboram com estudos de caracterização da microbiota normal de pequenos animais. Entre os CoPS, destaca-se o predomínio de *S. pseudintermedius*, especialmente em caninos (Maet al, 2020; Guimaraes *et al.*, 2023), embora alguns estudos tenham demonstrado isolamento em felinos (Abdullahi *et al.*, 2022; Ahmed Rana *et al.*, 2024), ambos descrevendo a colonização e circulação desta espécie em animais saudáveis, assim como, em estudos com animais doentes, em casos de carcinoma (Bromfield *et al.*, 2024) e condições dermatológicas (Horsman *et al.*, 2023). O *S. pseudintermedius* por ser uma bactéria comensal da pele canina, torna-se também um patógeno oportunista chave, instigando um paradigma atual onde a infecção surge quando fatores predisponentes alteram a barreira cutânea saudável (Fabregas *et al.*, 2023).

Ainda entre os CoPS, o isolamento de *S. aureus* e *S. schleiferi* também foram relatados em outros trabalhos, compondo a microbiota normal de cães em proporções menores (González-Domingues *et al.*, 2020). Ambos são espécies comensais mais comumente relatadas em humanos (Sewid e Kania, 2024), associados a infecções protéticas, infecções de feridas, infecções pós-cirúrgicas, bacteremia e endocardite. Em cães estão associados a piodermite, otite externa e média, cistite e demais infecções sistêmicas e respiratórias (Kunder *et al.*, 2015).

Em relação ao padrão de resistência bacteriana, os isolados apresentaram uma ampla variedade tanto em CoPS, como em CoNS. No grupo CoPS, 17 (65,4%) dos isolados apresentaram resistência a penicilina, enquanto a resistência aos outros antimicrobianos testados foi menor que 20%. Entre as 3 espécies de CoPS identificadas, *S. pseudintermedius* evidenciou destaque em relação ao perfil MDR de 9 isolados (45%) e 4 isolados (20%) MRS, enquanto *S. schleiferi* foi avaliado somente 1 isolado (50%) MDR e MRS e *S. aureus*, não apresentou MDR. Um estudo com isolamento de *S. pseudintermedius* em felinos também demonstrou altas taxas de MDR (89,28%) (Ahmed Rana *et al.*, 2023), assim como 6,3,3% apresentaram MDR em cães (Viegaset al., 2022).

Staphylococcus aureus é amplamente reconhecido como um patógeno importante e resistente em infecções humanas (Antonelo e Riccardi, 2022). No entanto, cães e gatos não são normalmente colonizados por essa espécie; nesses animais, a presença de *S. aureus* tende a ocorrer de forma transitória, geralmente por meio do contato próximo com seus tutores, podendo resultar em infecções oportunistas (Haag, Fitzgerald, Penadès, 2019). Esse comportamento ajuda a

explicar tanto o baixo número de isolados encontrados quanto a elevada sensibilidade observada, achados que também foram relatados em outros estudos (Afsha *et al.*, 2023).

Em relação ao perfil de resistência de CoNS, destaca-se a alta resistência, marcada por cepas de *S. equorum* 75% dos isolados MDR e 33,3% MRS em animais saudáveis, animais que não tivessem tratamento antimicrobiano prévio ou admissão em instalações veterinárias, achados semelhantes de MDR-CoNS também foram encontrados em outros trabalhos, apontando cepas CoNS como preocupantes devido ao potencial de infecções oportunistas (Schmidt *et al.*, 2014).

Embora este estudo não tenha classificado *S. equorum* dentro de subespécies, *S. equorum* subsp. *equorum* foi originalmente isolado de cavalos saudáveis, e isolados posteriores foram obtidos do leite de uma vaca com mastite e de cabras saudáveis. Apenas algumas cepas de *S. equorum* subsp. *equorum* foram encontradas em materiais clínicos humanos relevantes (Novakova *et al.*, 2006).

Os resultados obtidos por Novakova e colaboradores (2006), indicam que isolados clínicos humanos de *S. equorum* podem ser erroneamente identificados como cepas de *S. xylosus* em análises laboratoriais clínicas de rotina, apontando que sua incidência pode não ser tão esporádica quanto se acreditava até recentemente. *S. equorum* também é comumente detectado em produtos naturalmente fermentados, como carnes e queijos, porém as propriedades de resistência a antimicrobianos dessa espécie têm sido pouco estudadas (Vasques *et al.*, 2023). Porém, Pedroso e colaboradores (2024) apontam *S. equorum* como pertencentes ao grupo de bactérias nocivas à tecnologia do leite (BHMT) juntamente com *S. aureus*. *S. equorum* também foi identificado como a espécie dominante em jeotgal, um marisco fermentado com alto teor de sal produzido na Coreia (Heo *et al.*, 2022) e isolado em instalações veterinárias com baixo perfil de resistência, na cidade de Porto Alegre, Brasil (Giacon *et al.*, 2021).

A identificação de *Aerococcus viridans*, *E. faecalis*, *Macrococcus* spp., *Rothia nasimurium* e quatro espécimes anteriormente classificados apenas como *Staphylococcus* demonstra a necessidade de implementar técnicas diagnósticas mais avançadas. Isso porque, pelos métodos clássicos, a avaliação macroscópica das colônias, associada às características morfológicas, tintoriais e bioquímicas, podem levar a classificações equivocadas. Muitos desses microrganismos compartilham características como serem cocos Gram-positivos, catalase-positivos (ou fracamente positivos) e apresentarem variações no padrão de hemólise em ágar sangue, além de resultados inconsistentes no teste de coagulase. Esses fatores dificultam a distinção confiável entre gêneros e espécies (Bermis *et al.*, 2014).

Os estudos realizados com *Enterococcus* e *Staphylococcus* em animais de companhia revelam a presença de diversas espécies com perfis de resistência antimicrobiana preocupantes, inclusive em animais saudáveis, que podem atuar como reservatórios silenciosos de genes de

resistência. Em *Enterococcus*, predominam *E. faecium* e *E. faecalis*, espécies frequentemente associadas à multirresistência e reconhecidas globalmente como integrantes do grupo ESKAPE, um conjunto de patógenos de alta relevância clínica caracterizados por sua capacidade de “escapar” dos efeitos dos antimicrobianos, incluindo *E. faecium*, *S. aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Enterobacter* spp. (Pendleton; Gorman; Gilmore, 2013; Marques, Santo & Costa, 2023). Entre os *Staphylococcus*, a diversidade de espécies identificadas, com destaque para *S. pseudintermedius*, *S. equorum* e *S. sciuri*, reforça a necessidade de monitoramento contínuo. No âmbito da Biotecnologia, esses achados sustentam o investimento em métodos moleculares rápidos, como PCR multiplex para genes *sodA* e *nuc*, que permitem identificação específica de espécies de importância clínica, reduzindo o tempo de resposta diagnóstica e aumentando a precisão frente à microbiologia clássica, além disso, torna-se evidente a relevância de novas tecnologias que permitam a determinação precisa já do gênero bacteriano, antes mesmo da definição da espécie, visto que a identificação presuntiva pela microbiologia clássica divergiu em alguns casos quando comparada aos resultados de MALDI-TOF (Pillay; Zishiri; Adeleke, 2018).

Esse cenário de multirresistência e de complexidade taxonômica ressalta ainda a urgência do desenvolvimento de novos antibacterianos ou terapias alternativas, incluindo peptídeos antimicrobianos, bacteriocinas e adjuvantes capazes de restaurar a eficácia de antimicrobianos já disponíveis. Nesse contexto, a incorporação de ferramentas moleculares e biotecnológicas não só fortalece o diagnóstico veterinário, como também contribui para o controle integrado da resistência antimicrobiana e monitoramento desses microrganismos em humanos, animais e ambiente, alinhando-se diretamente aos princípios de Saúde Única.

Esse monitoramento contínuo, além de permitir compreender sobre a circulação de cepas e o surgimento de perfis de resistência, permite a construção de antibiogramas acumulativos locais, essenciais para orientar terapias empíricas e reduzir o uso inadequado de antimicrobianos, possibilitando que hospitais veterinários fortaleçam abordagens alinhadas ao conceito de Saúde Única, reconhecendo que a circulação de microrganismos no ambiente hospitalar impacta não apenas animais, mas também profissionais e o ecossistema (Silva *et al.*, 2017).

A vigilância microbiológica contínua deve ser integrada a estratégias intersetoriais que envolvam saúde humana, saúde animal e saúde ambiental, reforçando ações educativas permanentes sobre biossegurança, higiene das mãos, uso adequado de EPIs e manejo correto de resíduos, considerando que microrganismos oportunistas podem persistir por longos períodos em superfícies e equipamentos hospitalares (Weese *et al.*, 2015).

6 CONCLUSÃO

- Os resultados obtidos revelam a prevalência de *Enterococcus faecium* e *Enterococcus faecalis* entre os isolados de *Enterococcus* spp. provenientes de amostras clínicas de cães e gatos, com destaque para o elevado perfil de resistência observado, especialmente na espécie *E. faecium*, não tendo sido detectadas cepas resistentes à vancomicina.
- Nos isolados de *Staphylococcus* spp. provenientes de cães e gatos saudáveis, a diversidade de espécies coagulase-positivas (CoPS) e coagulase-negativas (CoNS) mostrou-se relevante para a compreensão das espécies circulantes na região da Serra Gaúcha.
- A espécie *Staphylococcus pseudintermedius* foi a CoPS mais frequente em caninos, enquanto *Staphylococcus equorum* e *Staphylococcus felis* foram as CoNS mais prevalentes em felinos.
- Embora o perfil de resistência tenha sido baixo para *Staphylococcus aureus*, a análise considerou o isolamento de microrganismos pertencentes à microbiota normal de animais saudáveis, destacando-se a presença de cepas multirresistentes (MDR) e resistentes à meticilina (MRS), principalmente entre os CoNS.
- A identificação de CoPS e CoNS, associada à caracterização de seus perfis de resistência com ênfase em cepas resistentes à meticilina e multirresistentes para ambos os gêneros bacterianos, reforça a importância do monitoramento microbiológico para auxiliar no controle de infecções e prevenir sua disseminação em ambientes clínicos, hospitalares, comunitários e na interface entre animais e humanos.
- A caracterização precisa das espécies bacterianas e de seus mecanismos de resistência contribui não apenas para a tomada de decisão clínica, mas também para o desenvolvimento de protocolos de biossegurança mais eficazes, especialmente em estruturas veterinárias com elevado fluxo de pacientes.
- Dessa forma, os resultados desta tese ampliam o conhecimento regional sobre isolados bacterianos de animais de companhia e fornecem subsídios relevantes para ações de vigilância microbiológica e uso racional de antimicrobianos, integradas à abordagem de Saúde Única.

7 PERSPECTIVAS

Novos estudos são fundamentais para aprofundar a compreensão da ecologia desses dois gêneros bacterianos, uma vez que sua dinâmica ainda é pouco elucidada. Correlacionar os achados microbiológicos com os ambientes nos quais os animais estão inseridos permitirá identificar padrões importantes e possíveis fontes de disseminação. Esse tipo de análise é essencial para compreender como fatores ambientais influenciam a prevalência e diversidade microbiana, fornecendo uma base sólida para estratégias de prevenção e controle. Essa abordagem integrativa está alinhada com o conceito de Saúde Única (One Health), que reconhece a interconexão entre a saúde animal, humana e ambiental.

Será indispensável que estudos futuros explorem dados genômicos das amostras isoladas, caracterizando as cepas circulantes, seus fatores de virulência e mecanismos de resistência antimicrobiana. Paralelamente, torna-se essencial o mapeamento contínuo dos gêneros e espécies bacterianas mais frequentes na microbiota de animais saudáveis e em amostras clínicas, a fim de identificar grupos microbianos de maior relevância sanitária e potencial zoonótico. Esses conhecimentos integrados fornecerão base para o desenvolvimento de ferramentas diagnósticas mais sensíveis e específicas, como testes moleculares espécie-específicos, painéis multiplex e métodos de detecção rápida, capazes de acelerar o monitoramento, aprimorar o diagnóstico precoce e fortalecer ações preventivas e estratégias de vigilância epidemiológica.

Além disso, Adicionalmente, futuras investigações devem priorizar o mapeamento contínuo dos gêneros e espécies bacterianas mais frequentemente encontradas tanto na microbiota de animais saudáveis quanto em amostras clínicas. Esse mapeamento permitirá identificar quais grupos microbianos possuem maior relevância sanitária e potencial zoonótico, orientando o desenvolvimento de protocolos diagnósticos mais precisos, contribuindo para uma vigilância mais eficiente, capaz de responder com agilidade às mudanças no perfil microbiano e ao surgimento de cepas multirresistentes.

Esses dados devem ser analisados de forma integrada aos resultados clínicos e antibiogramas, associadas ao controle ambiental, através de uma programa permanente de monitoramento microbiológico, permitindo observar tendências de resistência, orientar terapias empíricas mais assertivas e antecipar alterações no perfil microbiano ambiental. A manutenção dessa vigilância contínua proporcionará segurança aos pacientes, auxiliará na tomada de decisão clínica e contribuirá diretamente para o uso racional de antimicrobianos dentro da perspectiva de Saúde Única.

REFERÊNCIAS

- Abdel-Moein KA, El-Hariri MD, Wasfy MO, Samir A. Occurrence of ampicillin-resistant *Enterococcus faecium* carrying the esp gene in pet animals: an upcoming threat for pet lovers. *Glob Anti Resistance*, 2017.
- Almeida MS, Santos SB, Mota AR, Silva LTR, Silva LBG, Mota RA. Isolamento microbiológico do canal auditivo de cães saudáveis e com otite externa na região metropolitana de Recife, Pernambuco. *Pesq. Vet. Bras.* 2016; 36(1): 29-32.
- Anvisa. Agência nacional de vigilância sanitária. Limites Máximos de Resíduos de Medicamentos Veterinários em Alimentos de Origem Animal Documento de base para discussão regulatória. Disponível em: <http://portal.anvisa.gov.br/documents/219201/219401/Med+Vet_Documento+base+discussa~o+18.10/69d161b5-785c-4907-862c-2294b48a79c5> Acessado em: 04 jun. 2019.
- Arias MVB, Battaglia LA, Aiello G, Carvalho TT, Freitas JC. Identificação da suscetibilidade antimicrobiana de bactérias isoladas de cães e gatos com feridas traumáticas contaminadas e infectadas. *Semina: Ciênc. Agrár* 2008;29(4) 861-74.
- Bang K, An J-U, Kim W, Dong H-J, Kim J, Cho S. Antibiotic resistance patterns and genetic relatedness of *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium* isolated from military working dogs in Korea. *JVS.* 2017; 18(2):229-36.
- Berck KM, Waisglass SE, Dick HLN, Weese JS. Prevalence of meticillin-resistant *Staphylococcus pseudintermedius* (MRSP) from skin and carriage sites of dogs after treatment of their meticillin-resistant or meticillin-sensitive Staphylococcal pyoderma. *Vet Dermatol.* 2012; 23: 369–67.
- Bertelloni F, Salvadori C, Lotti G, Cerri D, Ebani VV. Antimicrobial resistance in *Enterococcus* strains isolated from healthy domestic dogs. *Acta Microbiol Immunol Hung.* 2017 Sep 1;64(3):301-312. doi: 10.1556/030.63.2016.021. Epub 2016 Dec 15. PubMed PMID: 27976593.
- Boothe DM. Antimicrobial use in the critical care patient. in: Silverstein DHK. *Small animal critical care medicine.* 2.ed. Elsevier. 2015.
- Brasil. Descrição dos meios de cultura empregados nos exames microbiológicos agência nacional de vigilância sanitária (ANVISA). Brasília, DF, 2004.
- Brenciani A. Detection in Italy of two clinical *Enterococcus faecium* isolates carrying both the oxazolidinone and phenicol resistance gene *optrA* and a silent multiresistance gene *cfr*. *J Antimicrob Chemother.* 2016; 71: 1118–29.
- Bryan J, Frank LA, Rohrbacht BW, Burgette LJ, Cain CL, Bemis DA. Treatment outcome of dogs with meticillin-resistant and meticillin-susceptible *Staphylococcus pseudintermedius* pyoderma. *Vet Dermatol.* 2012; 23: 361–65.
- Bunt GVD, Top J, Hordijk J, Greeff SC, Mughini-Gras L, Corander J, van Pelt W, Bonten MJM, Fluit AC, Willems RJL. Intestinal carriage of ampicillin- and vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* in humans, dogs and cats in the Netherlands. *J Antimicrob Chemother.* 2017.
- Carvalho LCA. Etiologia e perfil de resistência de bactérias isoladas de otite externa em cães. Dissertação [Mestrado em Ciências Biológicas] Universidade Federal do Rio Grande do Norte; 2017.
- Chen Y, Xiao L, Zhou M, Zhang H. The microbiota: a crucial mediator in gut homeostasis and colonization resistance. *Frontiers in Microbiology.* 2024;15:1417864. doi:10.3389/fmicb.2024.1417864.

- Cho I, Blaser MJ. The human microbiome: at the interface of health and disease. *Nature Reviews Genetics*. 2012;13(4):260-270. doi:10.1038/nrg3182.
- Chung YS, Kwon KH, Shin S, Kim JH, Park YH, Yoon JW. Characterization of veterinary hospital-associated osolates of *Enterococcus* Species in Korea. *J. Microbiol. Biotechnol.* 2014; 24(3), 386–93.
- Donato ST. Comparação de métodos convencionais e semiautomatizados para identificação de *Enterococcus* spp. frente à biologia molecular em identificações discrepantes. [Mestrado em Microbiologia Médica] Universidade Federal do Ceará. Faculdade de Medicina, Fortaleza; 2007.
- Fàbregas N, Pérez D, Viñes J, Cuscó A, Migura-García L, Ferrer L, Francino O. Diverse populations of *Staphylococcus pseudintermedius* colonize the skin of healthy dogs. *Microbiology Spectrum*. 2023; 11(2):e03393-22. doi:10.1128/spectrum.03393-22.
- Ferreira MC, Nobre D, Oliveira MGX, Oliveira MCV, Cunha MPV, Menão MC, Dellova DCAL, Knöbl T. Agentes bacterianos isolados de cães e gatos com infecção urinária: perfil de sensibilidade aos antimicrobianos. *ASA São Paulo*. 2014;2(2): 29-37.
- Flowers L, Grice EA. The skin microbiota: balancing risk and reward. *Cell Host & Microbe*. 2020; 28(2):190-200. doi:10.1016/j.chom.2020.06.017.
- Galloway-Peña JR, Rice LB, Murray BE. Analysis of PBP5 of early u.s. isolates of *Enterococcus faecium*: sequence variation alone does not explain increasing ampicillin resistance over time. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 2011; 55(7): 3272-7.
- García-Fonticoba R, Ferrer L, Francino O, Cuscó A. The microbiota of the surface, dermis and subcutaneous tissue of dog skin. *Anim Microbiome*. 2020; 2:34. doi:10.1186/s42523-020-00050-8.
- Gomes LM, Allendorf SD. Otite externa em cães e gatos. *Veterinary Science*. 2018;42:56-8.
- Giacon M.M, Siqueira F.M, Motta A.S. Microbial contamination and antimicrobial resistance profiles indicate potential risks of infection at the Veterinary Medical Teaching Hospital - UFRGS, Porto Alegre, Brazil. *Acta Scientiae Veterinariae*. 2021; 49:1800. doi:10.22456/1679-9216.108992.
- Guimarães CDO, Ferreira CS, Silva KMC, Vieira ABR, Vieira JMS. Isolamento bacteriano e suscetibilidade microbiana em amostras biológicas de cães. *Pubvet*. 2017;11(2):168-75.
- Heo S, Kim T, Na HE, Lee G, Lee JH, Jeong DW. Transcriptomic analysis of *Staphylococcus equorum* KM1031 from the high-salt fermented seafood jeotgal under chloramphenicol, erythromycin and lincomycin stresses. *Scientific Reports*. 2022; 12:15541. doi:10.1038/s41598-022-19897-9.
- Herrero IA, Fernández-Garayzábal JF, Delgado IR, García MI, Domínguez L, Moreno MA. Dogs should be included in surveillance programs for vancomycin-resistant enterococci. *J Clin Microbiol*. 2004; 42(3):1384–1385. doi:10.1128/JCM.42.3.1384-1385.2004.
- Hillier A, Lloyd DH, Weese JS, Blondeau JM, Boothe D, Breitschwerdt E, Guardabassi L, Mark G, Papich MG, Rankin S, Turnidge JD, Sykes JE. Guidelines for the diagnosis and antimicrobial therapy of canine superficial bacterial folliculitis (Antimicrobial Guidelines Working Group of the International Society for Companion Animal Infectious Diseases). *Veterinary Dermatology*. 2014; 25: 163–43.
- Huang B, Zhang L, Zhang W, Liao K, Zhang S, Zhang Z, Ma X, Chen J, Zhang X, Qu P, Wu S, Chen C, Tang YW. Direct Detection and Identification of Bacterial Pathogens from Urine with Optimized Specimen Processing and Enhanced Testing Algorithm. *J Clin Microbiol*. 2017 May;55(5):1488-1495. doi: 10.1128/JCM.02549-16. Epub 2017 Mar 1. PubMed PMID: 28249997; PubMed Central PMCID: PMC5405266.
- Jackson CR, Fedorka-Cray PJ, Davis JA, Barrett JB, Frye JG. Prevalence, species distribution and antimicrobial resistance of *Enterococci* isolated from dogs and cats in the United States. *J Appl Microbiol*. 2009 Oct;107(4):1269-78. doi: 10.1111/j.1365-2672.2009.04310.x. Epub 2009 Apr 9. PubMed PMID: 19486402.
- Kahn LH. Antimicrobial resistance: a one health perspective. *Trans R Soc Trop Med Hyg*. 2017; 111: 255–60.

- Lacerda LCC. Bactérias associadas à feridas cutâneas agudas e crônicas em cães. Tese [Doutorado em Medicina Veterinária] Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Jaboticabal; 2018.
- Lebreton F, Manson AL, Saavedra JT, Straub TJ, Earl AM, Gilmore MS. Tracing the *Enterococci* from paleozoic origins to the hospital.HHS. 2018; 169(5): 849–61.
- Loureiro RJ, Roque F, Rodrigues AT, Herdeiro MT, Ramalheira E. O uso de antibióticos e as resistências bacterianas: breves notas sobre a sua evolução. Revista Portuguesa de Saúde Pública.2016; 34(1): 77-84.
- Magiorakos AP, Srinivasan A, Carey RB, Carmeli Y, Falagas ME, Giske CG, et al. Multidrug-resistant, extensively drug-resistant and pandrug-resistant bacteria: an international expert proposal for interim standard definitions for acquired resistance. Clin Microbiol Infect. 2012;18(3):268–281. doi:10.1111/j.1469-0691.2011.03570.x.
- Mala L, Lalouckova K, Skrivanova E. Bacterial skin infections in livestock and plant-based alternatives to their antibiotic treatment. Animals. 2021; 11(8):2473. doi:10.3390/ani11082473.
- Margarido RS, Almeida F, Souza AO, Bazan CT, Carvalho TD, Luppi T. Associação de antibióticos nos animais domésticos. Rev. CEMV. 2009; (12).
- Marques GR, Santos ACC, Costa MT. Resistência bacteriana na medicina veterinária e implicações com a saúde pública. *Veterinária e Zootecnia*. 2023;30:001-012.
- Moehring RW, Hazen KC, Hawkins MR, Drew RH, Sexton DJ, Anderson DJ. Challenges in preparation of cumulative antibiogram reports for community hospitals. JCM. 2015; (53):2977-82.
- Munita JM, Arias CA. Mecanismos de resistência a antibiótico. Microbiol Spectr. Abril de 2016; 4(2):1.
- Novais C, et al. Co-diversification of *Enterococcus faecium* core genomes and PBP5: evidences of pbp5 horizontal transfer. Frontiers in Microbiology. 2016; 7:1-17.
- Nováková D, Sedláček I, Pantůček R, Švec P. *Staphylococcus equorum* and *Staphylococcus succinus* isolated from human clinical specimens. Journal of Medical Microbiology. 2006;55(6):523-528. doi:10.1099/jmm.0.46246-0.
- OIE, World Organisation for Animal Health. OIE Standards, Guidelines and Resolution on antimicrobial resistance and the use of antimicrobial agents. Disponível em: <https://web.oie.int/delegatweb/eng/ebook/AF-book-AMR-ANG_FULL.pdf?WAHISPHPESSID=03152ead00d06990fa9066b7b71fcabc> Acesso em: 29 ago.2018.
- Oliveira SJ, Vaz AK. Guia Bacteriológico Prático: identificação, patogenicidade e imunidade / Sérgio J. Oliveira e Adil K. Vaz. 1 ed. Canoas: Ed. ULBRA, 2018.
- OPAS, OMS. OMS publica lista de bactérias para as quais se necessitam novos antibióticos urgentemente. Disponível em:<https://www.paho.org/bra/index.php?option=com_content&view=article&id=5357:oms-publica-lista-de-bacterias-para-as-quais-se-necessitam-novos-antibioticos-urgentemente&Itemid=812> Acesso em: 29 ago. 2018.
- Park J, Jin GD, Pak JI, Won J, Kim EB. Development of a Rapid Identification Method for the Differentiation of *Enterococcus* Species Using a Species-Specific Multiplex PCR Based on Comparative Genomics. Current Microbiology. 2017 74(4):476-483.
- Pedroso MAP, Oliveira WC, Felice AG, Cunha SCS, Oliveira MBPP, Richards NSPS. Pathogenic and harmful bacteria in dairy technology: genomic characterization and its correlation with physicochemical parameters of sheep's cheese sold in southern Brazil. Fermentation. 2024; 10(8):397. doi:10.3390/fermentation10080397.
- Pendleton JN, Gorman SP, Gilmore BF. Clinical relevance of the ESKAPE pathogens. Expert Rev Anti Infect Ther. 2013; 11(3):297-308. doi:10.1586/eri.13.12.
- Pereira, Ana Margarida; Clemente, Alfonso. Dogs' Microbiome From Tip to Toe. Topics in Companion Animal Medicine, vol. 45, p. 100584, 2021. DOI 10.1016/j.tcam.2021.100584.

- Pillay S, Zishiri OT, Adeleke MA. Prevalence of virulence genes in *Enterococcus* species isolated from companion animals and livestock. *Onder of Vet Research*, 2018. doi.org/10.4102/ojvr.v85i1.1583.
- Pitt SJ, Gunn A. The One Health concept. *British Journal of Biomedical Science*. 2024; 81:12366. doi:10.3389/bjbs.2024.12366.
- Portenier I, Waltimo TMT, Haapasalo M. *Enterococcus faecalis* - the root canal survivor and 'star' in posttreatment disease. *Endodontic Topics*. 2003(1):135-59. doi.org/10.1111/j.1601-1546.2003.00040.x.
- Prieto AMG. Global emergence and dissemination of *Enterococci* as nosocomial pathogens: attack of the clones? *Frontiers in Microbiology*. 2016; 788(7): 1-15.
- Ribeiro M, Cortina MA. Clinical importance bacteria and resistance mechanisms in of Healthcare Associated Infections (HAIs). *Revista Científica UMC*. 2016;1(1): 1-12.
- Sampaio JLM. Consenso em detecção de resistência bacteriana aos antimicrobianos em bacilos Gram-Negativos. *Microbiologia in Foco*. 2008;3(2): 18-27.
- Santoro D, Marsella R, Pucheu-Haston CM, Eisenschenk MNC, Nuttall T, Bizikova P. Pathogenesis of canine atopic dermatitis: skin barrier and host microorganism interaction. *Vet Dermatol*. 2015; 26(2):84-e25. doi:10.1111/vde.12197.
- Santos WB, Araujo MGS, Silva JC, Bernardo TH, Bastos MLA, Veríssimo RCSS. Microbiota infectante de feridas cirúrgicas: análise da produção científica nacional e internacional. *Rev. Sobecc*. 2016; 21(1): 46-51.
- Silley P, Stephan B. Prudent use and regulatory guidelines for veterinary antibiotics – politics or science? *JAM*. 2017: 1373-80.
- Silva KC, Knobl T, Moreno AM. Antimicrobial resistance in veterinary medicine: mechanisms and bacterial agents with the greatest on human health. *Braz. J. Vet. Res. Anim. Sci*. 2013; 50 (3): 171-83.
- Silva L, Dietze W, Munhol P, Fadel L, Grecelle, CBZ. Avaliação da contaminação ambiental em hospital veterinário e antibiograma acumulativo. *Veterinária em Foco*. 2017;14(2): 54-70.
- Sun HL, Liu C, Zhang JJ, Zhou YM, Xu YC. Molecular characterization of vancomycin resistant *Enterococci* isolated from a hospital in Beijing, China. *Journal of Microbiology, Immunology and Infection* (2018). doi.org/10.1016/j.jmii.2018.12.008.
- Tan TY, Jiang B, Ng LSY. Faster and economical screening for vancomycin resistant *Enterococci* by sequential use of chromogenic agar and real-time polymerase chain reaction. *Journal of Microbiology, Immunology and Infection* .2017; 50: 448-53.
- Tanveer M, Ntakiyisumba E, Hirwa F, Yoon H, Oh S-I, Kim C, Kim MH, Yoon J-S, Won G. Prevalence of bacterial pathogens isolated from canines with pyoderma and otitis externa in Korea: a systematic review and meta-analysis. *Vet Sci*. 2024; 11:656. doi:10.3390/vetsci11120656
- Tavares W. Bactérias Gram-positivas problemas: resistência do estafilococo, do enterococo e do pneumococo aos antimicrobianos. *SBMT*. 2000; 33(3):281-301.
- Tortora GT, Funke BR, Case CL. Fármacos antimicrobianos In: _____. *Microbiologia*. 12 ed. Porto Alegre. Artmed, 2017.
- Vázquez L, Srednik ME, Rodríguez J, Flórez AB, Mayo B. Antibiotic resistance/susceptibility profiles of *Staphylococcus equorum* strains from cheese, and genome analysis for antibiotic resistance genes. *International Journal of Molecular Sciences*. 2023; 24(14):11657. doi:10.3390/ijms241411657.
- Werner G, Fleige C, Fessler AT, Timke M, Kostrzewa M, Zischka M, Peters T, Kaspar H, Schwarz S. Improved identification including MALDI-TOF mass spectrometry analysis of group D *Streptococci* from bovine mastitis and subsequent molecular characterization of corresponding *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium* isolates. *Vet Microbiol*. 2012 Nov 9;160(1-2):162-9. doi: 10.1016/j.vetmic.2012.05.019. Epub 2012 May 23. PubMed PMID: 22677481.
- World health organization (WHO). *Global antimicrobial resistance and use surveillance system (GLASS) report 2023*. Geneva: WHO, 2023. Disponível em: <<https://www.who.int/publications/i/item/9789240076710>> Acesso em: 15Nov.2025.

ANEXO A

Tabela suplementar encaminhada na submissão do segundo artigo.

Table S1 MALDI-TOF results of the 78 isolates showing the top 10 matches.

Isolado	Specie	MALDI-TOF	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	
PcBj - 23	Canino	<i>Aerococcus viridans</i>	Aerococcus viridans CC_6604 MCW	Aerococcus viridans NY_1794 MCW	Aerococcus viridans CCUG 48207 CCM	Aerococcus viridans CCM 1915 CCM	Aerococcus viridans CCM 1911 CCM	Aerococcus viridans CCM 2439 CCM	Aerococcus viridans DSM 20311 DSM	Aerococcus viridans CCM 1914T CCM	Aerococcus viridans DSM 20340T DSM	Aerococcus viridans DSM 13022T DSM	Aerococcus viridans CCUG 52146 CCUG
PcBj - 24	Canino	<i>Aerococcus viridans</i>	Aerococcus viridans CC_6604 MCW	Aerococcus viridans NY_1794 MCW	Aerococcus viridans CCM 1915 CCM	Aerococcus viridans CCM 1914T CCM	Aerococcus viridans CCM 1911 CCM	Aerococcus viridans DSM 20311 DSM	Aerococcus viridans DSM 20311 DSM	Aerococcus viridans CCM 2439 CCM	Aerococcus viridans DSM 13022T DSM	Aerococcus viridans DSM 13022T DSM	Aerococcus viridans DSM 13227T DSM
BCI 005/18	Canino	<i>Enterococcus faecalis</i>	Enterococcus faecalis 20247_4 CHB	Enterococcus faecalis 104575 LDW	Enterococcus faecalis ATCC 7080 THL	Enterococcus faecalis DSM 6134 DSM	Enterococcus faecalis DSM 20409 DSM	Enterococcus faecalis DSM 105652 DSM	Enterococcus faecalis ATCC 29212 CHB	Enterococcus faecalis DSM 2570 DSM	Enterococcus faecalis DSM 20478T JUG	Enterococcus faecalis DSM 20371 DSM	Enterococcus faecalis DSM 20371 DSM
BCI 011/18	Canino	<i>Enterococcus faecalis</i>	Enterococcus faecalis 104575 LDW	Enterococcus faecalis 20247_4 CHB	Enterococcus faecalis DSM 20478T JUG	Enterococcus faecalis ATCC 7080 THL	Enterococcus faecalis ATCC 29212 CHB	Enterococcus faecalis DSM 20409 DSM	Enterococcus faecalis DSM 6134 DSM	Enterococcus faecalis DSM 20371 DSM	S. simulans DSM 20323 DSM	Enterococcus faecalis DSM 2570 DSM	Enterococcus faecalis DSM 2570 DSM
BCI 064/19	Canino	<i>Macrococcus spp.</i>	Macrococcus caseolyticus DSM 20597T DSM	Macrococcus caseolyticus CCM 53809 CCUG	Macrococcus caseolyticus CCM 60665 CCUG	Macrococcus caseolyticus CCM 28808 CCUG	Macrococcus caseolyticus CCM 20074T DSM	Plesiomonas shigelloides CCM 1996 CCM	Macrococcus caseolyticus DSM 6669 DSM	Escherichia coli B421 UFL	S. warneri Mb18796_1 CHB	S. aureus ssp aureus DSM 20491 DSM	S. aureus ssp aureus DSM 20491 DSM
BCI 022/19	Canino	<i>NI</i>	S. intermedius P_2A	S. intermedius	S. xylosum DSM 20267	S. xylosum DSM 6179	S. pseudintermedius	S. intermedius P_45A	Aspergillus fumigatus 2008_1360	S. xylosum DSM 20266T	S. pseudintermedius DSM 21284T	S. intermedius P_66A	S. intermedius P_66A
BCI 059/19	Canino	<i>NI</i>	JUT Macrooccus caseolyticus CCM 53809 CCUG	P_4A JUT Macrooccus caseolyticus DSM 20597T DSM	DSM S. piscifermentans DSM 7373T DSM	DSM Tissierella praeacuta C 33268T BOG	Lactobacillus nagelii DSM 13675T DSM	Campylobacter jejuni MB_7240_05 THL	S. xylosum DSM 6179 DSM	S. xylosum DSM 20267 DSM	Clostridium sphenoides 1046_NCT C 507T BOG	Campylobacter jejuni ATCC 29428 THL	Campylobacter jejuni ATCC 29428 THL
PcBj - 18	Canino	<i>NI</i>	S. chromogenes DSM 20454T DSM	Legionella oakridgensis W09_391_2 TUD	S. cohnii ssp urealyticus DSM 6719 DSM	Corynebacterium striatum 23086514 MLD	Pseudomonas flavescens DSM 12071T HAM	Streptococcus pneumoniae besS129 THL	Stenotrophomonas acidaminiphila DSM 13117T HAM	Streptococcus pneumoniae ATCC 49619 THL	Streptococcus pseudopneumoniae DSM 18670T DSM	S. carnosus DSM 15831T DSM	S. carnosus DSM 15831T DSM
BCI 019/19	Felino	<i>NI</i>	S. haemolyticus Mb18803_2 CHB	Legionella pneumophila DSM 20567T DSM	S. delphini DSM 20771T DSM	S. felis DSM 7377T BRB	Weissella viridescens DSM 20410T DSM	Eubacterium tenue DSM 20695T DSM	Pseudomonas balearica DSM 6083T HAM	S. felis V818 MCRF	S. felis V351 MCRF	S. aureus ssp aureus DSM 11822 DSM	S. aureus ssp aureus DSM 11822 DSM
PcBj - 27	Canino	<i>nasimurium</i>	Rothia nasimurium 10036870_103 USH	Rothia nasimurium 10036873_108 USH	Rothia nasimurium 10037052_102 USH	Rothia nasimurium DSM 15694T DSM	Arthrobacter russicus CIP	Bacillus novalis DSM	Clostridium beijerinckii DSM	Aneurinibacillus migulanus DSM	Pseudomonas corrugata DSM	Arthrobacter histidinovorans DSM	Arthrobacter histidinovorans DSM
PcBj - 21	Canino	<i>S. aureus</i>	S. aureus ssp aureus DSM 20231T	S. aureus ssp aureus DSM 799	S. aureus ssp aureus DSM 3463	S. aureus ssp aureus DSM 4910	S. aureus ssp aureus ATCC 33862	S. aureus ssp aureus ATCC 29213	S. aureus ssp aureus DSM 346	S. aureus ssp aureus DSM 20491	S. aureus ssp aureus ATCC	S. aureus ssp aureus ATCC	S. aureus ssp aureus ATCC
PcBj - 26	Canino	<i>S. aureus</i>	S. aureus ssp aureus DSM 4910	S. aureus ssp aureus DSM 799	S. aureus ssp aureus ATCC 33862	S. aureus ssp aureus DSM	S. aureus ssp aureus DSM 3463	S. aureus ssp aureus ATCC 25923	S. aureus ssp aureus THL	S. aureus ssp aureus DSM 346	S. aureus ssp aureus DSM 20491	S. aureus ssp aureus DSM 20491	S. aureus ssp aureus ATCC 29213 THL
PcBj - 28	Canino	<i>S. aureus</i>	S. aureus ssp aureus DSM 4910	S. aureus ssp aureus DSM 799	S. aureus ssp aureus ATCC 33862	S. aureus ssp aureus DSM	S. aureus ssp aureus DSM 3463	S. aureus ssp aureus ATCC 25923	S. aureus ssp aureus THL	S. aureus ssp aureus DSM 346	S. aureus ssp aureus DSM 20491	S. aureus ssp aureus DSM 20491	S. aureus ssp aureus DSM

			DSM	DSM	THL	2023IT DSM	DSM	THL	DSM	DSM	20232 DSM
BCI 043/ 19	Feli no	<i>S. epidermidis</i>	<i>S. epidermidis</i> DSM 3269	<i>S. epidermidis</i> ATCC 12228	<i>S. epidermidis</i> 10547 CHB	<i>S. epidermidis</i> ATCC 12228	<i>S. epidermidis</i> DSM 1798	<i>S. epidermidis</i> ATCC 14990T THL	<i>S. caprae</i> CCUG 38378 CCUG	<i>S. epidermidis</i> DSM 4851	<i>S. caprae</i> DSM 20608T DSM
PcV p- 14	Can ino	<i>S. equorum</i>	<i>S. equorum</i> DSM 20675	<i>S. equorum</i> V794 MCRF	<i>S. xylosum</i> DSM 6179	<i>S. xylosum</i> DSM 20267	<i>S. equorum</i> DSM 20674T	<i>S. succinus</i> DSM 14617T	<i>S. equorum</i> DSM 57825 CCUG	<i>S. capitis</i> ssp capitis DSM 20326T	<i>S. caprae</i> DSM 20038 DSM
PcBj - 10	Feli no	<i>S. equorum</i>	<i>S. equorum</i> DSM 20675	<i>S. equorum</i> V794 MCRF	<i>S. xylosum</i> DSM 20674T	<i>S. equorum</i> CCUG 57825 CCUG	<i>S. saprophyticus</i> ssp saprophyticus DSM 4853	<i>S. capitis</i> ssp capitis DSM 20326T	<i>S. xylosum</i> DSM 20267 CCUG	<i>S. saprophyticus</i> ssp saprophyticus DSM 2602	<i>S. capitis</i> ssp capitis DSM 20325
PcBj - 11	Feli no	<i>S. equorum</i>	<i>S. equorum</i> DSM 20675	<i>S. equorum</i> V794 MCRF	<i>S. xylosum</i> DSM 20674T	<i>S. xylosum</i> DSM 20267	<i>S. xylosum</i> DSM 15096T	<i>S. succinus</i> ssp casei DSM DSM	<i>S. xylosum</i> DSM 20038 DSM	<i>S. saprophyticus</i> ssp saprophyticus CCM 2602	<i>S. xylosum</i> DSM 6179
PcBj - 12	Feli no	<i>S. equorum</i>	<i>S. equorum</i> DSM 20675	<i>S. equorum</i> V794 MCRF	<i>S. xylosum</i> DSM 20674T	<i>S. capitis</i> ssp capitis DSM 20326T	<i>S. capitis</i> ssp capitis DSM 20325	<i>S. equorum</i> CCUG 57825 CCUG	<i>Pseudomonas</i> putida B342T UFL	<i>S. auricularis</i> DSM 20609	<i>S. pasteurii</i> DSM 10657
PcBj - 13	Feli no	<i>S. equorum</i>	<i>S. equorum</i> DSM 20675	<i>S. equorum</i> V794 MCRF	<i>S. xylosum</i> DSM 20674T	<i>S. saprophyticus</i> ssp saprophyticus DSM 4853	<i>S. capitis</i> ssp capitis DSM 20326T	<i>S. xylosum</i> DSM 6179	<i>S. equorum</i> CCUG 57825 CCUG	<i>S. succinus</i> ssp succinus DSM 14617T	<i>S. xylosum</i> DSM 20267
PcBj - 16	Feli no	<i>S. equorum</i>	<i>S. equorum</i> DSM 20675	<i>S. equorum</i> V794 MCRF	<i>S. xylosum</i> DSM 20267	<i>S. capitis</i> ssp capitis DSM 20326T	<i>S. succinus</i> ssp succinus DSM 14617T	<i>S. capitis</i> ssp urealyticus DSM 6717T	<i>S. saprophyticus</i> ssp saprophyticus DSM 4852	<i>S. xylosum</i> DSM 20266T	<i>S. capitis</i> ssp capitis DSM 20325
PcBj - 2	Feli no	<i>S. equorum</i>	<i>S. equorum</i> DSM 20675	<i>S. equorum</i> V794 MCRF	<i>S. xylosum</i> DSM 20674T	<i>S. equorum</i> CCUG 57825 CCUG	<i>S. xylosum</i> DSM 6179	<i>S. xylosum</i> DSM 6179	<i>S. xylosum</i> DSM 6179	<i>S. xylosum</i> FI FLR	<i>S. succinus</i> ssp casei DSM 15096T
PcBj - 3	Feli no	<i>S. equorum</i>	<i>S. equorum</i> DSM 20675	<i>S. equorum</i> V794 MCRF	<i>S. xylosum</i> DSM 57825 CCUG	<i>S. saprophyticus</i> ssp saprophyticus DSM 4853	<i>S. equorum</i> DSM 20674T	<i>S. capitis</i> ssp capitis DSM 20326T	<i>S. xylosum</i> DSM 14617T	<i>S. xylosum</i> DSM 20267	<i>S. capitis</i> ssp capitis DSM 4852
PcBj - 4	Feli no	<i>S. equorum</i>	<i>S. equorum</i> DSM 20675	<i>S. equorum</i> V794 MCRF	<i>S. xylosum</i> DSM 20675	<i>S. equorum</i> CCUG 57825 CCUG	<i>S. xylosum</i> DSM 20267	<i>S. saprophyticus</i> ssp saprophyticus DSM 4853	<i>S. capitis</i> ssp capitis DSM 20326T	<i>S. xylosum</i> DSM 6179	<i>S. succinus</i> ssp succinus DSM 14617T
PcBj - 5	Feli no	<i>S. equorum</i>	<i>S. equorum</i> DSM 20675	<i>S. equorum</i> V794 MCRF	<i>S. xylosum</i> DSM 20675	<i>S. xylosum</i> FI FLR	<i>S. xylosum</i> DSM 20674T	<i>S. equorum</i> DSM 20674T	<i>S. xylosum</i> DSM 20674T	<i>S. xylosum</i> DSM 6179	<i>S. xylosum</i> DSM 20266T
PcBj - 8	Feli no	<i>S. equorum</i>	<i>S. equorum</i> DSM 20675	<i>S. equorum</i> V794 MCRF	<i>S. xylosum</i> DSM 20674T	<i>S. equorum</i> CCUG 57825	<i>S. xylosum</i> DSM 20267	<i>S. xylosum</i> DSM 20266T	<i>S. xylosum</i> DSM 20326T	<i>S. xylosum</i> DSM 6179	<i>S. delphini</i> P_37A JUT
PcV p- 14	Feli no	<i>S. equorum</i>	<i>S. equorum</i> DSM 20675	<i>S. equorum</i> V794 MCRF	<i>S. xylosum</i> DSM 6179	<i>S. xylosum</i> DSM 20674T	<i>S. xylosum</i> DSM 20267	<i>S. capitis</i> ssp capitis	<i>S. succinus</i> ssp	<i>S. saprophyticus</i> DSM 20267	<i>S. xylosum</i> FI FLR

22			ssp equorum DSM 20675 DSM	MCRF	ssp equorum DSM 20674T DSM	DSM	CCUG 57825 CCUG	DSM 20326T DSM	succinus DSM 14617T DSM	cus ssp saprophyticus DSM 20038 DSM	DSM	
BCI 028/19	Felino	<i>S. felis</i>	S. felis V461 MCRF	S. felis V818 MCRF	S. felis V248 MCRF	S. felis V766 MCRF	S. felis V351 MCRF	S. felis V860 MCRF	S. felis 7377T BRB	S. felis DSM 7377T DSM	S. lutrae DSM 10246 DSM	S. chromogenes DSM 20454T DSM
BCI 040/19	Felino	<i>S. felis</i>	S. felis V351 MCRF	S. felis V461 MCRF	S. felis V248 MCRF	S. felis V766 MCRF	S. felis V818 MCRF	S. felis DSM 7377T BRB	S. felis V860 MCRF	S. felis DSM 7377T DSM	S. schleiferi ssp aldenense DSM 4809 DSM	S. delphini DSM 20771T DSM
PcBj -15	Felino	<i>S. felis</i>	S. felis V818 MCRF	S. felis V248 MCRF	S. felis V766 MCRF	S. felis V461 MCRF	S. felis V351 MCRF	S. felis V860 MCRF	S. felis DSM 7377T BRB	S. felis DSM 7377T DSM	Clostridium DSM 19262T DSM	S. chromogenes DSM 20454T DSM
PcBj -17	Felino	<i>S. felis</i>	S. felis V351 MCRF	S. felis DSM 7377T BRB	S. felis V766 MCRF	S. felis V248 MCRF	S. felis V818 MCRF	S. felis V461 MCRF	S. felis DSM 7377T DSM	S. felis DSM 7377T DSM	S. chromogenes DSM 20454T DSM	S. lutrae DSM 10246 DSM
PcBj -6	Felino	<i>S. felis</i>	S. felis V818 MCRF	S. felis V248 MCRF	S. felis V461 MCRF	S. felis V351 MCRF	S. felis V766 MCRF	S. felis V860 MCRF	S. felis DSM 7377T DSM	S. felis DSM 7377T DSM	S. lutrae DSM 10246 DSM	S. delphini DSM 11675 DSM
PcV p-17	Felino	<i>S. felis</i>	S. felis V461 MCRF	S. felis V248 MCRF	S. felis V818 MCRF	S. felis V351 MCRF	S. felis V766 MCRF	S. felis V860 MCRF	S. felis DSM 7377T BRB	S. felis DSM 7377T DSM	S. condimenti DSM 11675 DSM	S. chromogenes DSM 20454T DSM
PcV p-25	Felino	<i>S. felis</i>	S. felis V461 MCRF	S. felis V351 MCRF	S. felis V766 MCRF	S. felis V248 MCRF	S. felis V818 MCRF	S. felis DSM 7377T BRB	S. felis DSM 7377T DSM	S. felis DSM 7377T DSM	S. schleiferi ssp coagulans DSM 4809 DSM	S. LMG 19137 LMG
BCI 048/19	Canino	<i>S. haemolyticus</i>	haemolyticus DSM 20264 DSM	haemolyticus Mb18803_2 CHB	haemolyticus DSM 20265 DSM	haemolyticus DSM 20263T DSM	haemolyticus DSM 20228 DSM	S. haemolyticus 10024 LBK	S. haemolyticus 991400353	S. haemolyticus 100331_08 USP	S. lugdunensis DSM 4804T DSM	S. haemolyticus DSM 20228 BRB
BCI 012/18	Canino	<i>S. pseudintermedius</i>	S. pseudintermedius CCUG 50530 CCUG	S. pseudintermedius 472 RLT	S. intermedius P_9B JUT	S. intermedius DSM 20373T BRB	S. delphini DSM 20771T DSM	S. pseudintermedius LMG 9079	S. pseudintermedius DSM 32915 CCUG	S. pseudintermedius DSM 32915 CCUG	S. delphini DSM 20373T BRB	S. pseudintermedius DSM 21284T DSM
BCI 018/19	Canino	<i>S. pseudintermedius</i>	S. pseudintermedius CCUG 50530 CCUG	S. intermedius DSM 20373T DSM	S. intermedius P_9B JUT	S. pseudintermedius LMG 9079	S. pseudintermedius 472 RLT	S. pseudintermedius DSM 32915 CCUG	S. delphini DSM 20771T BRB	S. intermedius DSM 20373T BRB	S. intermedius P_66A JUT	S. delphini P_22A JUT
BCI 023/19	Canino	<i>S. pseudintermedius</i>	S. pseudintermedius CCUG 50530 CCUG	S. pseudintermedius 32915 CCUG	S. pseudintermedius 472 RLT	S. pseudintermedius LMG 9079	S. pseudintermedius DSM 21284T DSM	S. delphini DSM 20771T BRB	S. delphini DSM 20771T DSM	S. delphini DSM 20771T DSM	S. intermedius P_9B JUT	S. delphini P_22A JUT
BCI 026/19	Canino	<i>S. pseudintermedius</i>	S. pseudintermedius CCUG 50530 CCUG	S. pseudintermedius LMG 9079	S. pseudintermedius 472 RLT	S. intermedius P_66A JUT	S. intermedius P_9B JUT	S. pseudintermedius DSM 32915 CCUG	S. pseudintermedius DSM 32915 CCUG	S. intermedius DSM 20373T BRB	S. intermedius DSM 20373T DSM	S. delphini DSM 20771T DSM
BCI 032/19	Canino	<i>S. pseudintermedius</i>	S. pseudintermedius CCUG 50530 CCUG	S. pseudintermedius 472 RLT	S. intermedius P_9B JUT	S. intermedius DSM 20373T DSM	S. pseudintermedius DSM 32915 CCUG	S. pseudintermedius DSM 32915 CCUG	S. intermedius DSM 20373T BRB	S. delphini P_22A JUT	S. pseudintermedius LMG 9079	S. delphini DSM 20771T BRB
BCI 046/19	Canino	<i>S. pseudintermedius</i>	S. pseudintermedius CCUG 50530 CCUG	S. pseudintermedius LMG 9079	S. pseudintermedius 32915 CCUG	S. pseudintermedius 472 RLT	S. delphini DSM 20771T BRB	S. delphini DSM 20771T DSM	S. intermedius P_9B JUT	S. delphini P_22A JUT	S. intermedius DSM 20373T DSM	S. chromogenes DSM 20454T DSM
BCI 051/19	Canino	<i>S. pseudintermedius</i>	S. pseudintermedius	S. pseudintermedius	S. pseudintermedius	S. pseudintermedius	S. delphini DSM 20771T	S. delphini DSM	S. pseudintermedius DSM 20771T	S. delphini DSM 20771T	S. intermedius P_9B JUT	S. intermedius P_66A

			472 RLT	CCUG 50530 CCUG S.	CCUG 32915 CCUG S.	LMG 9079 LMG	BRB	20373T BRB	DSM 21284T DSM	DSM	JUT	
BCI 057/19	Canino	<i>S. pseudintermedius</i>	pseudintermedius CCUG 32915 CCUG S.	pseudintermedius CCUG 50530 CCUG S.	S. pseudintermedius 472 RLT LMG	S. pseudintermedius LMG 9079	S. intermedius P_9B JUT	S. intermedius DSM 20373T BRB	S. delphini intermedius P_66A JUT	S. delphini P_22A JUT	pseudintermedius DSM 21284T DSM	S. intermedius DSM 20373T DSM
BCI 062/19	Canino	<i>S. pseudintermedius</i>	pseudintermedius CCUG 50530 CCUG S.	pseudintermedius CCUG 32915 CCUG DSM	S. intermedius 20373T P_66A JUT	S. intermedius P_66A JUT	S. intermedius DSM 20373T BRB	S. intermedius DSM 20373T JUT	S. delphini DSM 20771T DSM	S. delphini P_22A JUT	pseudintermedius LMG 9079 LMG	S. pseudintermedius 472 RLT
BCI 066/19	Canino	<i>S. pseudintermedius</i>	pseudintermedius CCUG 50530 CCUG S.	pseudintermedius LMG 9079 LMG S.	S. pseudintermedius 32915 CCUG JUT	S. intermedius P_9B JUT	S. intermedius DSM 20373T DSM	S. pseudintermedius 21284T 472 RLT DSM	S. delphini intermedius JUT	S. delphini P_66A JUT	S. delphini P_22A JUT	S. intermedius DSM 20373T BRB
BCI 067/19	Canino	<i>S. pseudintermedius</i>	pseudintermedius CCUG 32915 CCUG S.	pseudintermedius CCUG 50530 CCUG S.	S. pseudintermedius LMG 9079 LMG S.	S. pseudintermedius 472 RLT JUT	S. delphini DSM 20771T BRB	S. delphini DSM 21284T DSM	S. delphini h_9d JUT	S. delphini DSM 20771T DSM	S. delphini h_6c JUT	S. delphini P_22A JUT
BCI 069/19	Canino	<i>S. pseudintermedius</i>	pseudintermedius CCUG 50530 CCUG S.	pseudintermedius LMG 9079 LMG S.	S. pseudintermedius 32915 CCUG JUT	S. intermedius P_9B JUT	S. intermedius DSM 20373T DSM	S. intermedius DSM 20373T BRB	S. pseudintermedius 472 RLT JUT	S. delphini intermedius P_66A JUT	S. delphini DSM 20771T DSM	S. delphini P_22A JUT
BCI 071/19	Canino	<i>S. pseudintermedius</i>	pseudintermedius CCUG 50530 CCUG S.	pseudintermedius CCUG 32915 CCUG S.	S. pseudintermedius LMG 9079 LMG S.	S. pseudintermedius 472 RLT JUT	S. intermedius P_9B JUT	S. delphini DSM 20771T DSM	S. delphini DSM 20373T BRB	S. delphini DSM 21284T DSM	S. delphini DSM 20454T DSM	S. intermedius P_66A JUT
BCI 080/19	Canino	<i>S. pseudintermedius</i>	pseudintermedius CCUG 50530 CCUG S.	pseudintermedius LMG 9079 LMG S.	S. intermedius 20373T DSM JUT	S. intermedius P_9B JUT	S. intermedius CCUG 32915 CCUG	S. intermedius P_66A JUT	S. delphini DSM 20771T BRB	S. delphini P_22A JUT	S. delphini DSM 20771T DSM	S. pseudintermedius 472 RLT
PcBj -20	Canino	<i>S. pseudintermedius</i>	pseudintermedius CCUG 50530 CCUG S.	pseudintermedius CCUG 32915 CCUG S.	S. pseudintermedius LMG 9079 LMG S.	S. pseudintermedius 472 RLT JUT	S. intermedius P_9B JUT	S. delphini DSM 20771T DSM	S. delphini DSM 20771T BRB	S. intermedius P_66A JUT	S. delphini DSM 20373T DSM	S. intermedius P_9B JUT
PcBj -25	Canino	<i>S. pseudintermedius</i>	pseudintermedius CCUG 50530 CCUG S.	pseudintermedius LMG 9079 P_9B JUT	S. intermedius 20373T BRB S.	S. pseudintermedius 32915 CCUG	S. pseudintermedius LMG 9079	S. pseudintermedius 472 RLT JUT	S. delphini DSM 20373T DSM	S. delphini DSM 20771T DSM	S. delphini DSM 20771T BRB	S. delphini P_22A JUT
PcV p-26	Canino	<i>S. pseudintermedius</i>	pseudintermedius CCUG 50530 CCUG S.	pseudintermedius LMG 9079 LMG S.	S. pseudintermedius 32915 CCUG JUT	S. intermedius P_9B JUT	S. pseudintermedius 472 RLT	S. intermedius DSM 20373T DSM	S. delphini DSM 20771T BRB	S. delphini DSM 20771T JUT	S. intermedius DSM 20373T BRB	S. delphini DSM 20771T DSM
PcV p-37	Canino	<i>S. pseudintermedius</i>	pseudintermedius CCUG 50530 CCUG S.	pseudintermedius CCUG 32915 CCUG S.	S. pseudintermedius 472 RLT JUT	S. pseudintermedius LMG 9079	S. delphini DSM 20771T BRB	S. delphini DSM 20771T DSM	S. delphini P_22A JUT	S. delphini JUT	S. intermedius DSM 20373T BRB	S. delphini DSM 21284T DSM
BCI 035/19	Felino	<i>S. pseudintermedius</i>	pseudintermedius CCUG 50530 CCUG S.	pseudintermedius CCUG 32915 CCUG S.	S. pseudintermedius LMG 9079	S. pseudintermedius 21284T DSM	S. pseudintermedius 472 RLT	S. delphini DSM 20771T DSM	S. delphini DSM 20771T BRB	S. delphini P_22A JUT	S. delphini h_9d JUT	S. delphini h_4a JUT
PcBj -9	Felino	<i>S. pseudintermedius</i>	pseudintermedius CCUG 32915 CCUG S.	pseudintermedius 50530 CCUG S.	S. delphini 20771T BRB S.	S. pseudintermedius LMG 9079	S. pseudintermedius 472 RLT	S. intermedius P_9B JUT	S. intermedius P_66A JUT	S. delphini P_22A JUT	S. delphini DSM 20771T DSM	S. intermedius DSM 20373T DSM
PcV p-11	Felino	<i>S. saprophyticus</i>	saprophyticus DSM	saprophyticus DSM	saprophyticus DSM	saprophyticus DSM	<i>S. xylosus</i> DSM 6179	<i>S. xylosus</i> DSM 20267	ssp equorum DSM 20675	saprophyticus DSM	<i>S. xylosus</i> DSM 20266T	saprophyticus CCM

BCI 014/ 18	Can ino	<i>S. spp</i>	<i>S. simulans</i> DSM 20323 DSM	<i>S. simulans</i> DSM 20322T DSM	<i>S. simulans</i> CCUG 58188 CCUG	<i>S. simulans</i> DSM 20037 DSM	<i>S. simulans</i> CCUG 46177 CCUG	<i>S. condimenti</i> DSM 11674T DSM	<i>S. simulans</i> DSM 20324 DSM	<i>Bacillus circulans</i> DSM 11T DSM	<i>S. carnosus</i> ssp carnosus DSM 20501T DSM	<i>Lactobacillus curvatus</i> DSM 20495 DSM
PcV p-1	Can ino	<i>S. spp</i>	<i>S. sciuri</i> ssp sciuri DSM 20345T DSM	<i>S. sciuri</i> ssp carnaticus DSM 15613T DSM	<i>S. sciuri</i> ssp sciuri DSM 6671 DSM	<i>S. sciuri</i> ssp carnaticus DSM 15613T DSM_2	<i>S. lentus</i> DSM 6672 DSM	<i>S. sciuri</i> ssp rodentium DSM 16827T DSM_2	<i>S. sciuri</i> ssp sciuri DSM 6671 DSM_2	<i>S. lentus</i> DSM 20352T DSM	<i>S. sciuri</i> ssp rodentium DSM 16827T DSM	<i>S. lentus</i> CCUG 43543 CCUG
PcV p-7	Can ino	<i>S. spp</i>	<i>S. simulans</i> DSM 20323 DSM	<i>S. simulans</i> DSM 20322T DSM	<i>S. simulans</i> CCUG 58188 CCUG	<i>S. condimenti</i> DSM 11674T DSM	<i>S. simulans</i> DSM 20037 DSM	<i>S. simulans</i> CCUG 46177 CCUG	<i>Lactobacillus mali</i> DSM 20444T DSM	<i>Pseudomonas veronii</i> B560 UFL	<i>Lactobacillus curvatus</i> DSM 20495	<i>Pseudomonas libanensis</i> CIP 105460T HAM
BCI 006/ 18	Feli no	<i>S. spp</i>	<i>S. epidermidis</i> 10547 CHB	<i>S. epidermidis</i> DSM 1798	<i>S. epidermidis</i> ATCC 14990T THL	<i>S. epidermidis</i> DSM 3269 DSM	<i>S. epidermidis</i> DSM 3269 DSM	<i>S. caprae</i> CCUG 38378 CCUG	<i>S. caprae</i> CCUG 53547 CCUG	<i>S. caprae</i> CCUG 57733 CCUG	<i>S. epidermidis</i> DSM 4851	<i>S. capitis</i> ssp capitis DSM 6180 DSM
BCI 027/ 19	Feli no	<i>S. spp</i>	<i>S. felis</i> V351 MCRF	<i>S. felis</i> DSM 7377T	<i>S. felis</i> V860 MCRF	<i>S. felis</i> V248 MCRF	<i>S. felis</i> V818 MCRF	<i>S. felis</i> DSM 7377T BRB	<i>S. felis</i> V461 MCRF	<i>S. felis</i> V766 MCRF	<i>S. delphini</i> CCUG 51769 CCUG	<i>S. schleiferi</i> ssp schleiferi DSM 4809 DSM
BCI 056/ 19	Feli no	<i>S. spp</i>	<i>S. felis</i> DSM 7377T BRB	<i>S. felis</i> V351 MCRF	<i>S. felis</i> DSM 7377T	<i>S. felis</i> V248 MCRF	<i>S. felis</i> V461 MCRF	<i>S. felis</i> V818 MCRF	<i>S. felis</i> V766 MCRF	<i>S. felis</i> V766 MCRF	<i>S. haemolyticus</i> Mb18803_2 CHB	<i>S. felis</i> V860 MCRF
PcBj -1	Feli no	<i>S. spp</i>	<i>S. xyloso</i> DSM 20266T DSM	<i>S. xyloso</i> DSM 20267 DSM	<i>S. xyloso</i> DSM 6179 DSM 2	<i>S. xyloso</i> DSM 6179 DSM	<i>S. xyloso</i> DSM FI FLR	<i>S. xyloso</i> DSM 20266T DSM 2	<i>S. xyloso</i> DSM 20267 DSM 2	<i>S. xyloso</i> ssp saprophyticus DSM 4853 DSM	<i>S. xyloso</i> ssp saprophyticus DSM 4852 DSM	<i>S. equorum</i> ssp equorum DSM 20675 DSM
PcV p-36	Feli no	<i>S. spp</i>										
BCI 015/ 18	Can ino	<i>S. xyloso</i>										

Range	
0.000 ... 1.699	not reliable identification
1.700 ... 1.999	probable genus identification
2.000 ... 2.299	secure genus identification, probable species identification
2.300 ... 3.000	highly probable species identification
NI - Not Identified	