



INSTITUTO DE HIGIENE E
MEDICINA TROPICAL
DESDE 1902

Universidade Nova de Lisboa
Instituto de Higiene e Medicina Tropical

Estudo do efluxo e de outros mecanismos na resistência a fluoroquinolonas
em *Staphylococcus pseudintermedius*

Bárbara Morais Ramos de Deus Ramos

DISSERTAÇÃO PARA A OBTENÇÃO DO GRAU DE MESTRE EM CIÊNCIAS BIOMÉDICAS
ESPECIALIDADE EM BIOLOGIA MOLECULAR EM SAÚDE TROPICAL E INTERNACIONAL

OUTUBRO, 2021



INSTITUTO DE HIGIENE E
MEDICINA TROPICAL
DESDE 1902

Universidade Nova de Lisboa
Instituto de Higiene e Medicina Tropical

Estudo do efluxo e de outros mecanismos na resistência a fluoroquinolonas
em *Staphylococcus pseudintermedius*

Autor: Bárbara Morais Ramos de Deus Ramos

Orientadora: Professora Doutora Isabel Couto (IHMT/NOVA)

Coorientadora: Doutora Sofia Santos Costa (IHMT/NOVA)

Dissertação apresentada para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Ciências Biomédicas, Especialidade em Biologia Molecular em Saúde Tropical e Internacional

Apoio financeiro do projeto BIOSAFE, ref^a LISBOA-01-0145-FEDER-030713, PTDC/CAL-EST/30713/2017, financiado pelo Fundo Europeu de Desenvolvimento Regional (FEDER)/Fundação para a Ciência e Tecnologia (FCT).

Comunicações

Os resultados desta Dissertação foram incluídos, em co-autoria, nas seguintes comunicações sob a forma de Posters:

Catarina Morais, Sofia Santos Costa, Mariana Andrade, **Bárbara Ramos**, Marta Leal, Patrícia Abrantes, Constança Pomba, Isabel Couto. 2021. Clonal lineages of *Staphylococcus pseudintermedius* associated with skin and soft tissue infections in pets. 31st European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases (ECCMID), 9-12 julho, online. *Aceite para apresentação sob forma de poster.*

Bárbara Ramos, Sofia Santos Costa, Marta Leal, Catarina Morais, Constança Pomba and Isabel Couto. Fluoroquinolone resistance and associated mechanisms in *Staphylococcus pseudintermedius*. Congresso Nacional de Microbiologia e Biotecnologia (MicroBiotec21), 23-26 novembro 2021, online. *Aceite para apresentação sob forma de poster.*

Marta Leal, Sofia Santos Costa, **Bárbara Ramos**, Catarina Morais, Carolina Ferreira, Constança Pomba, Isabel Couto. Evaluation of efflux activity in *Staphylococcus pseudintermedius* and its contribution for biocide decreased susceptibility. Congresso Nacional de Microbiologia e Biotecnologia (MicroBiotec21), 23-26 novembro 2021, online. *Aceite para apresentação sob forma de poster.*

Catarina Morais, Sofia Santos Costa, Mariana Andrade, **Bárbara Ramos**, Marta Leal, Patrícia Abrantes, Constança Pomba, Isabel Couto. Molecular characterization of *Staphylococcus pseudintermedius* associated with skin and soft tissue infections in pets, Portugal. Congresso Nacional de Microbiologia e Biotecnologia (MicroBiotec21), 23-26 novembro 2021, online. *Aceite para apresentação sob forma de poster.*

Agradecimentos

Chegando ao final desta etapa, pretendo expressar a minha gratidão a todos os que contribuíram para a realização deste trabalho e me acompanharam ao longo deste percurso.

À minha orientadora, Professora Doutora Isabel Couto,

por toda a disponibilidade, empenho e interesse demonstrados ao longo deste trabalho, por toda a ajuda e confiança que depositou em mim. Por todos os conselhos e conhecimentos transmitidos, permitindo a realização desta Dissertação.

À minha coorientadora, Doutora Sofia Santos Costa,

por todos o apoio e dedicação desde os primeiros instantes, por toda a ajuda e paciência durante a realização deste trabalho, por todo o conhecimento que me transmitiu e por todo o incentivo com que acompanhou o meu percurso até ao fim.

À Professora Doutora Constança Pomba,

do Laboratório de Resistência aos Antibióticos e Biocidas da Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade de Lisboa, pela disponibilização dos isolados de *S. pseudintermedius* estudados neste trabalho.

À Doutora Patrícia Abrantes,

por toda a disponibilidade e ajuda na análise estatística deste trabalho.

À Catarina e Carolina,

por toda a amizade, ajuda e apoio dado ao longo deste trabalho, por todos os momentos e por terem estado lá sempre que precisei de um conselho.

Aos restantes membros da Unidade de Microbiologia Médica,

pelas condições laboratoriais disponibilizadas, que permitiram a realização deste trabalho.

À minha família,

em especial à minha mãe e irmão, por todo o carinho, paciência e amor. Pelo apoio incondicional que me deram, por acreditarem mais em mim do que eu, e pela motivação constante que me permitiu chegar ao final desta etapa.

Ao João,

por me ouvir como ninguém durante este trabalho, por todo o amor e apoio em qualquer altura do dia. Por nunca duvidar que seria capaz de terminar este desafio. “Obrigado” não é suficiente para demonstrar que foste o meu amparo diário. Podes rever-te neste trabalho também. Obrigado por todos os segundos ao meu lado e por seres o melhor de ti para mim!

Resumo

Staphylococcus pseudintermedius é uma bactéria colonizadora da pele e mucosas do cão, podendo ser também encontrada em gatos. Esta bactéria é o principal agente etiológico do pioderma superficial bacteriano canino e uma das principais causas para tratamento sistêmico com recurso a antibióticos em animais de companhia. Este trabalho teve como principal objetivo estudar a atividade de efluxo em *S. pseudintermedius* e a sua relevância na resistência a compostos antimicrobianos efluxáveis como as fluoroquinolonas, utilizando o brometo de etídeo (EtBr) como marcador indireto da atividade de efluxo. Estudou-se um conjunto de 52 *S. pseudintermedius*, associados a infeções da pele e dos tecidos moles (SSTIs) em cães e gatos, isolados em dois laboratórios de diagnóstico veterinário do distrito de Lisboa, Portugal.

Numa primeira abordagem, foi determinada a concentração mínima inibitória (CMI) para o EtBr e a distribuição deste valor utilizada para definir o valor de *cut-off* (CO_{WT}) possibilitando a separação da população *wild-type* (WT) e *non wild-type* (NWT) para este composto. Estabeleceu-se um CO_{WT} de 8 mg/L e a aplicação deste valor à coleção em estudo indicou a inexistência de uma população NWT para o EtBr. Posteriormente, a CMI_{EtBr} foi determinada na presença dos inibidores de efluxo (IEs) verapamil e tioridazina. Estes IEs promoveram uma redução da CMI_{EtBr}, sugerindo a presença de atividade de efluxo nestes isolados. A pesquisa dos genes plasmídicos *qacA/B* e *smr*, que codificam para bombas de efluxo MDR com capacidade para extrusar compostos como o EtBr, foi realizada no grupo de 52 isolados tendo-se posteriormente estendido a toda a coleção de 157 *S. pseudintermedius* disponível, não se tendo encontrado nenhum dos genes.

Numa segunda abordagem, e porque o efluxo tem sido implicado na resistência a fluoroquinolonas (FQ) noutras espécies de estafilococos, determinou-se a CMI da ciprofloxacina (CMI_{CIP}) na presença e ausência dos mesmos compostos IEs. Os valores obtidos para a CMI_{CIP} variaram entre 0,06-64 mg/L. Na presença dos dois IEs apenas se verificou diminuição significativa da CMI_{CIP} em três isolados, todos eles suscetíveis à CIP e à metilicina. Esta aparente ausência de efluxo pode estar encoberta pela presença de mutações nas zonas *quinolone-resistance determining region* (QRDR) dos genes alvo *grlA* e *gyrA*. Estas mutações foram pesquisadas para 42 isolados dos 52 em estudo, revelando que 27 apresentam pelo menos uma mutação QRDR. Todas estas mutações já tinham sido previamente descritas, com exceção da mutação Asp83Asn de GyrA, identificada pela primeira vez neste trabalho para *S. pseudintermedius*. Assim, verificou-se que a resistência a FQ nesta bactéria ocorre maioritariamente por mutações nos genes alvo. Verificou-se ainda a presença de atividade de efluxo basal, revelando o potencial de emergência de resistências pela exposição a estes antibióticos através da ativação de sistemas de efluxo.

Os resultados obtidos nesta Dissertação refletem a necessidade de uma abordagem Uma Só Saúde, que reconhece a importância de uma visão global da saúde humana, animal e do meio ambiente para uma resposta adequada e eficaz aos principais desafios de saúde na atualidade, como é a resistência aos antimicrobianos.

Palavras-chave: *Staphylococcus pseudintermedius*; efluxo; resistência a fluoroquinolonas; mutações QRDR; Uma Só Saúde.

Abstract

Staphylococcus pseudintermedius is a bacterium that colonizes the skin and mucous membranes of dogs and can also be found in cats. This bacterium is the main etiological agent of superficial bacterial canine pyoderma and one of the main causes for systemic treatment using antibiotics in companion animals. The main objective of this work was to study the efflux activity in *S. pseudintermedius* and its relevance in the resistance to effluxable antimicrobial compounds such as fluoroquinolones, using ethidium bromide (EtBr) as an indirect marker of efflux activity. A set of 52 *S. pseudintermedius*, associated with skin and soft tissue infections (SSTIs) in dogs and cats, isolated at two veterinary diagnostic laboratories in the district of Lisbon, Portugal, was studied.

In a first approach, the minimum inhibitory concentration (MIC) for EtBr was determined and the distribution of this value used to define the cut-off value (CO_{WT}) enabling the separation of the wild-type (WT) and non wild-type (NWT) population for this compound. A CO_{WT} value of 8 mg/L was established and the application of this value to the collection under study indicated the inexistence of an NWT population for EtBr. Subsequently, CMI_{EtBr} was determined in the presence of the compounds verapamil and thioridazine, known as efflux inhibitors (EIs). These EIs promoted a reduction in CMI_{EtBr}, suggesting the presence of efflux activity in these isolates. The search for plasmid genes *qacA/B* and *smr*, encoding MDR efflux pumps with the capacity to extrude compounds such as EtBr, was carried out in a group of 52 isolates and was later extended to the entire collection of 157 isolates of *S. pseudintermedius* available at the host laboratory. None of the genes were found.

In a second approach, and because efflux has been implicated in fluoroquinolone (FQ) resistance in other staphylococcal species, ciprofloxacin MIC (CMI_{CIP}) was determined in the presence and absence of the same EIs. The values obtained for CMI_{CIP} ranged between 0.06-64 mg/L. In the presence of the two EIs, there was only a significant decrease in CMI_{CIP} in three isolates, all of them susceptible to CIP and methicillin (MSSP). This apparent absence of efflux may be overshadowed by the presence of mutations in the quinolone-resistance determining region (QRDR) of the *grrA* and *gyrA* target genes. These mutations were searched for 42 isolates of the 52 *S. pseudintermedius*, revealing that 27 have at least one QRDR mutation. All these mutations have been previously described except the GyrA mutation Asp83Asn, identified for the first time in this work for *S. pseudintermedius*. Thus, it was found that FQ resistance in this bacterium occurs mainly through mutations in target genes. It was also verified the presence of basal efflux activity, revealing the potential for emergence of resistance by exposure to these antibiotics through the activation of efflux systems.

The results obtained in this Dissertation support the need for a One Health approach, which recognizes the relevance of a global perspective of the human, animal and environmental health for an adequate and effective response to the main health challenges, such as antimicrobial resistance

Keywords: *Staphylococcus pseudintermedius*; efflux; fluoroquinolone resistance; QRDR mutations; One Health.

Índice Geral

Agradecimentos.....	iii
Resumo.....	v
Abstract.....	vii
Índice de Figuras.....	xi
Índice de Tabelas.....	xiii
Lista de Abreviaturas	xv
Lista de Unidades	xvii
1. Introdução.....	1
1.1. O Género <i>Staphylococcus</i>	1
1.2. <i>Staphylococcus pseudintermedius</i>	2
1.2.1. Características gerais	2
1.2.2. Importância de <i>S. pseudintermedius</i> em medicina veterinária	4
1.2.3. Potencial zoonótico de <i>S. pseudintermedius</i>	6
1.2.4. Terapêutica de infeções causadas por <i>S. pseudintermedius</i>	7
1.3. Resistência aos agentes antimicrobianos.....	8
1.3.1. Agentes antimicrobianos.....	9
1.3.2. Mecanismos de resistência a antibióticos	10
1.3.3. Mecanismos de resistência a biocidas.....	11
1.4. Resistência mediada por sistemas de efluxo	12
1.4.1. Sistemas de efluxo bacterianos	12
1.4.2. Sistemas de efluxo em estafilococos.....	14
1.5. O papel do efluxo na resistência a Fluoroquinolonas.....	17
1.6. Metodologias para a caracterização da atividade de efluxo	18
1.6.1. Determinação da concentração mínima inibitória de EtBr	19
1.6.2. Determinação de concentração mínima inibitória na presença de inibidores de efluxo	19
1.7. Objetivos da Dissertação	21
2. Materiais e Métodos	23
2.1. Materiais.....	23
2.1.1. Coleção bacteriana em estudo e estirpes de referência	23
2.1.1. Outro material biológico	24
2.1.2. Meios de cultura e soluções	24
2.2. Métodos.....	26

2.2.1. Crescimento e manutenção das estirpes bacterianas	26
2.2.2. Determinação de Concentrações mínimas inibitórias	26
2.2.3. Determinação de Concentrações mínimas inibitórias na presença de inibidores de efluxo ...	28
2.2.4. Detecção de população <i>non wild-type</i> para o EtBr	28
2.2.5. Detecção de mutações nas regiões QRDR dos genes <i>grrA</i> e <i>gyrA</i>	29
2.2.6. Pesquisa por PCR dos genes <i>qacA/B</i> e <i>smr</i>	30
2.2.7. Análise estatística	30
3. Resultados	31
3.1. Caracterização fenotípica das estirpes de <i>S. pseudintermedius</i>	31
3.2. Determinação de concentrações mínimas inibitórias de Brometo de Etídeo.....	31
3.3. Detecção de população <i>non wild-type</i> para o EtBr.....	32
3.4. Determinação de concentrações mínimas inibitórias para a ciprofloxacina	33
3.5. Análise da atividade de efluxo utilizando o EtBr como marcador	36
3.5.1. Determinação de concentrações mínimas inibitórias dos inibidores de efluxo.....	36
3.5.2. Efeito dos inibidores de efluxo na CMI do EtBr.....	36
3.5.3. Detecção dos genes plasmídicos <i>qacA/B</i> e <i>smr</i>	41
3.6. Análise dos mecanismos de resistência às fluoroquinolonas: Efluxo vs mutações no alvo	42
3.6.1. Efeito dos inibidores de efluxo na CMI da CIP	42
3.6.2. Detecção de mutações que conferem resistência a fluoroquinolonas	44
4. Discussão	47
5. Referências Bibliográficas	57
6. ANEXOS	73

Índice de Figuras

Figura 1 Representação dos alvos dos antibióticos e principais mecanismos de resistência	11
Figura 2 Representação esquemática das diferentes famílias de bombas de efluxo MDR	13
Figura 3 Esquema de preparação de cada placa para determinação de CMIs pelo método de microdiluição	27
Figura 4 Distribuição dos valores de CMI_{EtBr} para isolados MRSP e isolados MSSP	32
Figura 5 Distribuição de CMI_{EtBr} para os 52 <i>S. pseudintermedius</i> estudados e respectivo valor de <i>cut-off</i>	32
Figura 6 Distribuição dos valores de CMI_{CIP} para isolados MRSP e isolados MSSP	33
Figura 7 Comparação do efeito dos inibidores VER e TZ na diminuição da CMI_{EtBr} em isolados MSSP	39
Figura 8 Comparação do efeito dos inibidores VER e TZ na diminuição da CMI_{EtBr} em isolados MRSP	39
Figura 9 Eletroforese em gel de agarose a 1% dos produtos de amplificação de um fragmento interno ao gene <i>qacA/B</i> (a) e ao gene <i>smr</i> (b)	41
Figura 10 Comparação do efeito dos inibidores de efluxo em estudo na diminuição da CMI_{CIP} em isolados MSSP	42
Figura 11 Comparação do efeito dos inibidores de efluxo em estudo na diminuição da CMI_{CIP} em isolados MRSP	43
Figura 12 Eletroforese em gel de agarose a 1% dos produtos de amplificação de um fragmento interno ao gene <i>grlA</i> (a) e ao gene <i>gyrA</i> (b)	44
Figura 13 Gráfico representativo das mutações encontradas na região QRDR de <i>GrlA</i> e <i>GyrA</i> dos <i>S. pseudintermedius</i> em estudo e sua relação com valores de CMI_{CIP}	53

Índice de Tabelas

Tabela 1. Características fenotípicas úteis para discriminação entre <i>S. aureus</i> e <i>S. pseudintermedius</i>	3
Tabela 2. Recomendações de terapêutica antimicrobiana tópica para o tratamento de foliculite superficial bacteriana em cães	7
Tabela 3. Recomendações de terapêutica sistêmica para o tratamento de foliculite superficial bacteriana em cães.	8
Tabela 4. Classes de antibióticos classificadas como Agentes Antimicrobianos Veterinários Criticamente Importantes.....	10
Tabela 5. Caracterização das cinco famílias de bombas de efluxo MDR bacterianas.	13
Tabela 6. Principais bombas de efluxo MDR plasmídicas descritas para <i>S. aureus</i> e <i>S. pseudintermedius</i>	16
Tabela 7. Principais bombas de efluxo MDR cromossômicas descritas para <i>S. aureus</i>	17
Tabela 8. Alterações na subunidade da topoisomerase IV GrlA e na subunidade do DNA girase GyrA de <i>S. pseudintermedius</i> associadas a resistência a fluoroquinolonas	18
Tabela 9. Estirpes de referência utilizadas.	23
Tabela 10. Sequências nucleotídicas dos <i>primers</i> utilizados e tamanho esperado do amplicão em pares de bases.	24
Tabela 11. Preparação e composição dos meios de cultura utilizados.	25
Tabela 12. Preparação e composição das soluções tampão utilizadas.	25
Tabela 13. Preparação e composição dos compostos utilizados ao longo do trabalho.	25
Tabela 14. Gamas de concentrações testadas para a determinação de CMI _{ETBr} , CMI _{CIP} e dos IEs VER e TZ.	27
Tabela 15. Caracterização fenotípica dos isolados de <i>S. pseudintermedius</i>	35
Tabela 16 Efeito dos inibidores de efluxo TZ e VER no valor da CMI _{ETBr} e CMI _{CIP} para a coleção de <i>S. pseudintermedius</i> em estudo.....	37
Tabela 17. Relação entre a presença de mutações na região QRDR de <i>grlA</i> e <i>gyrA</i> e perfil de resistência a fluoroquinolonas para um conjunto de 43 <i>S. pseudintermedius</i>	45
Tabela 18. Isolados de <i>S. pseudintermedius</i> com diminuição da CMI _{CIP} na presença de inibidores de efluxo.	51
Tabela A1. Características da coleção de isolados de <i>S. pseudintermedius</i> utilizada nesta Dissertação.....	73

Lista de Abreviaturas

AG – Aminoglicosídeos

Arg – Arginina

Asn – Asparagina

Asp – Ácido Aspártico

CIP – Ciprofloxacina

CLSI – *Clinical Laboratory Standard Institute*, E.U.A.

CMI – Concentração mínima inibitória

CMI_{CIP} – Concentração mínima inibitória da ciprofloxacina

CMI_{EtBr} – Concentração mínima inibitória do brometo de etídeo

CO_{WT} – Valor de corte da população *wild-type*

DNA – Ácido desoxirribonucleico, de *Deoxyribonucleic acid*

ENR – Enrofloxacin

EtBr – Brometo de etídeo

EUCAST – *The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing*, Suécia

FEN – Fenicóis

FQ – Fluoroquinolonas

FUS – Fusidanos

Fw – *Forward*

Glu – Ácido glutâmico

Gly – Glicina

I – Intermédio

IE – Inibidores de efluxo

Ile – Isoleucina

L – Lincosamidas

Leu – Leucina

M – Macrólidos

MDR – Multirresistência, de *Multidrug resistance*

MFS – *Major Facilitator Superfamily*

MOX – Moxifloxacina

MRSA – *Staphylococcus aureus* resistente à metilina, de *Methicillin-resistant Staphylococcus aureus*

MRSP – *Staphylococcus pseudintermedius* resistente à metilina, de *Methicillin resistant Staphylococcus pseudintermedius*

MSSP – *Staphylococcus pseudintermedius* suscetível à metilina, de *Methicillin susceptible Staphylococcus pseudintermedius*

NWT – *non-wild type*

OXA – Oxacilina

PBP – Proteínas de ligação à penicilina, de *Penicillin-binding proteins*

PCR – Reação de polimerase em cadeia, de *Polymerase chain reaction*

PEN – Penicilina

Phe – Fenilalanina

PRA – Pradofloxacina

Pro – Prolina

QAC – Compostos de amónio quaternário, de *Quaternary ammonium compounds*

QRDR – *Quinolone Resistance-Determining Region*

R – Resistente

RIF – Rifampicina

Rv – *Reverse*

S – Suscetível

Ser – Serina

SIG – *Staphylococcus intermedius group*

SMR – *Small Multidrug Resistance*

SSTIs – Infecções da pele e dos tecidos moles, de *skin and soft tissue infections*

SXT – Trimetopim-sulfametoxazole

TET – Tetraciclina

Tyr – Tirosina

TZ – Tioridazina

VER – Verapamil

WT – *Wild-type*

Lista de Unidades

μL – microlitro; **mL** – mililitro; **L** – Litro

μM – micromolar; **mM** – milimolar

kDa – Kilodalton

mg – miligrama; **g** – grama

μm – micrómetro; **mm** – milímetro

°C – Graus Celsius

pb – pares de bases; **Kb** – Kilo base

rpm – rotações por minuto

V – Volt

1. Introdução

1.1. O Género *Staphylococcus*

O género *Staphylococcus*, pertencente à família *Staphylococcaceae*, é constituído por bactérias de coloração Gram-positiva, as quais apresentam um crescimento padrão semelhante a cachos de uvas, podendo também apresentar-se como células isoladas, em pares ou em cadeias curtas [1]. Atualmente, o género *Staphylococcus* inclui 60 espécies, baseando-se esta classificação em diversas diferenças genotípicas e fenotípicas [2]. De um modo geral, os estafilococos apresentam 0,5 a 1,5 µm de diâmetro, não possuem mobilidade e não formam esporos. São bactérias anaeróbias facultativas, capazes de crescer em elevadas concentrações salinas (até 10% de cloreto de sódio) e temperaturas que podem variar entre os 18°C e os 40°C [1,3].

Estas bactérias crescem rapidamente em meios nutritivos ou de enriquecimento após 24 horas de incubação. As colónias apresentam-se redondas, elevadas, lisas e brilhantes com cerca de 1 a 5 mm de diâmetro e com coloração que varia entre o branco-acinzentado e o amarelado/alaranjado em meio agar de sangue [4]. Estas bactérias dividem-se ainda em estafilococos produtores de coagulase e não produtores de coagulase, de acordo com a sua capacidade de produzir a enzima coagulase, a qual transforma o fibrinogénio em fibrina [1].

Os estafilococos são um grupo de bactérias com elevada importância em medicina humana e veterinária, sendo a causa de diversas infeções de severidade variável. *Staphylocococcus aureus* é um importante agente patogénico em humanos, sendo responsável por várias infeções associadas a cuidados de saúde como bacteriemias, endocardites infecciosas, infeções associadas a dispositivos prostéticos e infeções associadas à comunidade, com particular incidência em infeções da pele e dos tecidos moles (SSTIs, de *Skin and Soft Tissue Infections*) [5]. Outras espécies não produtoras de coagulase, como *Staphylococcus epidermidis*, são também agentes de infeções oportunistas em humanos, particularmente associadas a infeções endógenas com incidência em indivíduos imunocomprometidos portadores de dispositivos médicos como cateteres intravasculares, *pacemakers* e implantes prostéticos [6]. Em animais de companhia, principalmente cães e gatos, as espécies produtoras de coagulase

Staphylococcus pseudintermedius, *Staphylococcus coagulans* e *S. aureus* são as mais frequentemente associadas a infecções SSTIs, infecções cirúrgicas, bacteriemias, infecções oculares e endocardites [4, 7-9]. Por sua vez, em animais de produção, a espécie *S. aureus* é frequentemente associada a mastites, dermatites, abscessos, artrite séptica e septicemia [10]. Os estafilococos apresentam vários fatores estruturais e produtos secretados que desempenham um papel importante na patogênese da infecção como a cápsula bacteriana, a parede celular e enzimas associadas, o peptidoglicano, os ácidos teicóicos, as proteínas de adesão e a membrana citoplasmática [4, 6, 11].

1.2. *Staphylococcus pseudintermedius*

1.2.1. Características gerais

A espécie *S. pseudintermedius* pertence ao grupo dos *Staphylococcus intermedius* (SIG, de *Staphylococcus intermedius group*), o qual inclui as espécies *S. intermedius*; *S. pseudintermedius*; *Staphylococcus delphini* e *Staphylococcus cornubiensis* [12]. Em 2020, foi descrita a espécie *Staphylococcus ursi* tendo sido proposta a sua inclusão no grupo SIG [13]. No entanto, a proposta taxonômica de *S. ursi* encontra-se ainda pendente de validação [3].

Durante cerca de 30 anos, *S. intermedius* foi considerado o principal agente de infecções SSTIs associadas a animais. Esta espécie foi descrita pela primeira vez, em 1976, por Hajek tendo sido isolada inicialmente em pombos, cães, martas e cavalos [14]. No entanto, foram-se observando níveis elevados de diversidade, tanto fenotípica como genotípica, sugerindo a existência de mais do que uma espécie [15]. Estudos moleculares posteriores suportaram uma reclassificação dos isolados anteriormente identificados como *S. intermedius*, *S. pseudintermedius* ou *S. delphini*, sendo considerado que os isolados de origem canina pertenceriam à espécie *S. pseudintermedius* [16-18]. A espécie *S. pseudintermedius* foi descrita pela primeira vez em 2005 por Devriese e colegas, tendo sido isolada de tecido pulmonar, lesão de pele, lesão de ouvido e tecido hepático em quatro animais distintos, gato, cavalo, cão e papagaio, respetivamente [19]. Atualmente, *S. pseudintermedius* é considerado o principal agente bacteriano da flora comensal ou de locais de infecção da pele em cães [20].

A identificação de *S. pseudintermedius* é tradicionalmente realizada através da visualização da morfologia das bactérias em microscópio ótico e por testes fenotípicos.

As colônias caracterizam-se por apresentarem tamanho médio (1-2 mm), serem convexas, não pigmentadas, opacas, formando um padrão de α -hemólise ou β -hemólise em meios suplementados com sangue de ovelha ou bovino [15].

Embora *S. pseudintermedius* seja produtor de coagulase, em laboratórios de microbiologia humana, são muitas vezes identificados como não produtores desta enzima já que os testes comerciais geralmente utilizados detetam a proteína A ou antígenos de superfície específicos para *S. aureus* [15]. Desta forma, é recomendada a utilização de uma gama mais alargada de testes fenotípicos para a diferenciação de *S. pseudintermedius* de outras espécies de estafilococos clinicamente relevantes, como o teste de produção de acetoína, o fator de aglutinação, β -galactosidase e o teste de resistência à polimixina B [15], como representado na Tabela 1.

Tabela 1. Características fenotípicas úteis para discriminação entre *S. aureus* e *S. pseudintermedius*. Adaptado de [15].

	Espécie de <i>Staphylococcus</i>	
	<i>S. aureus</i>	<i>S. pseudintermedius</i>
Catalase	+	+
Coagulase	+	+
Fator de aglutinação	+	-
Pigmentação	+	-
PYR	-	-
β-galactosidase	-	+
Produção de acetoína	+	-
Fermentação do manitol	+	+
Maltose	+	+
Polimixina B	R	S
Polimixina E (10 μg)	R	R

+, 90% ou mais de estirpes positivas; -, 90% ou mais de estirpes negativas; PYR: Pyrrolidonyl-arylamidase; R: Resistente; S: Suscetível

Em alternativa aos testes fenotípicos, a identificação de *S. pseudintermedius* pode ser realizada através de métodos moleculares sendo estes importantes para a sua diferenciação de *S. aureus*. Através da sequenciação do gene *nuc* que codifica para uma termonuclease, é possível desenhar *primers* específicos que permitem a identificação de *S. pseudintermedius* por métodos de PCR [21]. Nos últimos anos, tem sido proposto o uso de outros marcadores moleculares para identificação de *S. pseudintermedius*, como a amplificação de uma região interna do gene *spsJ*, específica da espécie *S. pseudintermedius* [22].

S. pseudintermedius é um agente patogénico oportunista que faz parte da microflora cutânea normal de animais de companhia saudáveis, com particular incidência no cão, colonizando a pele, folículos pilosos e as mucosas, podendo ser também isolado das narinas, boca, faringe, testa, virilhas e ânus [23]. Esta espécie é o principal agente de pioderma canino, estando também associado a otites e infeções do trato urinário inferior, principalmente quando existe perda da integridade da pele ou quando o sistema imune do animal se encontra comprometido [23, 24]. O conhecimento acerca da patogénese e do potencial de virulência de *S. pseudintermedius* ainda é reduzido. No entanto, diversos estudos têm demonstrado que os fatores de virulência deste microrganismo são, em muito, semelhantes aos observados em *S. aureus*. Estes fatores de virulência dividem-se em quatro grandes grupos; enzimas (e.g coagulase, lipase), toxinas (citotoxinas, toxinas esfoliativas e enterotoxinas), proteínas de superfície e proteínas associadas à produção de biofilme [15, 25, 26].

1.2.2. Importância de *S. pseudintermedius* em medicina veterinária

A espécie *S. pseudintermedius* constitui cerca de 90% dos isolados de *Staphylococcus* spp. colhidos em cães saudáveis ou com doenças dermatológicas [9]. Este microrganismo tem a capacidade de aderir às células epidérmicas da pele de animais saudáveis, sendo esta capacidade de adesão superior em animais com dermatite atópica prévia [26, 27]. A relevância de *S. pseudintermedius* em medicina veterinária advém não só do potencial patogénico desta espécie, incluindo um vasto leque de fatores de virulência, mas também da sua capacidade em adquirir resistência a diversas classes de agentes antimicrobianos. Devido a estas características, as infeções causadas por esta espécie, em particular o pioderma canino, são frequentemente recorrentes [20].

Nas últimas duas décadas tem sido registado um aumento contínuo da resistência a agentes antimicrobianos em *S. pseudintermedius*, em particular de estirpes resistentes à meticilina [7]. As primeiras estirpes, identificadas na Europa, de *S. pseudintermedius* resistente à meticilina (MRSP, de *methicilin-resistant Staphylococcus pseudintermedius*) reportam ao início do ano 2000 num estudo conduzido por Loeffler *et al.* em 2007. Neste estudo foram identificados 12 isolados MRSP num total de 61 isolados em estudo [28]. Desde então, a frequência de estirpes MRSP tem aumentado significativamente na Europa, variando entre 2% na Finlândia, 16,9% em França, até 33% em Itália [29]. No entanto noutras regiões, como no Japão, a frequência de MRSP varia entre 30% a 90%

[30, 31], enquanto nos Estados Unidos da América a frequência de MRSP é de cerca de 7% em cães com doenças dermatológicas subjacentes como pioderma canino [32, 33]. Em Portugal, existem poucos estudos com foco na prevalência de MRSP. Em 2016, foi realizado o primeiro estudo retrospectivo que analisou uma amostra total de 632 isolados de *Staphylococcus* spp. obtidos de animais de companhia entre 1999 e 2014. Este estudo descreve uma prevalência de 8,7% de MRSP, num total de 446 *S. pseudintermedius* associados maioritariamente a otites, mas também a pioderma, infeções do trato urinário, infeções cirúrgicas ou outros tipos de infeção [34]. Também neste estudo foi possível verificar um aumento significativo da resistência à meticilina e fluoroquinolonas ao longo do tempo [34]. Num estudo mais recente, que utilizou uma amostra total de 31 isolados de *S. pseudintermedius* associados a SSTIs, recolhidos entre 2019 e 2020 em Lisboa, todos eram MRSP, no entanto, apenas animais sob terapia prévia com antibióticos cujo tratamento não foi eficaz foram selecionados para o estudo [35].

À semelhança de outras espécies de estafilococos, a resistência à meticilina em *S. pseudintermedius* é mediada pelo gene *mecA* que codifica para uma proteína de ligação à penicilina (PBP, de *penicilin binding protein*) adicional, denominada PBP2a [28, 36]. Os antibióticos beta-lactâmicos atuam por ligação às PBPs, impedindo a construção da parede celular e resultando em morte celular. Em estirpes de *Staphylococcus aureus* resistente à meticilina (estirpes MRSA, de *Methicillin-resistant Staphylococcus aureus*), a PBP2a apresenta uma menor afinidade para os beta-lactâmicos, conferindo resistência a todos os antibióticos desta classe com exceção das cefalosporinas de 5ª geração [36]. A proteína PBP2a garante a continuidade da construção da parede celular, permitindo a sobrevivência da bactéria [37]. O gene *mecA* encontra-se localizado num elemento genético móvel designado por cassete cromossómica estafilocócica (SCC*mec*), o qual se integra no cromossoma da bactéria, podendo ser transferido entre espécies de estafilococos [28, 36, 37].

As estirpes MRSP constituem um problema na medicina veterinária dado que as opções terapêuticas disponíveis para o seu tratamento são bastante limitadas. Um estudo verificou que 0-4,5% de cães saudáveis são colonizados por MRSP como parte da sua flora habitual [23]. Para além disso, as estirpes MRSP apresentam muitas vezes resistência a outras classes de antibióticos, estando frequentemente associadas a fenótipos de multirresistência (MDR, de *multidrug resistance* – resistência a pelo menos um antibiótico de três classes de antibióticos distintas) [23, 38-40]. A emergência destes

fenótipos MDR levaram a que antibióticos utilizados em medicina humana fossem usados para o tratamento de infecções causadas por estas estirpes [23, 35, 41-44].

Dentro desta problemática surge o conceito *One Health*, que relaciona a saúde humana, animal e do meio ambiente, reconhecendo a ligação entre estas vertentes e a necessidade de as analisar segundo uma visão global para uma resposta adequada e eficaz aos problemas de saúde nas suas vertentes animais ou humanas [44].

1.2.3. Potencial zoonótico de *S. pseudintermedius*

S. pseudintermedius raramente coloniza a pele dos humanos, embora a taxa de colonização aumente quando existe um contacto regular com animais colonizados e/ou infetados por este microrganismo [27, 45]. Esta espécie é considerada um agente patogénico zoonótico, sendo a infeção possível através de feridas ou mordidas de animais colonizados ou infetados por *S. pseudintermedius* [21]. Em 2006, Hoovels *et al.* descreveram o primeiro caso de infeção por *S. pseudintermedius* em humanos [46], mas só em 2010 foi descrito, por Chuang *et al.*, o primeiro episódio de infeção humana por transmissão direta animal-humano [47]. Apesar da infeção por *S. pseudintermedius* no humano não ser muito frequente, vários casos têm sido descritos nas últimas décadas [48-55]. Todos os casos reportados têm sido associados a infeções de pele e feridas em pós-operatório [51-53], endocardite [46, 54] e infeções associadas a implantes e cateteres [47-49], sendo o contacto com animais de companhia transversal a todos os casos identificados, com exceção das infeções reportadas por Hoovels *et al.* [46] e Gagetti *et al.* [53]. No entanto, as infeções reportadas causadas por *S. pseudintermedius* em humanos podem encontrar-se subdiagnosticadas, uma vez que o diagnóstico microbiológico laboratorial, geralmente não inclui a diferenciação entre *S. pseudintermedius* e *S. aureus* [56].

Uma das principais preocupações associada ao potencial zoonótico de *S. pseudintermedius* prende-se com a infeção humana por estirpes MRSP, tendo sido estas classificadas como um perigo microbiológico direto para a saúde humana [57]. Nos casos de infeção acima descritos, verifica-se que a infeção tanto pode ocorrer por estirpes de *S. pseudintermedius* suscetível à meticilina (MSSP, de *methicilin-susceptible Staphylococcus pseudintermedius*) [47, 48, 54, 55] como por MRSP [50-53]. No caso de

infecções por MRSP, o aparecimento de resistência adicional a antibióticos da classe dos beta-lactâmicos torna-se um desafio à terapêutica [53].

1.2.4. Terapêutica de infecções causadas por *S. pseudintermedius*

O tratamento de infecções causadas por *S. pseudintermedius*, em particular SSTIs no cão, é baseado numa combinação entre terapêutica tópica e terapêutica sistémica, como exemplificado pelas recomendações para a terapêutica de foliculite superficial bacteriana, descritas na Tabela 2. A terapêutica tópica baseia-se na utilização de antibióticos tópicos e/ou antissépticos, tendo como vantagens uma diminuição da duração da terapêutica antibiótica sistémica e de possíveis efeitos adversos [7]. Para além disso, a terapêutica tópica ajuda na restauração da integridade da pele, acelerando a recuperação do tecido lesionado, tendo surgido como opção relevante à medida que as opções de terapêutica sistémica se tornam mais limitadas [7].

Os antibióticos tópicos e antissépticos são aplicados sob a forma de várias formulações, como champôs, loções, *sprays*, géis, cremes ou toalhetas para utilização em lesões generalizadas ou localizadas [7, 58]. Embora seja difícil estimar as concentrações dos agentes tópicos alcançadas localmente após administração numa determinada região do corpo, os testes de suscetibilidade antimicrobiana *in vitro* para estes agentes, como a determinação de concentrações mínimas inibitórias, estão disponíveis [58]. Outro potencial problema consiste nalguma incerteza na eficácia clínica de uma combinação entre a terapêutica sistémica e tópica, bem como na existência de poucos critérios interpretativos de suscetibilidade para agentes tópicos [7, 58]

Tabela 2. Recomendações de terapêutica antimicrobiana tópica para o tratamento de foliculite superficial bacteriana em cães. Adaptado de [7].

Aplicação	Agentes	Modelos de utilização
Lesões generalizadas	Antissépticos: Clorexidina, Peróxido de benzoílo, Lactato de etilo, Iodopovidona, Triclosan	Formulações (lesões generalizadas): <i>Shampoos</i> , loções, <i>sprays</i> , condicionadores Formulações (lesões localizadas): Géis, cremes, loções, toalhetas
Lesões localizadas	Antissépticos: Ácido acético, Ácido láctico, Ácido málico, Peróxido de benzoílo, Sulfadiazina de prata.	Aplicação: Normalmente utilizadas 2/3 vezes por semana no máximo de 7 dias de aplicação até a lesão desaparecer; posteriormente 1 vez por semana para profilaxia.
Lesões localizadas	Antibióticos tópicos: Novobiocina, Pristinamicina, Bacitracina, ácido fusídico e Mupirocina	A mupirocina e o ácido fusídico são utilizados em medicina humana e a resistência tem sido cada vez mais reportada. Apenas devem ser aplicados em cães com infeção onde a cultura não indique suscetibilidade a outros antimicrobianos.

A terapêutica sistêmica é utilizada com base em diversos fatores como a disponibilidade, custo e segurança do antibiótico. As opções terapêuticas de primeira linha podem ser selecionadas de forma empírica aquando da ausência de perfil de suscetibilidade aos agentes antimicrobianos [7]. Quando a identificação do agente infeccioso e seu perfil de suscetibilidade aos agentes antimicrobianos são conhecidos, pode ser necessário ajustar a terapêutica, sendo recomendada a utilização de agentes de primeira linha, se houver um perfil de suscetibilidade, caso contrário poderão ser utilizados os agentes de segunda linha. O recurso à terapêutica de terceira linha deve ser limitado a casos excepcionais, já que inclui antibióticos críticos para uso humano, tal como descrito na Tabela 3.

Tabela 3. Recomendações de terapêutica sistêmica para o tratamento de foliculite superficial bacteriana em cães. Adaptado de [7].

Categoria	Utilização	Agentes
Primeira linha	Primeira escolha para tratamento empírico	Clindamicina ou lincomicina, Amoxicilina c/ Ácido Clavulânico, Cefadroxil, Cefalexina, Doxiciclina e Trimetopim
Primeira ou Segunda linha	Escolhas adicionais se for uma lesão localizada e houver um perfil de suscetibilidade conhecido	Cefalosporinas de 3ª geração
Segunda linha	Quando o tratamento empírico de primeira linha e a terapia tópica não é apropriada e quando o teste de suscetibilidade indica esta hipótese terapêutica	Doxicilina/Minociclina, Cloranfenicol, Fluoroquinolonas (enrofloxacina, ciprofloxacina, difloxacina, marbofloxacina), Rifampicina, Gentamicina/Amicacina
Terceira linha	Quando medicação de primeira e segunda linha não são apropriadas e quando o teste de suscetibilidade indica esta hipótese terapêutica	Linezolida, Vancomicina, Teicoplanina

1.3. Resistência aos agentes antimicrobianos

Atualmente, a resistência bacteriana aos agentes antimicrobianos é um dos problemas de saúde pública mais relevante, uma vez que um número crescente de bactérias anteriormente consideradas como suscetíveis a antibióticos tem vindo a deixar de responder a estes agentes [59]. O desenvolvimento de resistência bacteriana aos agentes antimicrobianos é um fenómeno que ocorre naturalmente e que é potenciado pela

pressão seletiva exercida sobre as bactérias pelo uso destes mesmos agentes antimicrobianos [59].

1.3.1. Agentes antimicrobianos

Um agente antimicrobiano caracteriza-se por ser um composto de qualquer fonte (microrganismos, plantas, de origem sintética ou semi-sintética), que atua sobre microrganismos, incluindo bactérias, fungos ou vírus, como os antibióticos e os biocidas [60].

Os antibióticos são compostos naturais, semi-sintéticos ou sintéticos com toxicidade seletiva contra bactérias, capazes de inibir o seu crescimento (ação bacteriostática) ou causar a morte (ação bactericida), permitindo que os mecanismos de defesa do hospedeiro combatam a infecção [60].

O uso inadequado e/ou em excesso dos antibióticos é um dos fatores que mais tem contribuído para a disseminação de mecanismos de resistência a estes compostos, existindo uma correlação direta entre o aumento de consumo de agentes antimicrobianos e o aumento dos níveis de resistência observados em várias espécies bacterianas [41]. Esta realidade levou a que a Organização Mundial de Saúde (OMS), a Organização Mundial para a Saúde Animal (OIE) e a *European Medicines Agency* (EMA) criassem sistemas de categorização das várias classes de antibióticos, de acordo com a sua importância para a medicina humana ou veterinária, respetivamente [60, 61, 62]. Em particular, a OIE/OMS categorizam os antibióticos para uso veterinário em: Agentes Antimicrobianos Veterinários Criticamente Importantes (VCIA), Agentes Antimicrobianos Veterinários Altamente Importantes (VHIA) e Agentes Antimicrobianos Importantes Veterinários (VIA) [61]. A EMA separa os antibióticos em quatro categorias (A- *Avoid*, B- *Restrict*, C- *Caution*, D- *Prudence*), considerando o risco que a sua utilização em animais causa para a saúde pública pelo possível desenvolvimento de resistência antimicrobiana [62].

Este sistema de categorização apresenta como critérios de classificação não só a importância das classes de antibióticos em veterinária, mas também em medicina humana, no sentido de minimizar o uso em saúde animal de antibióticos que são considerados críticos para a medicina humana, representados na Tabela 4.

Tabela 4. Classes de antibióticos classificadas como Agentes Antimicrobianos Veterinários Criticamente Importantes (VCIA). Adaptado de [61, 62].

Classe de antibióticos VCIA	Classificação pela OMS ¹	Classificação pela EMA ²
Aminoglicosídeos	CIA	C
Cefalosporinas de 3 ^a -4 ^a geração	CIA	B
Macrólidos	CIA	C
Penicilinas	CIA	A
Quinolonas	CIA	B
Cefalosporinas de 1 ^a -2 ^a geração	HIA	C
Fenicóis	HIA	C
Sulfonamidas	HIA	D
Tetraciclinas	HIA	D

¹**CIA:** Classes antimicrobianas considerados criticamente importantes para medicina humana; **HIA:** Classes antimicrobianas consideradas altamente importantes para a medicina humana. ²**A:** *Avoid*; **B:** *Restrict*; **C:** *Caution*; **D:** *Prudence*.

Os biocidas têm uma ação mais geral e inespecífica do que os antibióticos, atuando simultaneamente sobre múltiplos alvos celulares, inibindo o crescimento e/ou promovendo a morte celular [63]. Os biocidas são classificados de acordo com a sua aplicabilidade; sendo designados por antissépticos, quando aplicados em tecidos vivos, pele e mucosas; por desinfetantes, quando aplicados para descontaminação de superfícies; e por conservantes, quando aplicados em produtos de consumo [63]. Estes são amplamente utilizados como desinfetantes e antissépticos para o controle e prevenção da disseminação de agentes patogênicos, inclusive na prevenção de infecções da pele. Os biocidas são parte essencial dos programas de controle de infecção hospitalar desempenhando um papel essencial na prevenção de infecções nosocomiais em medicina humana e veterinária [64]. Apesar de terem um papel importante na limitação de potenciais fontes de infecção, a preocupação com o seu uso crescente na comunidade e a pressão seletiva que podem exercer sobre os microrganismos pode levar à aquisição de suscetibilidade reduzida a estes compostos, bem como aumentar o potencial de resistências cruzadas com antibióticos clinicamente importantes [60, 61].

1.3.2. Mecanismos de resistência a antibióticos

São várias as espécies bacterianas que têm desenvolvido estratégias de defesa contra a ação dos antibióticos, permitindo a sua sobrevivência no hospedeiro. Entre estes mecanismos destacam-se os seguintes: i) produção de enzimas que inativam antibióticos, por hidrólise ou modificação; ii) alteração do alvo celular, por mutação ou por

modificação enzimática, reduzindo a afinidade do alvo para o antibiótico; redução da concentração intracelular do antibiótico por iii) redução da entrada do antibiótico na célula através da diminuição da permeabilidade da membrana ou através de alteração em porinas ou por iv) extrusão do antibiótico da célula por sistemas de efluxo [38, 65], como representado na Figura 1.

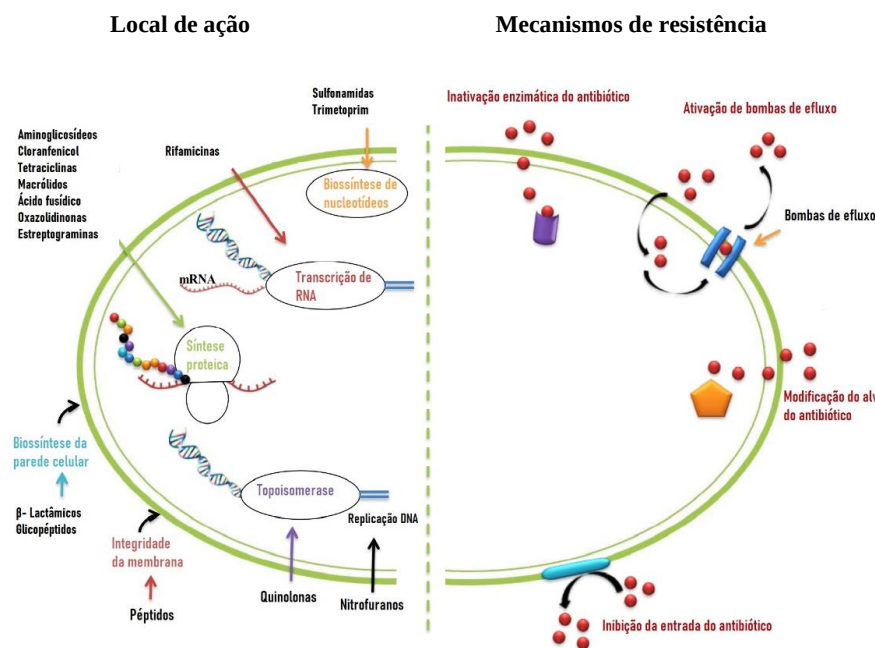


Figura 1 Representação dos alvos dos antibióticos e principais mecanismos de resistência. Adaptado de [66].

A resistência aos antibióticos pode ser uma propriedade intrínseca da bactéria, por exemplo devido à sobre-expressão de bombas de efluxo, ou uma propriedade adquirida pela ocorrência de mutações em genes que codificam para o alvo do antibiótico ou em regiões reguladoras desses genes, ou ainda pela aquisição de genes exógenos localizados em elementos genéticos móveis, como plasmídeos ou transposões [38].

1.3.3. Mecanismos de resistência a biocidas

A suscetibilidade reduzida a biocidas tem sido reportada desde o início da década de 1950, com particular incidência na resistência bacteriana a compostos de amônio quaternário (QACs, de *Quaternary ammonium compounds*), amplamente utilizados como desinfetantes e/ou antissépticos. Os biocidas caracterizam-se por exercerem, simultaneamente, ação sobre múltiplos alvos celulares não específicos, apresentando um

espectro de atividade antimicrobiana mais amplo que os antibióticos. Apesar do extenso uso de biocidas, os seus mecanismos de ação antimicrobiana ainda estão pouco descritos, levando a uma crescente preocupação com o potencial desenvolvimento e disseminação de microrganismos com suscetibilidade reduzida a estes compostos [64, 67, 68].

Os mecanismos envolvidos na suscetibilidade reduzida a biocidas estão principalmente associados à diminuição da concentração intracelular do biocida através da redução da permeabilidade celular ou do efluxo do biocida [63], embora para alguns biocidas estejam registados mecanismos relacionados com modificação de alvos celulares específicos ou mutação [68].

A suscetibilidade reduzida a biocidas tem sido maioritariamente relacionada com a presença de sistemas de efluxo, codificados quer em plasmídeos, quer no cromossoma [63, 66, 69]. Em estafilococos, a maioria dos sistemas de efluxo cromossómicos possui também a capacidade de extrusar outros antibióticos, como as fluoroquinolonas. Já os sistemas de efluxo plasmídicos estão maioritariamente documentados como apresentando apenas biocidas como substratos [63, 66]. No entanto, o facto de se encontrarem frequentemente localizados em plasmídeos que apresentam determinantes adicionais de resistência a antibióticos leva à preocupação de que o uso generalizado de biocidas possa exercer pressão seletiva para a resistência cruzada entre biocidas e antibióticos [38, 66, 68].

1.4. Resistência mediada por sistemas de efluxo

1.4.1. Sistemas de efluxo bacterianos

As bombas de efluxo são proteínas membranares que têm como função a extrusão de diversos compostos nocivos para a célula, do meio intracelular para o meio extracelular, de forma a reduzir a sua concentração intracelular. As bombas de efluxo são utilizadas pelas bactérias como primeiro mecanismo de defesa contra diversos compostos antimicrobianos, de um modo geral, conferem um baixo nível de resistência, permitindo que as bactérias sobrevivam até adquirirem outros mecanismos mais eficientes [66].

As bombas de efluxo podem ser específicas para um determinado substrato ou antibiótico, ou podem transportar uma variedade de compostos de diferentes classes químicas, sendo nesse caso designadas por bombas de efluxo MDR [70]. As bombas de

efluxo MDR podem ainda ser classificadas de acordo com a sua estrutura, fonte energética ou filogenia, em cinco classes principais: i) *Major Facilitator Superfamily* (MFS); ii) *Multidrug and Toxic Compound Extrusion* (MATE); iii) *Resistance-Nodulation-Cell Division Family* (RND); iv) *Small Multidrug Resistance* (SMR), e v) *Adenosine Triphosphate (ATP)-Binding Cassette* (ABC) (Figura 2) [70]. Estes sistemas de efluxo encontram-se em todas as bactérias, embora as bombas de efluxo da família RND ocorram mais frequentemente em bactérias Gram-negativas, devido à estrutura membranar destas [70, 71].

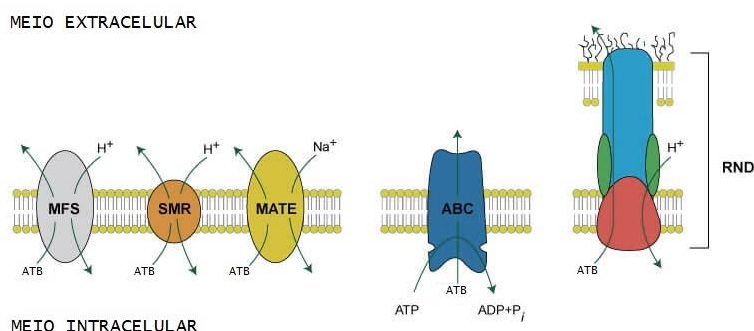


Figura 2 Representação esquemática das diferentes famílias de bombas de efluxo MDR. ATB: antibiótico. Adaptado de [71].

As principais características das cinco famílias de bombas de efluxo MDR encontram-se descritas na Tabela 5.

Tabela 5. Caracterização das cinco famílias de bombas de efluxo MDR bacterianas [71].

Família	Fonte energética	Substratos	Exemplos de bombas de efluxo relevantes
MFS	Antiporte de H^+	Açúcares, metabolitos, aniões e compostos antimicrobianos	QacA e QacB, <i>S. pseudintermedius</i> e <i>S. aureus</i> NorA, <i>S. pseudintermedius</i> e <i>S. aureus</i>
SMR	Antiporte de H^+	Compostos lipofílicos, QACs, antissépticos e Detergentes	Smr, <i>S. pseudintermedius</i> e <i>S. aureus</i> EmrE, <i>E. coli</i>
MATE	Antiporte de H^+ e/ou Na^+	Corantes catiónicos e Antibióticos	NorM, <i>Vibrio parahaemolyticus</i> ; YdhE, <i>E. coli</i>
ABC	Hidrólise de ATP	Antibióticos, açúcares, aminoácidos, polissacarídeos e proteínas	LmrA, <i>Lactococcus lactis</i>
RND	Antiporte de H^+	Antibióticos, metais pesados, corantes, detergentes e solventes	AcrAB-TolC, <i>E. coli</i> ; MexAB-OprM, <i>P. aeruginosa</i>

MFS: *Major Facilitator Superfamily*; SMR: *Small Multidrug Resistance*; MATE: *Multidrug and Toxic Efflux*; ABC: *Adenosine Triphosphate (ATP)-Binding Cassette*; RND: *Resistance-Nodulation-Division*; QACs: Compostos de amónio quaternário.

1.4.2. Sistemas de efluxo em estafilococos

Os sistemas de efluxo, codificados em plasmídeos ou no cromossoma de estafilococos, têm sido estudados ao longo dos últimos anos, principalmente em *S. aureus* [72]. A extensão deste estudo a outras espécies de estafilococos tem sido restrita a *S. epidermidis*, tendo sido demonstrado que o conjunto de sistemas de efluxo não é equivalente entre as duas espécies [73]. Em *S. pseudintermedius*, até ao momento apenas estão descritos os sistemas de efluxo MDR plasmídicos QacA, QacB, Smr, QacG, QacJ, e o sistema de efluxo MDR codificado no cromossoma NorA [8, 74, 75]. Assim, nas secções seguintes descrevem-se os sistemas de efluxo descritos até ao momento em *S. pseudintermedius*, *S. aureus* e outras espécies de estafilococos.

1.4.2.1. Sistemas de efluxo MDR plasmídicos

Existem vários sistemas de efluxo MDR codificados em plasmídeos descritos em *S. pseudintermedius*, destacando-se os sistemas QacA, QacB e Smr (Tabela 6).

A bomba de efluxo QacA é um transportador MFS com 14 segmentos transmembranares, constituído por 514 aminoácidos e com um tamanho de cerca de 55 kDa. Esta bomba de efluxo é codificada pelo gene *qacA*, de 1.542 pb, transportado em plasmídeos de tamanho superior a 20 Kb [76]. Em *S. aureus*, a bomba de efluxo QacA é responsável pela suscetibilidade reduzida a mais de 30 compostos antimicrobianos catiónicos lipofílicos, pertencentes a 12 famílias quimicamente distintas. Entre estes vários substratos de QacA contam-se catiões orgânicos monovalentes incluindo corantes, como o brometo de etídeo (EtBr), QACs e catiões orgânicos divalentes como a clorexidina e diamidinas [76].

A bomba de efluxo QacB é muito semelhante a QacA, sendo codificada pelo gene *qacB*, que difere apenas em sete nucleótidos do gene *qacA* [77]. Uma destas variações introduz uma alteração proteica responsável pela redução da gama de substratos de QacB a catiões orgânicos monovalentes [63]. O gene *qacA/B* encontra-se numa operação, que inclui também o gene *qacR*, transcrito inversamente, que codifica para a proteína repressora, QacR, a qual regula os níveis de expressão de *qacA/B* [78]. Em *S. aureus*, estes genes já foram descritos em isolados de diversas origens, quer seja humana, animal, alimentar ou ambiental [34]. Por sua vez, em *S. pseudintermedius*, estes sistemas de efluxo estão relacionados com o decréscimo da suscetibilidade a vários biocidas [79].

A bomba de efluxo Smr, também designada por QacC, é uma proteína de 107 aminoácidos, com quatro domínios transmembranares e é codificada pelo gene *smr*, de 321 pb [78]. A bomba de efluxo Smr pertence à família SMR e é responsável por suscetibilidade reduzida a moléculas catiónicas e hidrofóbicas como o EtBr e QACs [80]. Em *S. aureus*, este gene tem sido detetado em plasmídeos conjugativos com tamanho superior a 20 Kb, como pSK41, ou em plasmídeos não conjugativos de tamanho inferior a 3 Kb, como pSK89 [80, 81]. O sistema Smr já foi descrito em estafilococos não produtores de coagulase, como *S. epidermidis*, isolados de amostras de origem humana e animal [66]. Em *S. pseudintermedius*, este sistema de efluxo também foi descrito, por Worthing *et al.*, em 2018, em amostras de origem animal [75].

Tal como para *S. aureus*, em *S. pseudintermedius* estão descritos outros sistemas de efluxo codificados em plasmídeo que podem conferir suscetibilidade reduzida a antissépticos e desinfetantes, nomeadamente os sistemas de efluxo QacG, QacJ e QacH, este último identificado apenas em isolados de *S. aureus* com origem alimentar [74]. O gene *qacG* foi identificado pela primeira vez num plasmídeo de 2,3 kb (pST94) em *S. aureus* recolhidos na indústria alimentar [63] e em *S. pseudintermedius* de origem animal [74]. O gene *qacJ* foi identificado pela primeira vez num plasmídeo de 2,65 kb em diferentes espécies de estafilococos, nomeadamente em *S. aureus*, *Staphylococcus simulans* e *S. intermedius* provenientes de cavalos [63] e em *S. pseudintermedius* de origem animal [75].

Estes três sistemas de efluxo pertencem à família SMR e apresentam um elevado grau de similaridade a nível da sequência polipeptídica entre si e com Smr, conferindo níveis de resistência semelhantes a uma gama de substratos comuns (biocidas e corantes como o EtBr) [82]. Apesar de serem detetados menos frequentemente que os genes *qacA/B* e *smr*, o estudo de Worthing *et al.* revelou uma elevada prevalência de isolados de *S. pseudintermedius* contendo o gene *qacJ* (54%) [75].

A informação sobre os sistemas de efluxo codificados em plasmídeos encontra-se resumida na Tabela 6.

Tabela 6. Principais bombas de efluxo MDR plasmídicas descritas para *S. aureus* e *S. pseudintermedius* Adaptado de [63, 79].

Bomba de efluxo	Família	Reguladores	Substratos
QacA	MFS	QacR	Compostos catiónicos monovalentes e divalentes (QACs, diamidinas, biguanidinas e corantes)
QacB	MFS	QacR	Compostos catiónicos monovalentes (QACs, diamidinas e corantes)
Smr	SMR	n.i.	QACs e corantes (EtBr)
QacG	SMR	n.i.	QACs e corantes (EtBr)
QacH	SMR	n.i.	QACs e corantes (EtBr)
QacJ	SMR	n.i.	QACs e corantes (EtBr)

n.i.: Não se encontra descrito nenhum regulador até à data; MFS: *Major Facilitator Superfamily*; SMR: *Small Multidrug Resistance*; QACs: compostos de amónio quaternário; EtBr: brometo de etídeo.

1.4.2.2. Sistemas de efluxo MDR cromossómicos

Os sistemas de efluxo MDR codificados no cromossoma de *S. pseudintermedius* estão ainda pouco estudados quando comparados com *S. aureus*.

Entre estes sistemas, o transportador NorA da família MFS, foi o primeiro a ser descrito em 1986 [83], sendo o sistema de efluxo mais caracterizado em *S. aureus*. NorA tem 388 aminoácidos, é codificado pelo gene *norA* [83] e regulado pelos reguladores globais NorG e MgrA [63]. Esta bomba de efluxo tem a capacidade de extrusar vários compostos como fluoroquinolonas hidrofílicas, por exemplo ciprofloxacina e norfloxacina, corantes, como o EtBr, e vários biocidas, como QACs [63, 84, 85].

A redução da suscetibilidade a estes compostos, com particular foco nas fluoroquinolonas, tem sido associada a uma sobre-expressão do gene *norA*, através de mutações na sua região promotora ou por ação dos seus reguladores [63]. Esta bomba de efluxo MDR é a única identificada até ao momento no cromossoma de *S. pseudintermedius* [8].

Para além da bomba de efluxo NorA, existem outros sistemas de efluxo localizados no cromossoma de *S. aureus*. Estes sistemas de efluxo cromossómicos encontram-se descritos na Tabela 7.

Tabela 7. Principais bombas de efluxo MDR cromossômicas descritas para *S. aureus*. Adaptado de [63].

Bomba de efluxo	Família	Reguladores	Substratos
NorA	MFS	MgrA, NorG	Fluoroquinolonas hidrofílicas (ciprofloxacina, norfloxacina); QACs e corantes
NorB	MFS	MgrA, NorG	Fluoroquinolonas hidrofílicas (ciprofloxacina, norfloxacina) e hidrofóbicas (moxifloxacina); QACs e corantes.
NorC	MFS	MgrA, NorG	Fluoroquinolonas hidrofílicas (ciprofloxacina, norfloxacina) e hidrofóbicas (moxifloxacina) e corantes
MepA	MATE	MepR	Fluoroquinolonas hidrofílicas (ciprofloxacina, norfloxacina) e hidrofóbicas (moxifloxacina); QACs e corantes
MdeA	MFS	-	Fluoroquinolonas hidrofílicas (ciprofloxacina, norfloxacina); Mupirocina; ácido fusídico; QACs e corantes

MFS: *Major Facilitator Superfamily*; SMR: *Small Multidrug Resistance*; MATE: *Multidrug and Toxic Compound Extrusion*; QACs: compostos de amônio quaternário.

Em *S. aureus*, várias destas bombas de efluxo MDR cromossômicas têm sido implicadas na extrusão de fluoroquinolonas, biocidas e corantes quando sobre-expressas [86-91]. Também *S. epidermidis* revelou potencial para desenvolver fenótipos de resistência mediados por sistemas de efluxo após exposição a compostos não antibióticos que são substratos de bombas de efluxo MDR [72].

1.5. O papel do efluxo na resistência a Fluoroquinolonas

Os antibióticos da classe das fluoroquinolonas têm sido utilizados como bactericidas de espectro alargado contra infeções bacterianas causadas por *S. pseudintermedius* [92], sendo recomendados para tratamento de segunda linha de foliculite superficial canina [7]. As fluoroquinolonas têm sido um dos principais alvos de estudo no que diz respeito à resistência mediada por bombas de efluxo, já que esta classe de antibióticos é substrato de um grande número de sistemas de efluxo MDR [34, 63, 93, 94]. No estudo conduzido por Costa *et al.*, foi possível demonstrar que em *S. aureus* os substratos de bombas de efluxo MDR, como as fluoroquinolonas, promovem uma resposta fisiológica, que depende do efluxo, e que persiste ao longo do tempo sob exposição constante [91]. Numa primeira instância, através da ativação de genes que codificam para bombas de efluxo, seguida de ocorrência de mutações na região *quinolone resistance-determining region* (QRDR) [91].

Os alvos de ação das fluoroquinolonas, em bactérias de coloração Gram-positiva, são as enzimas DNA topoisomerase IV e DNA girase. Ambas as enzimas são compostas por duas subunidades, GrlA e GrlB para a topoisomerase IV e GyrA e GyrB para a DNA

girase [93, 95]. A resistência a fluoroquinolonas ocorre como resultado de alterações na composição aminoacídica, em particular nas regiões QRDR (Tabela 8) [92, 93]. Estas alterações diminuem a afinidade das fluoroquinolonas para estas enzimas.

Tabela 8. Alterações na subunidade GrlA da topoisomerase IV e na subunidade GyrA da DNA girase de *S. pseudintermedius* associadas a resistência a fluoroquinolonas. Adaptado de [94, 96].

Aminoácido	GrlA ^a		GyrA ^b	
	Aminoácido WT	Aminoácido mutante	Aminoácido WT	Aminoácido mutante
80	Ser	Arg/Ile	---	---
81	Ser	Pro	---	---
84	Asp	Asp/Asn/Tyr/Gly	Ser	Leu/Phe
88	---	---	Glu	Glu/Gly

^aArg: Arginina; Asp: Ácido aspártico; Ile: Isoleucina; Asn: Asparagina; Tyr: Tirosina; Pro: Prolina; ^bSer: Serina; Leu: Leucina; Phe: Fenilalanina; Glu: Ácido glutâmico; Gly: Glicina; ---: posição sem mutações descritas na literatura; WT: *wild type*.

1.6. Metodologias para a caracterização da atividade de efluxo

Apesar de não existir um método padronizado para a avaliação da atividade de efluxo em *S. pseudintermedius*, várias abordagens têm sido utilizadas para o estudo do efluxo em *S. aureus*. Uma das abordagens mais utilizadas recorre ao EtBr como marcador indireto de atividade de efluxo, uma vez que é substrato de um vasto número de bombas de efluxo, plasmídicas e cromossômicas. Assim, a avaliação do nível de suscetibilidade de uma dada estirpe a este composto através da determinação da concentração mínima inibitória (CMI) pode ser indicativa da ausência/presença de atividade de efluxo aumentada [66].

Outra abordagem comumente usada para avaliar atividade de efluxo é o recurso a compostos com conhecida atividade inibitória de efluxo. Estes compostos podem ser utilizados avaliando o seu impacto no nível de suscetibilidade a substratos de bombas de efluxo. Por exemplo, para uma determinada estirpe, a diminuição da CMI de um substrato, quando determinada na presença de um inibidor de efluxo, é indicativa que essa estirpe possui atividade de efluxo aumentada.

1.6.1. Determinação da concentração mínima inibitória de EtBr

A CMI é definida como a concentração mínima à qual uma substância inibe o crescimento visível de um organismo em testes de suscetibilidade *in vitro*, após uma incubação por um período de tempo padronizado [97]. O EtBr é um substrato de várias bombas de efluxo, plasmídicas e cromossômicas, em estafilococos, sendo utilizado como um marcador indireto para avaliar a atividade de efluxo. Tem sido demonstrado que estirpes com atividade de efluxo aumentada apresentam menor suscetibilidade ao EtBr. Assim, um aumento da CMI_{EtBr} é indicador da presença de atividade de efluxo aumentada [66, 98].

Determinação de populações NWT

Quando aplicada esta estratégia a um conjunto grande de isolados é possível analisar a distribuição da CMI_{EtBr} e determinar o valor de *cut-off* (CO_{WT}), o qual corresponde ao valor mais elevado de CMI apresentado pela população do tipo selvagem (WT, *wild type*). Esta população WT é caracterizada pela ausência de mecanismos de resistência com expressão fenotípica ao composto antimicrobiano em estudo, neste caso o EtBr. Assim, o valor de CO_{WT} consegue separar a população WT de uma população, que adquiriu mecanismos de resistência ao composto antimicrobiano, designada por não-selvagem (NWT, *non wild type*) [99]. Assim, uma população NWT para o EtBr deverá possuir atividade de efluxo aumentada.

1.6.2. Determinação de concentração mínima inibitória na presença de inibidores de efluxo

Uma das estratégias para avaliar a atividade de efluxo recorre à inibição das bombas de efluxo utilizando moléculas. Estas moléculas não antibióticas têm sido alvo de interesse, uma vez que, para além de permitirem estudar a atividade de efluxo, podem também ser utilizadas como auxiliares da terapêutica já que restaurariam a atividade do antibiótico suprimindo o seu efluxo [100]. Desta forma, um inibidor de efluxo deve aumentar a atividade antibacteriana de substratos de bombas de efluxo, não deve ter atividade em isolados que não têm bombas de efluxo expressas, deve aumentar a acumulação e diminuir o efluxo dos substratos de bombas de efluxo e a sua atividade não deve afetar a integridade da membrana celular de tal forma que não sejam elas próprias inibidoras do crescimento bacteriano [100].

Vários compostos têm sido explorados como inibidores de efluxo (IEs), sabendo-se que em *S. aureus* e *S. epidermidis*, os compostos verapamil e tioridazina, apresentam atividade inibitória de efluxo [72, 77, 101, 102] sendo por isso utilizados neste trabalho. O inibidor verapamil é um bloqueador dos canais de cálcio utilizado clinicamente como um agente antiarrítmico. Atualmente é utilizado para avaliar a atividade de bombas de efluxo em bactérias Gram-positivas, mas também pode ser utilizado para algumas bactérias Gram-negativas como *E. coli* [101]. Considerado um inibidor de bombas de efluxo MDR, o verapamil é um inibidor eficaz de bombas de efluxo em *S. aureus* [77]. A tioridazina pertence à família das fenotiazinas, sendo utilizado clinicamente como antipsicótico. Vários estudos relatam a sua atividade como inibidora de efluxo em *S. aureus* [72, 102, 103].

1.7. Objetivos da Dissertação

A utilização de biocidas e antibióticos é imprescindível para o tratamento e prevenção de infeções bacterianas. Como tal, estes compostos antimicrobianos são utilizados amplamente em ambiente hospitalar, na prática clínica humana e veterinária, e até mesmo na comunidade. Nos últimos anos, têm-se multiplicado os estudos relativos à resistência mediada por sistemas de efluxo no desenvolvimento e disseminação de fenótipos de multirresistência em estafilococos. No entanto, no que diz respeito a *S. pseudintermedius*, este mecanismo encontra-se ainda pouco estudado.

Nesta Dissertação, pretendemos estudar a contribuição do efluxo para a resistência a compostos efluxáveis, como as fluoroquinolonas, bem como caracterizar este e outros mecanismos associados à resistência a esta classe de antibióticos em *S. pseudintermedius*, um importante agente de infeção em animais de companhia. Para tal, estudou-se um conjunto de 52 isolados de *S. pseudintermedius*, associados a SSTIs em cães e gatos. Este conjunto é representativo dos diferentes fenótipos de resistência às fluoroquinolonas e a outros antibióticos, anteriormente estabelecido para uma coleção de 157 *S. pseudintermedius* isolados em dois laboratórios de diagnóstico veterinário do distrito de Lisboa, Portugal.

Os objetivos específicos desta Dissertação foram os seguintes: i) avaliar a presença de atividade de efluxo, através da determinação de CMIs para o EtBr; ii) estimar o valor de *cut-off* para o EtBr e detetar a potencial presença de populações NWT para este composto; iii) avaliar o efeito de compostos inibidores de efluxo na CMI_{EtBr}; iv) correlacionar os dados obtidos com a pesquisa dos genes plasmídicos *qacA/B* e *smr*; v) avaliar a importância do efluxo na resistência a fluoroquinolonas, pela determinação da CMI para a ciprofloxacina na presença de compostos inibidores de efluxo; vi) analisar outros mecanismos de resistência às fluoroquinolonas, pela deteção de mutações QRDR de *grrA* e *gyrA*.

Espera-se que os dados obtidos permitam estabelecer uma primeira caracterização da atividade de efluxo em *S. pseudintermedius*, em particular a sua contribuição para a resistência às fluoroquinolonas nesta espécie, determinando o(s) principal(is) mecanismo(s) de resistência a esta classe de antibióticos na coleção estudada.

2. Materiais e Métodos

2.8. Materiais

2.8.1. Coleção bacteriana em estudo e estirpes de referência

Neste trabalho foi estudado um conjunto de 52 isolados de *S. pseudintermedius*, selecionados a partir de uma coleção de 157 *S. pseudintermedius* associados a SSTIs em animais de companhia (142 cães e 3 gatos), previamente caracterizada no laboratório onde foi realizada esta Dissertação. A coleção foi cedida pela Professora Doutora Constança Pomba (Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade de Lisboa, FMV/UL) no âmbito do projeto BIOSAFE (Ref. LISBOA-01-0145-FEDER-030713, PTDC/CAL-EST/30713/2017) e corresponde a 92 *S. pseudintermedius* isolados no Laboratório de Resistência aos Antibióticos (FMV/UL) entre 2014 e 2018 e 65 *S. pseudintermedius* recolhidos por um laboratório de diagnóstico clínico veterinário durante o ano de 2018.

A identificação, origem e ano de colheita de cada isolado da coleção de 157 *S. pseudintermedius* encontra-se descrita na Tabela A1, em Anexo.

Neste trabalho foram também analisadas diversas estirpes de referência, utilizadas como controlo nos vários ensaios conduzidos, que se encontram discriminadas na Tabela 9.

Tabela 9. Estirpes de referência utilizadas.

Estirpes	Características	Referências
<i>S. pseudintermedius</i> DSM21284 ^T	Estirpe tipo de <i>S. pseudintermedius</i> , colhida de tecido pulmonar de gato, usada como controlo em ensaios de suscetibilidade a antimicrobianos, de avaliação de atividade de efluxo e de amplificação das regiões QRDR dos genes <i>grrA</i> e <i>gyrA</i> .	[16]
<i>S. aureus</i> ATCC®25923 TM	Estirpe de referência usada como controlo em ensaios de suscetibilidade a antimicrobianos.	[104]
<i>S. aureus</i> SM39	Isolado clínico MRSA de origem humana. Possui o plasmídeo pSM39 com o determinante <i>qacA</i> .	[105]
<i>S. aureus</i> SM52	Isolado clínico MRSA de origem humana. Possui o plasmídeo pSM52 com o determinante <i>smr</i> .	[105, 106]

2.8.1. Outro material biológico

Ao longo deste trabalho foram usados como controlo em reações de *Polymerase Chain Reaction* (PCR), DNAs de várias estirpes de referência e de controlo, descritas na Tabela 9. Os *primers* utilizados nas diferentes reações de PCR (Invitrogen, Escócia, Reino Unido) encontram-se descritos na Tabela 10.

Tabela 10. Sequências nucleotídicas dos *primers* utilizados e tamanho esperado do amplicão em pares de bases (pb).

Alvo	Primers	Sequência nucleotídica (5'-3')	Amplicão (pb)	Referências
<i>qacA/B</i>	QacA/B_Fw	GCTGCATTTATGACAATGTTT	628	[107]
	QacA/B_Rv	AATCCCACCTACTAAAGCAG		
<i>smr</i>	Smr_Fw	ATAAGTACTGAAGTTATTGGAAGT	285	[108]
	Smr_Rv	TTCCGAAAATGTTTAACGAAACTA		
<i>grlA</i>	GrlA_Fw	CAAGAGCGTGCTTTRCCT	292	Este trabalho
	GrlA_Rv	CTGACTYAATTTTCGCTTCAG		
<i>gyrA</i>	GyrA_Fw	ATGAGTGTTATYGTRTCTCGT	261	Este trabalho
	GyrA_Rv	CATMGAACCRAAGTTACCTTG		

Fw: forward; Rv: reverse; pb: pares de bases.

Para a análise dos produtos de PCR por eletroforese em gel de agarose, foram utilizados os marcadores de pesos moleculares 100bp Plus DNA Ladder Gene Ruler (Fermentas International Inc., Ontário, Canadá) e 1 Kb DNA Ladder Gene Ruler (Fermentas).

2.8.2. Meios de cultura e soluções

A composição e modo de preparação dos meios de cultura, soluções e compostos utilizados ao longo do trabalho encontram-se descritos nas Tabelas seguintes. Os meios de cultura e soluções tampão foram preparados com água desmineralizada e, quando necessário, esterilizados por autoclavagem a 121°C durante 15 minutos.

Na Tabela 11 encontram-se discriminados os meios de cultura usados ao longo deste trabalho

Tabela 11. Preparação e composição dos meios de cultura utilizados.

Meio de cultura ⁽¹⁾	Composição (por litro)
Mueller-Hinton Broth (MHB)	300 g Infusão desidratada de carne; 17,5 g de caseína hidrolisada; 1,5 g de amido; 2,426 mg/L Ca ²⁺ ; 4,043 mg/L Mg ²⁺ ; pH 7,3 ± 0,1 a 25°C
Mueller-Hinton Broth ajustado (CA-MHB)	MHB suplementado com 25 mg/L de Ca ²⁺ e 12,5 mg/L de Mg ²⁺
Mueller-Hinton Agar (MHA)	300 g Infusão desidratada de carne; 17,5 g de caseína hidrolisada; 1,5 g de amido; 4,347 mg Ca ²⁺ ; 6,206 mg Mg ²⁺ ; pH 7,3 ± 0,1 a 25°C
Tryptone soya agar (TSA)	15 g caseína de pâncreas digerida; 5 g enzima de feijão de soja digerida; 5 g cloreto de sódio; 15 g ágar; pH 7,3 ± 0,2 a 25°C
Tryptone soya broth (TSB)	17 g caseína de pâncreas digerida; 3 g enzima de feijão de soja digerida; 5 g cloreto de sódio; 2,5 g fosfato dipotássico de hidrogénio; 2,5 g glucose; pH 7,3 ± 0,2 a 25°C

⁽¹⁾ Oxoid Ltd, Basingstoke, Hampshire, Inglaterra

Na Tabela 12 encontram-se descritas as soluções usadas ao longo deste trabalho e a sua composição.

Tabela 12. Preparação e composição das soluções tampão utilizadas.

Solução	Composição
TE 1X	10 mM Tris-HCl ⁽¹⁾ , 1 mM EDTA ⁽¹⁾ , pH 8,0 ⁽¹⁾
TAE 50X	2 M Tris-base ⁽²⁾ ; 50 mM EDTA ⁽²⁾ , pH 8,0 ajustada com ácido acético glacial; Solução de trabalho a 1X (40 mM Tris-base, 1 mM EDTA)
CaCl₂ ⁽²⁾	Solução de CaCl ₂ a 10 mg/ml de Ca ²⁺ em água bidestilada estéril. Mantida a 4°C
MgCl₂ ⁽²⁾	Solução de MgCl ₂ a 10 mg/ml de Mg ²⁺ em água bidestilada estéril. Mantida a 4°C

⁽¹⁾NZYTEch, Lisboa, Portugal; ⁽²⁾ Sigma- Aldrich, St. Louis, Missouri, EUA

Na Tabela 13 encontram-se descritas as soluções de compostos usadas ao longo deste trabalho e a sua composição.

Tabela 13. Preparação e composição dos compostos utilizados ao longo do trabalho.

Solução	Composição das soluções stock
Brometo de etídeo (EtBr) ⁽¹⁾	10 mg/mL em água bidestilada estéril, mantido a 4°C
Tioridazina (TZ) ⁽¹⁾	10 mg/ml em água bidestilada estéril, mantido a -20°C
Verapamil (VER) ⁽¹⁾	40 mg/ml em água bidestilada estéril, mantido a -20°C
Ciprofloxacina (CIP) ⁽¹⁾	20 mg/mL em água bidestilada estéril, mantido a -20°C

⁽¹⁾ Sigma- Aldrich, St. Louis, Missouri, EUA

2.9. Métodos

2.9.1. Crescimento e manutenção das estirpes bacterianas

Todas as estirpes em estudo foram cultivadas a 37°C, em meio líquido *Mueller-Hinton broth* (MHB) numa incubadora com agitação a 180 rotações por minuto (rpm) durante 18 horas (Thermo Scientific MaxQ 4000, Waltham, MA, E.U.A), ou em meio sólido *Mueller-Hinton agar* (MHA) ou *Tryptone Soya Agar* (TSA) a 37°C, por 18 a 24 horas. Todas as estirpes usadas ao longo deste estudo se encontravam mantidas a -80°C em meio *Tryptone soya broth* (TSB) suplementado com 10% (v/v) de glicerol (Sigma).

2.9.2. Determinação de Concentrações mínimas inibitórias

A determinação das CMIs de EtBr (CMI_{EtBr}), de CIP (CMI_{CIP}) e dos inibidores de efluxo TZ e VER foi realizada pelo método de microdiluição em meio líquido, utilizando placas de 96 poços.

Para cada isolado, foram transferidas 1-2 colónias isoladas em meio TSA para 5 mL de meio MHB. Os meios inoculados foram incubados a 37°C com agitação constante durante a noite. No dia seguinte, foi preparado uma suspensão celular equivalente à escala de McFarland a 0,5, transferindo 10 µL de cultura para 10 mL de meio CA-MHB, e esta foi usada dentro de 15 minutos.

A preparação de cada placa de 96 poços foi feita de acordo com o esquema da Figura 3. De modo sucinto, foram distribuídos 100 µL de meio CA-MHB em todos os poços, à exceção dos poços da coluna 1, aos quais foram adicionados 200 µL de CA-MHB (controlo de esterilidade). Seguidamente, foram adicionados aos poços da coluna 2 os compostos a testar, previamente preparados em CA-MHB numa concentração 4 vezes superior à concentração máxima a testar. Posteriormente, foram feitas diluições seriadas 1:2 pela transferência de 100 µL dos poços da coluna 2 para os poços adjacentes e assim sucessivamente até à coluna 11. Nesta coluna, os 100 µL em excesso foram rejeitados. De seguida, foi adicionado a cada poço das colunas 2 a 12, 100 µL de suspensão celular, este último representando o controlo positivo.

Ao fim de 18h de incubação a 37°C, foram lidos e registados os resultados, considerando-se a CMI como a concentração de composto mais baixa capaz de inibir o

crescimento bacteriano visível. Os ensaios foram realizados em duplicado, e no caso de dúvida ou resultados discordantes, em triplicado.

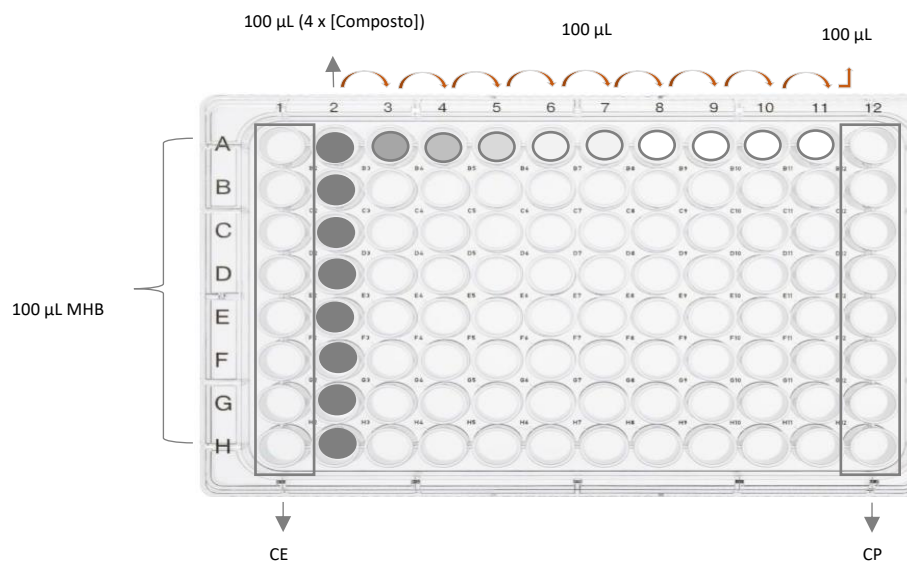


Figura 3 Esquema de preparação de cada placa para determinação de CMIs pelo método de microdiluição. CE: Controlo de esterilidade; CP: Controlo positivo.

As gamas de concentração testadas para os diversos compostos encontram-se descritas na Tabela 14.

Tabela 14. Gamas de concentrações testadas para a determinação de CMI_{EtBr}, CMI_{CIP} e dos IEs VER e TZ.

Gama de concentrações testadas	
Antibióticos	
Ciprofloxacina (CIP)	0,06 – 32 mg/L 1 – 512 mg/L
Corantes	
Brometo de Etídio (EtBr)	0,06 – 32 mg/L 0,5 – 256 mg/L
Inibidores de Efluxo	
Verapamil (VER)	6,25 – 3200 mg/L
Tioridazina (TZ)	0,2 – 100 mg/L

Os resultados para a CIP foram interpretados segundo as recomendações do Clinical Laboratory Standard Institute (CLSI), norma M100-ED30 [109], para *Staphylococcus spp.*, em que um valor de CMI ≤ 1 mg/L deve ser interpretado como suscetível, CMI = 2 mg/L como intermédio e CMI ≥ 4 mg/L como resistente.

2.9.3. Determinação de Concentrações mínimas inibitórias na presença de inibidores de efluxo

A determinação das CMI_{EtBr} e CMI_{CIP} na presença de inibidores de efluxo foi realizada pelo método de microdiluição em placa de 96 poços.

Este protocolo foi efetuado conforme descrito no ponto 2.2.2, à exceção da adição de uma alíquota de 10 µL dos inibidores a testar (VER e TZ), previamente diluídos em meio CA-MHB, após diluição seriada 1:2 de EtBr ou CIP e antes da adição do inóculo. As placas foram incubadas a 37°C, durante 18 horas e a CMI foi registada como a concentração de EtBr ou CIP mais baixa que inibe o crescimento bacteriano ao fim desse período. Nestes ensaios, os compostos EtBr e CIP foram testados na mesma gama de concentrações descritas no ponto 2.2.2 e os inibidores de efluxo foram utilizados a uma concentração subinibitória, equivalente ou inferior a ½ da sua CMI para o isolado em estudo.

Para a análise do efeito inibitório destes compostos sobre o valor de CMI inicial de cada composto antimicrobiano, considerou-se haver inibição de efluxo quando a CMI obtida na presença de IE diminuiu para, pelo menos, um quarto do valor de CMI determinado na ausência de IEs [66]. Os vários ensaios foram realizados sempre em duplicado, e no caso de dúvida ou de resultados discordantes, em triplicado.

2.9.4. Detecção de população *non wild-type* para o EtBr

Os valores de CMI_{EtBr} determinados foram usados para estimar o valor de *cut-off* (CO_{WT}) de *S. pseudintermedius* para este composto. O valor de *cut-off* (X mg/L) corresponde ao valor de CMI mais alto apresentado por uma população desprovida de mecanismos de resistência com expressão fenotípica, designada por *wild-type* (WT ≤ X mg/L) [99]. Por conseguinte, uma população que apresente mecanismos de resistência com expressão fenotípica designa-se por *non wild-type* (NWT > X mg/L). Deste modo, aplicando este conceito à distribuição de CMI_{EtBr} na população de *S. pseudintermedius* estudada, é possível estimar a presença de isolados *non wild-type* para o EtBr, os quais estarão potencialmente associados a uma atividade de efluxo aumentada. A determinação de valores de *cut-off* de *S. pseudintermedius* para o EtBr, foi realizada recorrendo ao software ECOFFinder versão 2.1 disponibilizado no website da EUCAST que se baseia no método estatístico iterativo [110, http://www.eucast.org/fileadmin/src/media/PDFs/EUCAST_files/EUCAST_SOPs/EUC

[AST SOP 10.0 MIC distributions and epidemiological cutoff value ECOFF setting 20171117.pdf](#)]. A partir de valores cumulativos da distribuição de CMI_{EtBr} para a coleção estudada é feita uma regressão não-linear à qual se ajusta uma distribuição log₂-normal correspondente à população WT, sendo assim possível estimar o valor máximo de CMI_{EtBr} que representa 99% da população WT estimada, valor este que corresponde ao *cut-off* [110].

2.9.5. Detecção de mutações nas regiões QRDR dos genes *grlA* e *gyrA*

A detecção de mutações na região QRDR dos genes *grlA* e *gyrA* foi realizada através da amplificação, por PCR, de fragmentos internos aos genes utilizando os *primers* previamente descritos na Tabela 10 usando DNA total previamente extraído através do método de fervura [111] diluído 1:10.

Cada reação de PCR foi realizada num volume de 25 µl, contendo 1X tampão *Taq*; 1,75 mM de MgCl₂; 0,2 mM de dNTP; 0,4 µM de cada um dos *primers* e 0,75 U de *Taq* Polimerase II (NZYTech). A cada reação foi adicionado 2,5 µL de DNA total.

Cada reação de PCR foi realizada num termociclador *Biometra Uno II* ou *Biometra T Personal* (Analytik Jena AG, Jena, Alemanha) com as seguintes condições de amplificação para os genes *grlA* e *gyrA*: desnaturação do DNA a 94°C durante 3 minutos, seguido de 30 (*gyrA*) ou 35 (*grlA*) ciclos de desnaturação a 94°C durante 45 segundos, emparelhamento a 50°C durante 45 segundos, extensão a 72°C durante 45 segundos, seguidos de um passo de extensão final a 72°C durante 5 minutos. Para cada PCR, foram preparadas reações de controlo positivo, contendo DNA total da estirpe *S. pseudintermedius* DSM21284^T e reações de controlo negativo, contendo H₂O ao invés de DNA.

Os produtos resultantes da amplificação foram visualizados por eletroforese em gel de agarose a 1% (p/v) ao qual foram adicionados 2 µl de *Green Safe Premium* (NZYtech), segundo as indicações do fabricante, com voltagem de 90V durante 30 minutos em TAE 1X ou TBE 0,5X, utilizando o marcador de pesos molecular 1 Kb *DNA Ladder Gene Ruler*. Os resultados foram visualizados e registados num aparelho Gel-Doc XR (Bio-Rad).

Os produtos amplificados foram purificados com o Kit NZYGelpure (NZYTech), com alteração na última etapa onde o produto purificado foi eluído com 40 µl de tampão de eluição, sendo posteriormente enviados para sequenciação por Sanger na empresa STABVida (Caparica, Portugal).

2.9.6. Pesquisa por PCR dos genes *qacA/B* e *smr*

A presença dos genes *qacA/B* e *smr* foi pesquisada através da amplificação, por PCR, de fragmentos internos a estes genes, utilizando os *primers* previamente descritos na Tabela 10, usando como molde o DNA total de cada estirpe. Cada reação de PCR foi realizada num volume de 0,025mL, contendo 1X tampão *Taq*; 1,75 mM de $MgCl_2$; 0,2 mM de dNTP; 0,4 μ M de cada um dos *primers* e 0,75 U de *Taq* Polimerase II (NZYTech). A cada reação foi adicionado 2,5 μ L de DNA total, previamente extraído pelo método de fervura e diluído 1:10.

Cada reação de PCR foi realizada num termociclador *Biometra Uno II* ou *Biometra T Personal* (Analytik Jena AG, Jena, Alemanha) com as seguintes condições de amplificação para os genes *qacA/B* e *smr*: ciclo de desnaturação do DNA a 95°C durante 4 minutos, seguido de 35 ciclos de desnaturação a 95°C durante 1 minuto (*qacA/B*) ou 30 segundos (*smr*), emparelhamento a 40°C durante 45 segundos (*qacA/B*) ou a 48°C durante 30 segundos (*smr*), extensão a 72°C durante 1 minuto (*qacA/B*) ou 30 segundos (*smr*), seguidos de um passo de extensão final a 72°C durante 5 minutos. Para cada PCR, foram preparadas reações controlo positivo contendo DNA total das estirpes SM39 (*qacA/B*) ou SM52 (*smr*), como descrito na Tabela 10 e reações controlo negativo, contendo DNA total da estirpe de referência *S. aureus* ATCC®25923™.

Os produtos resultantes da amplificação foram visualizados por eletroforese em gel de agarose a 1% (p/v) (NZYTech), com voltagem de 80V durante 40 minutos em TAE 1X ou TBE 0,5X, utilizando o marcador de pesos molecular 100 bp *Plus DNA Ladder Gene Ruler*. O gel de agarose foi posteriormente corado com EtBr a 0,25 mg/L e os resultados foram visualizados e registados num aparelho Gel-Doc XR (Bio-Rad).

2.9.7. Análise estatística

Para a análise estatística dos dados recorreu-se ao software SPSS v. 26 para o Windows (SPSS, Inc.). Averiguou-se se existe diferença entre a gama de CMI_{EtBr} ou CMI_{CIP} e a resistência à metilina (MRSP/MSSP) na coleção em estudo usando o teste não paramétrico Mann-Whitney-Wilcoxon. As diferenças foram consideradas estatisticamente significativas quando $p < 0,05$.

3. Resultados

3.1. Caracterização fenotípica das estirpes de *S. pseudintermedius*

O primeiro passo deste estudo consistiu na seleção de um grupo de isolados de *S. pseudintermedius* com base no fenótipo de suscetibilidade aos antibióticos, em particular aos beta-lactâmicos e fluoroquinolonas, previamente estabelecido no laboratório de Microbiologia Médica do IHMT/UNL pelo método de Kirby-Bauer e interpretados de acordo com as recomendações do CLSI [109]. Assim, foram selecionados 52 isolados (Figura 4), que incluíam 20 isolados resistentes à CIP, um isolado com resistência intermédia à CIP e 31 isolados suscetíveis à CIP. Dentro deste grupo, 27 isolados foram classificados como MRSP, sendo que desses, 26 eram MDR, e 25 isolados classificados como MSSP, onde 12 foram categorizados como sendo MDR. Esta seleção teve ainda em conta os padrões de resistência encontrados, na coleção inicial de 156 isolados, tendo sido incluídos no estudo um isolado representativo de cada padrão registado (Tabela 15, páginas 34 e 35).

Neste estudo, foi primeiramente avaliado o nível de atividade de efluxo, por determinação das CMI_{EtBr} e para a ciprofloxacina, para os 52 isolados de *S. pseudintermedius* selecionados, e avaliado o efeito de inibidores de efluxo sobre esses níveis de suscetibilidade.

3.2. Determinação de concentrações mínimas inibitórias de Brometo de Etídeo

Em *S. aureus*, o EtBr demonstra ser um marcador eficaz para rastrear a atividade de efluxo em isolados clínicos. Desta forma, isolados que possuam atividade de efluxo aumentada, apresentam valor de CMI_{EtBr} superior a isolados com atividade de efluxo basal [98].

A determinação da CMI_{EtBr} foi realizada para o grupo de 52 isolados previamente selecionados e para a estirpe *S. pseudintermedius* DSM21284^T, utilizada como controlo. Os valores de CMI para cada isolado encontram-se apresentados na Tabela 15 (página 34 e 35) e correspondem ao resultado de dois ou mais ensaios independentes e concordantes.

A distribuição dos valores de CMI_{EtBr} é apresentada na Figura 4, estando os isolados identificados consoante o fenótipo de resistência à metilina.

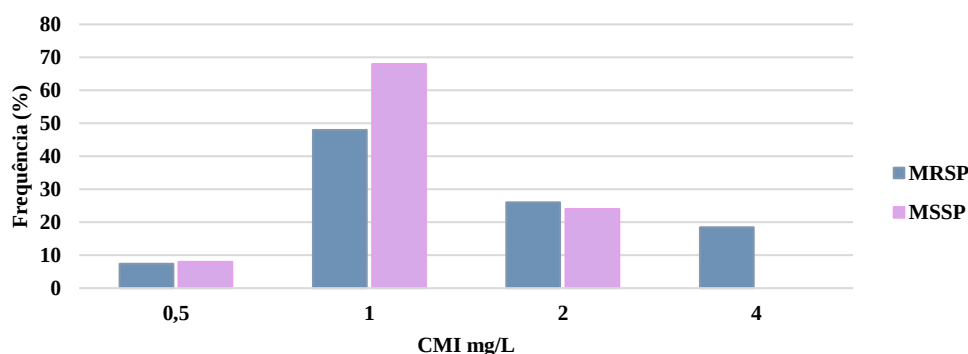


Figura 4 Distribuição dos valores de CMI_{EtBr} para isolados MRSP (n= 27) e isolados MSSP (n= 25).

A CMI_{EtBr} variou entre 0,5 e 4 mg/L na população de *S. pseudintermedius* estudada. Foram observadas diferenças quando estes valores foram analisados de acordo com o fenótipo de resistência à meticilina, tendo sido registado o valor mais elevado de CMI_{EtBr}, 4 mg/L, apenas para isolados MRSP. No entanto, estas diferenças não são estatisticamente significativas ($p=0,100$).

3.3. Deteção de população *non wild-type* para o EtBr

Através de uma análise da distribuição dos valores de CMI_{EtBr} para os diferentes isolados em estudo, é possível, determinar o valor de *cut-off*, identificando populações NWT, as quais possuem potencialmente mecanismos de resistência com expressão fenotípica. O valor do *cut-off* para o EtBr foi calculado através do programa ECOFFinder, o qual permite analisar a distribuição de CMI_{EtBr} e estimar a proporção de população WT e NWT, como representado na Figura 5.

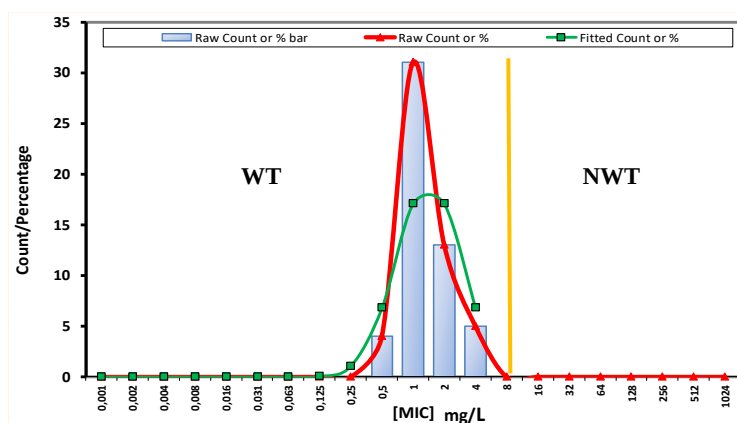


Figura 5 Distribuição de CMI_{EtBr} para os 52 *S. pseudintermedius* estudados e respetivo valor de *cut-off* determinado com o programa ECOFFinder. **Linha vermelha:** distribuição dos valores de CMI_{EtBr}; **Linha Verde:** distribuição normalizada dos valores de CMI_{EtBr} para a população *wild-type* estimada; **Linha amarela:** Valor de *cut-off*, 8 mg/L.

Os resultados obtidos através do cálculo do valor de *cut-off* para o EtBr permitiram que se identificasse a população de *S. pseudintermedius* considerada WT, como representado na Figura 5. O valor de *cut-off* a 99% foi de 8 mg/L, significando que todos os isolados WT apresentam valores de $CMI_{EtBr} \leq 8$ mg/L, enquanto isolados NWT apresentariam valores de $CMI_{EtBr} > 8$ mg/L. Deste modo, foi possível observar que todos os isolados da coleção em estudo pertencem à população WT, não se tendo detetado *S. pseudintermedius* NWT, ie, com $CMI_{EtBr} > 8$ mg/L.

3.4. Determinação de concentrações mínimas inibitórias para a ciprofloxacina

A determinação das CMI_{CIP} foi realizada para o grupo de 52 *S. pseudintermedius* previamente selecionados, bem como para a estirpe DSM21284^T. Os valores de CMI_{CIP} para cada isolado são apresentados na Tabela 16 e correspondem ao resultado de dois ou mais ensaios independentes e concordantes. A distribuição dos valores de CMI_{CIP} para a coleção de *S. pseudintermedius* em estudo é apresentada na Figura 6, assinalando-se também o fenótipo de resistência à metilicina de cada isolado.

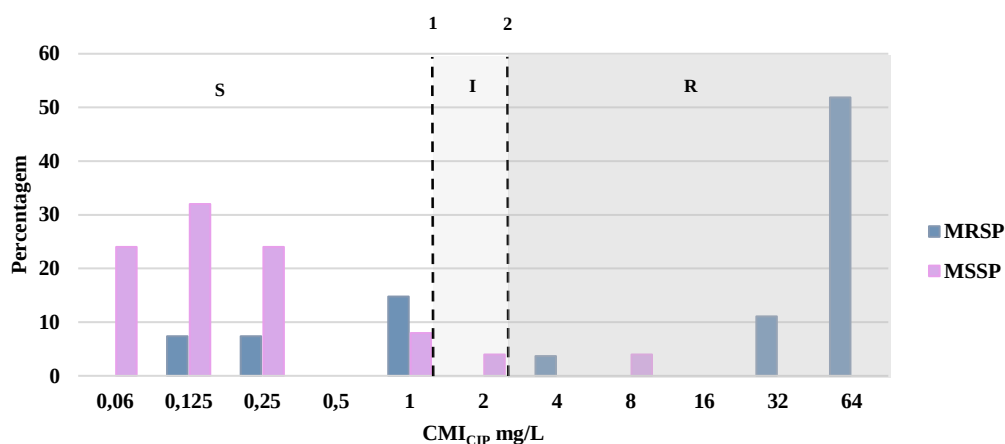


Figura 6 Distribuição dos valores de CMI_{CIP} para isolados MRSP (n= 27) e isolados MSSP (n= 25). S: Suscetível; I: Intermédio; R: Resistente. Valor de *breakpoint* para a CIP (representado pela linha a tracejado): $CIP \leq 1$ mg/L (S); $CMI = 2$ mg/L (I); $CMI \geq 4$ mg/L (R) [109].

Observou-se uma variação dos valores de CMI_{CIP} entre 0,06 e 64 mg/L para a coleção em estudo. Para os isolados MSSP os valores de CMI variaram entre 0,06 e 8 mg/L, enquanto os isolados MRSP apresentaram valores entre 0,125 e 64 mg/L. Esta diferença na gama de CMI_{CIP} entre MRSP e MSSP demonstrou ser estatisticamente significativa ($p < 0,001$).

A categorização dos isolados aplicando os valores de *breakpoint* estabelecidos pela CLSI (2020), foi concordante com a caracterização prévia dos isolados pelo método de *Kirby-Bauer* (Tabela 15) [109, 112].

Todos os isolados previamente categorizados como resistentes à ciprofloxacina apresentaram valores de CMI_{CIP} entre 4 e 64 mg/L; o único isolado classificado como intermédio apresentou uma CMI_{CIP} de 2 mg/L; enquanto os isolados considerados suscetíveis apresentaram valores de CMI_{CIP} entre 0,06 e 1 mg/L.

Tabela 15. Caracterização fenotípica dos isolados de *S. pseudintermedius*.

Estirpe	Ano	MRSP/ MSSP ^{a,*}	Perfil de resistência ^{b,*}	CMI (mg/L) ^c			
				EtBr	CIP	TZ	VER
DSM21284 ^T		MSSP	---	1	0,125	50	1600
BIOS-V11	2018	MSSP	---	1	0,06	25	1600
BIOS-V106	2017	MSSP	---	1	0,25	25	1600
BIOS-V225	2015	MSSP	---	1	0,125	25	1600
BIOS-V10	2018	MSSP	PEN	1	0,06	25	1600
BIOS-V211	2018	MSSP	TET	1	0,25	25	800
BIOS-V48	2014	MSSP	PEN, TET	0,5	0,25	25	1600
BIOS-V90	2015	MSSP	PEN, TET	1	0,25	25	1600
BIOS-V230	2018	MSSP	PEN, TET	1	0,06	25	1600
BIOS-V231	2018	MSSP	PEN, TET	2	0,125	25	800
BIOS-V15	2018	MSSP	PEN, AG	2	0,125	25	1600
BIOS-V65	2018	MSSP	PEN, SXT	2	0,25	25	800
BIOS-V120	2017	MSSP	PEN, FEN	1	0,06	25	800
BIOS-V212	2018	MSSP	PEN, FUS	2	0,125	25	1600
BIOS-V79	2015	MSSP	PEN, TET, SXT	1	0,125	25	1600
BIOS-V136	2015	MSSP	PEN, TET, FUS	1	0,25	50	1600
BIOS-V175	2018	MSSP	PEN, TET, AG	1	0,06	25	800
BIOS-V164	2018	MSSP	PEN, ERY, CLI, AG	1	0,125	25	1600
BIOS-V96	2015	MSSP	PEN, ERY, CLI, AG, FEN	1	1	25	800
BIOS-V242	2018	MSSP	PEN, ERY, CLI, AG, TET	2	1	25	1600
BIOS-V39	2016	MSSP	PEN, ERY, CLI, AG, TET, FEN	2	1	25	800
BIOS-V190	2018	MSSP	PEN, ERY, CLI, AG, SXT, FEN	0,5	0,06	25	1600
BIOS-V218	2018	MSSP	PEN, ERY, CLI, AG, FEN, FUS	1	0,25	25	1600
BIOS-V68	2015	MSSP	PEN, ERY, CLI, AG, FEN, SXT, TET	1	0,125	25	800
BIOS-V84	2015	MSSP	PEN, TET, FQ	1	8	25	1600
BIOS-V101	2017	MSSP	PEN, ERY, CLI, AG, FEN, TET, FQ	1	2	25	1600
BIOS-V29	2018	MRSP^e	PEN	1	0,125	25	1600
BIOS-V26	2017	MRSP	PEN, OXA, TET	0,5	0,25	25	1600
BIOS-V119	2018	MRSP	PEN, OXA, AG, FEN	0,5	0,125	25	1600
BIOS-V7	2015	MRSP	PEN, OXA, ERY, CLI, AG, TET, SXT	1	1	25	1600
BIOS-V127	2016	MRSP	PEN, OXA, ERY, CLI, AG, TET, SXT	2	1	25	800
BIOS-V276	2018	MRSP	PEN, OXA, ERY, CLI, AG, TET, FEN	4	1	25	1600
BIOS-V122	2018	MRSP^e	PEN, ERY, CLI, AG, TET, FEN, SXT	1	1	25	1600
BIOS-V217	2018	MRSP	PEN, OXA, ERY, CLI, AG, TET, FEN, SXT	1	0,25	25	800
BIOS-V105	2017	MRSP	PEN, OXA, FQ , SXT	1	64	25	800
BIOS-V179	2018	MRSP	PEN, OXA, FQ , FUS	1	4	25	1600
BIOS-V213	2018	MRSP	PEN, OXA, ERY, CLI, AG, FQ , TET	1	64	25	1600
BIOS-V52	2017	MRSP	PEN, OXA, ERY, CLI, AG, FQ , SXT	2	64	25	1600
BIOS-V302	2018	MRSP	PEN, OXA, ERY, CLI, AG, FQ , SXT	2	64	25	1600
BIOS-V228	2018	MRSP	PEN, OXA, ERY, CLI, AG, FQ , FEN	1	64	25	1600
BIOS-V64	2018	MRSP	PEN, OXA, ERY, CLI, AG, FQ , SXT, FUS	2	64	25	1600
BIOS-V240	2018	MRSP	PEN, OXA, AG, TET, FQ , SXT, RIF	4	64	25	1600

^aMRSP: *S. pseudintermedius* resistente à meticilina; MSSP: *S. pseudintermedius* suscetível à meticilina. ^bPEN: penicilinas; FQ: fluoroquinolonas (Moxifloxacina; Enrofloxacin; Ciprofloxacina; Pradofloxacina); TET: tetracilinas; ERY: eritromicina; CLI: Clindamicina; AG: aminoglicosídeos (Amicacina; Canamicina; Gentamicina; Tobramicina); SXT: trimetopim-sulfametoxazole; FEN: fenicóis (Cloranfenicol; Florfenicol); RIF: rifampicina; FUS: ácido fusídico; OXA: oxacilina; ---: sem resistências aos antibióticos estudados. ^cEtBr: brometo de etídeo; CIP: ciprofloxacina; TZ: tioridazina; VER: verapamil. ^eisolados com presença do gene *mecA* mas fenotipicamente suscetíveis à oxacilina. *Dados obtidos por Moraes *et al.* [112].

Tabela 15. (Continuação)

Estirpe	Ano	MRSP/ MSSP ^{a,*}	Perfil de resistência ^{b,*}	CMI (mg/L) ^c			
				EtBr	CIP	TZ	VER
BIOS-V40	2016	MRSP	PEN, OXA, ERY, CLI, AG, FQ, TET, SXT	4	64	25	1600
BIOS-V207	2018	MRSP	PEN, OXA, ERY, CLI, AG, FQ, TET, SXT	2	64	25	800
BIOS-V224	2018	MRSP	PEN, OXA, ERY, CLI, AG, FQ, TET, FEN	1	64	25	1600
BIOS-V270	2018	MRSP	PEN, OXA, ERY, CLI, AG, FQ, TET, SXT	1	32	25	1600
BIOS-V280	2018	MRSP	PEN, OXA, ERY, CLI, AG, FQ, TET, SXT	4	64	25	1600
BIOS-V143	2014	MRSP	PEN, OXA, ERY, CLI, AG, FQ, TET, SXT.	2	64	50	800
BIOS-V292	2018	MRSP	PEN, OXA, ERY, CLI, AG, FQ, TET, FEN	1	32	25	1600
BIOS-V97	2015	MRSP	PEN, OXA, ERY, CLI, AG, FQ, TET, SXT, FEN	1	64	25	1600
BIOS-V144	2014	MRSP	PEN, OXA, ERY, CLI, AG, FQ, TET, SXT, FUS	2	64	25	1600
BIOS-V227	2018	MRSP	PEN, OXA, ERY, CLI, AG, FQ, TET, SXT, RIF	1	32	25	1600
BIOS-V264	2018	MRSP	PEN, OXA, ERY, CLI, AG, FQ, TET, SXT, FEN	4	64	25	1600

^aMRSP: *S. pseudintermedius* resistente à meticilina; MSSP: *S. pseudintermedius* suscetível à meticilina. ^bPEN: penicilinas; FQ: fluoroquinolonas (Moxifloxacina; Enrofloxacin; Ciprofloxacina; Pradofloxacina); TET: tetraciclina; ERY: eritromicina; CLI: Clindamicina; AG: aminoglicosídeos (Amicacina; Canamicina; Gentamicina; Tobramicina); SXT: trimetopim-sulfametoxazole; FEN: fenicóis (Cloranfenicol; Florfenicol); RIF: rifampicina; FUS: ácido fusídico; OXA: oxacilina; ---: sem resistências aos antibióticos estudados. ^cEtBr: brometo de etídeo; CIP: ciprofloxacina; TZ: tioridazina; VER: verapamil. ^eisolados com presença do gene *mecA* mas fenotipicamente suscetíveis à oxacilina. *Dados obtidos por Morais *et al.* [112].

3.5. Análise da atividade de efluxo utilizando o EtBr como marcador

3.5.1. Determinação de concentrações mínimas inibitórias dos inibidores de efluxo

O efeito dos inibidores de efluxo é avaliado utilizando estes compostos a uma concentração subinibitória, correspondendo a metade ou a um quarto do valor da sua CMI, de modo a garantir a viabilidade celular durante os ensaios. Assim, foi necessário determinar as CMIs dos inibidores TZ e VER para os 52 isolados em estudo. Como descrito na Tabela 15, estes valores de CMI variaram entre 25 - 50 mg/L para a TZ e entre 800 – 1600 mg/L para o VER. Deste modo, foi decidido utilizar, para todos os isolados, uma concentração de 12,5 mg/L de TZ e 400 mg/L de VER para a re-determinação de CMI_{EtBr} e CMI_{CIP} na presença destes inibidores.

3.5.2. Efeito dos inibidores de efluxo na CMI do EtBr

Os valores de CMI_{EtBr} e CMI_{CIP} na presença dos dois inibidores de efluxo para a coleção estudada encontram-se discriminados na Tabela 16 e correspondem ao resultado de dois ou mais ensaios independentes e concordantes.

Tabela 16. Efeito dos inibidores de efluxo TZ e VER no valor da CMI_{EtBr} e CMI_{CIP} para a coleção de *S. pseudintermedius* em estudo.

Estirpe	MRSP/ MSSP ^a *	Perfil de Resistência a FQ ^b *	Fenótipo Resistência ^c *	CMI (mg/L) ^d					
				EtBr			CIP		
				Sem IE	+TZ	+VER	Sem IE	+TZ	+VER
DSM21284 ^T	MSSP	---	---	1	0,03 (↓32)	0,03 (↓32)	0,125	0,125	0,125
BIOS-V11	MSSP	---	---	1	0,125 (↓8)	0,03 (↓32)	0,06	0,06	0,06
BIOS-V106	MSSP	---	---	1	0,25 (↓4)	0,06 (↓16)	0,25	0,25	0,25
BIOS-V225	MSSP	---	---	1	0,5	0,125 (↓8)	0,125	0,125	0,125
BIOS-V10	MSSP	---	---	1	0,25 (↓4)	0,125 (↓8)	0,06	0,06	0,06
BIOS-V211	MSSP	---	---	1	0,25 (↓4)	0,06 (↓16)	0,25	0,125	0,25
BIOS-V48	MSSP	---	---	0,5	0,125 (↓4)	0,015 (↓32)	0,25	0,06 (↓4)	0,06 (↓4)
BIOS-V90	MSSP	---	---	1	0,125 (↓8)	0,06 (↓16)	0,25	0,125	0,25
BIOS-V230	MSSP	---	---	1	0,06 (↓16)	0,03 (↓32)	0,06	0,06	0,06
BIOS-V231	MSSP	---	---	2	0,25 (↓8)	0,125 (↓16)	0,125	0,06	0,125
BIOS-V15	MSSP	---	---	2	0,125 (↓8)	0,06 (↓16)	0,125	0,125	0,125
BIOS-V65	MSSP	---	---	2	0,125 (↓16)	0,03 (↓64)	0,25	0,25	0,25
BIOS-V120	MSSP	---	---	1	0,06 (↓16)	0,03 (↓32)	0,06	0,06	0,06
BIOS-V212	MSSP	---	---	2	0,25 (↓8)	0,06 (↓32)	0,125	0,06	0,06
BIOS-V79	MSSP	---	MDR	1	0,125 (↓8)	0,03 (↓32)	0,125	0,125	0,125
BIOS-V136	MSSP	---	MDR	1	0,125 (↓8)	0,03 (↓32)	0,25	0,125	0,25
BIOS-V175	MSSP	---	MDR	1	0,06 (↓16)	0,03 (↓32)	0,06	0,06	0,06
BIOS-V164	MSSP	---	MDR	1	0,125 (↓8)	0,06 (↓16)	0,125	0,06	0,06
BIOS-V96	MSSP	---	MDR	1	0,06 (↓16)	0,06 (↓16)	1	0,5	0,5
BIOS-V242	MSSP	---	MDR	2	0,06 (↓32)	0,03 (↓64)	1	1	0,5
BIOS-V39	MSSP	---	MDR	2	0,125 (↓16)	0,03 (↓64)	1	0,25 (↓4)	0,5
BIOS-V190	MSSP	---	MDR	0,5	0,03 (↓16)	0,03 (↓16)	0,06	0,06	0,06
BIOS-V218	MSSP	---	MDR	1	0,25 (↓4)	0,125 (↓8)	0,25	0,06 (↓4)	0,25
BIOS-V68	MSSP	---	MDR	1	0,06 (↓16)	0,03 (↓32)	0,5	0,5	0,5
BIOS-V84	MSSP	CIP, ENR	MDR	1	0,06 (↓16)	0,06 (↓16)	8	8	8
BIOS-V101	MSSP	CIP(I), ENR(I)	MDR	1	0,06 (↓16)	0,06 (↓16)	2	2	2

^aMRSP: *S. pseudintermedius* resistente à metilina; MSSP: *S. pseudintermedius* suscetível à metilina; ^baCIP: ciprofloxacina; MOX: moxifloxacina; ENR: enrofloxacin (I): resistência intermédia; ---: sem resistências fenotípicas; ^cMDR: *multidrug-resistance*; --- não MDR; ^dEtBr: brometo de etídeo; CIP: ciprofloxacina; IE: inibidor de efluxo; TZ: tioridazina; VER: verapamil; Os valores a sombreado correspondem a CMIs que decresceram pelo menos ¼ da CMI inicial na presença do inibidor de efluxo, nestes casos, indica-se em parêntesis o decréscimo da CMI em relação ao valor estabelecido na ausência de inibidor. Os inibidores VER e TZ foram utilizados a concentrações sub-inibitórias, 400 mg/L e 12,5 mg/L, respetivamente. * Dados obtidos por Morais *et al.* [112].

Tabela 16. (Continuação)

Estirpe	MRSP/ MSSP ^a *	Perfil de Resistência a FQ ^b *	Fenótipo Resistência ^c *	CMI (mg/L) ^d					
				EtBr			CIP		
				Sem IE	+TZ	+VER	Sem IE	+TZ	+VER
BIOS-V29	MRSP ^e	---	---	1	0,03 (↓32)	0,03 (↓32)	0,125	0,125	0,125
BIOS-V26	MRSP	---	MDR	0,5	0,06 (↓8)	0,03 (↓16)	0,25	0,125	0,125
BIOS-V119	MRSP	---	MDR	0,5	0,06 (↓8)	0,015 (↓32)	0,25	0,25	0,25
BIOS-V7	MRSP	---	MDR	1	0,06 (↓16)	0,03 (↓32)	1	1	1
BIOS-V127	MRSP	---	MDR	2	0,25 (↓8)	0,03 (↓64)	1	1	1
BIOS-V276	MRSP	---	MDR	4	0,5 (↓8)	0,125 (↓32)	1	0,5	0,5
BIOS-V122	MRSP ^e	---	MDR	1	0,125 (↓8)	0,06 (↓16)	1	0,5	1
BIOS-V217	MRSP	---	MDR	1	0,06 (↓16)	0,03 (↓32)	0,25	0,125	0,125
BIOS-V105	MRSP	CIP, MOX, ENR, PRA	MDR	1	0,125 (↓8)	0,06 (↓16)	64	32	32
BIOS-V179	MRSP	CIP, MOX(I), ENR(I)	MDR	1	0,06 (↓16)	0,125 (↓8)	4	2	4
BIOS-V213	MRSP	CIP, MOX, ENR, PRA	MDR	1	0,125 (↓8)	0,125 (↓8)	64	32	64
BIOS-V52	MRSP	CIP, MOX, ENR, PRA	MDR	2	1	0,25 (↓8)	64	32	64
BIOS-V302	MRSP	CIP, MOX, ENR, PRA	MDR	2	0,5 (↓4)	0,25 (↓8)	64	32	64
BIOS-V228	MRSP	CIP, MOX, ENR, PRA	MDR	1	0,125 (↓8)	0,125 (↓8)	64	32	32
BIOS-V64	MRSP	CIP, MOX, ENR, PRA	MDR	2	1	0,25 (↓8)	64	64	64
BIOS-V240	MRSP	CIP, MOX, ENR, PRA	MDR	4	1 (↓4)	0,125 (↓32)	64	32	64
BIOS-V40	MRSP	CIP, MOX, ENR, PRA	MDR	4	0,5 (↓8)	0,25 (↓16)	64	32	64
BIOS-V207	MRSP	CIP, MOX, ENR, PRA(I)	MDR	2	0,5 (↓4)	0,25 (↓8)	64	64	64
BIOS-V224	MRSP	CIP, MOX, ENR, PRA	MDR	1	0,125 (↓8)	0,125 (↓8)	64	64	64
BIOS-V270	MRSP	CIP, MOX, ENR, PRA	MDR	1	0,25 (↓4)	0,125 (↓8)	32	16	32
BIOS-V280	MRSP	CIP, MOX, ENR, PRA	MDR	4	0,25 (↓16)	0,25 (↓16)	64	32	64
BIOS-V143	MRSP	CIP, MOX, ENR, PRA	MDR	2	0,5 (↓4)	0,5 (↓4)	64	32	32
BIOS-V292	MRSP	CIP, MOX, ENR, PRA	MDR	1	0,125 (↓8)	0,125 (↓8)	32	32	32
BIOS-V97	MRSP	CIP, MOX, ENR, PRA	MDR	1	0,25 (↓4)	0,125 (↓8)	64	32	32
BIOS-V144	MRSP	CIP, MOX, ENR, PRA	MDR	2	1	0,5 (↓4)	64	32	32
BIOS-V227	MRSP	CIP, MOX, ENR, PRA	MDR	1	0,125 (↓8)	0,06 (↓8)	32	32	32
BIOS-V264	MRSP	CIP, MOX, ENR, PRA	MDR	4	1 (↓4)	0,25 (↓16)	64	32	64

^aMRSP: *S. pseudintermedius* resistente à meticilina; MSSP: *S. pseudintermedius* suscetível à meticilina; ^bCIP: ciprofloxacina; MOX: moxifloxacina; ENR: enrofloxacin (I): resistência intermédia; ---: sem resistências fenotípicas; ^cMDR: *multidrug-resistance*; — não MDR; ^dEtBr: brometo de etídeo; CIP: ciprofloxacina; IE: inibidor de efluxo; TZ: tioridazina; VER: verapamil; Os valores a sombreado correspondem a CMIs que decresceram pelo menos ¼ da CMI inicial na presença do inibidor de efluxo, nestes casos, indica-se em parêntesis o decréscimo da CMI em relação ao valor estabelecido na ausência de inibidor. Os inibidores VER e TZ foram utilizados a concentrações sub-inibitórias, 400 mg/L e 12,5 mg/L, respetivamente. * Dados obtidos por Morais *et al.* [112].

Na Figura 7 encontra-se representada a distribuição dos valores de CMI_{EtBr} , na ausência e presença de IEs, para os isolados MSSP estudados.

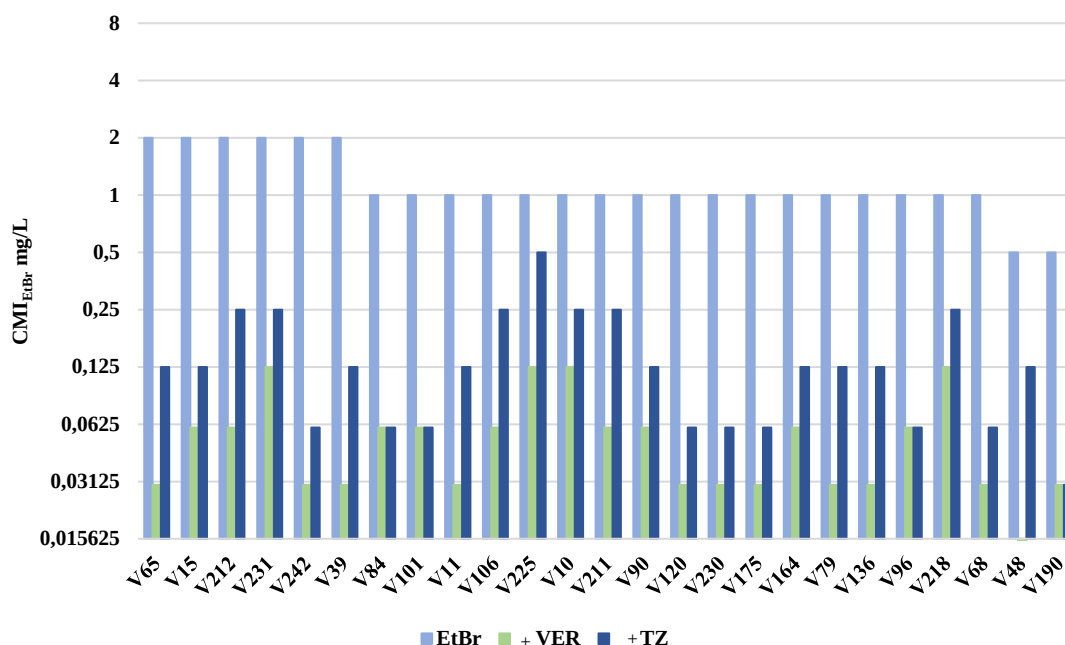


Figura 7. Comparação do efeito dos inibidores VER e TZ na diminuição da CMI_{EtBr} em isolados MSSP (n=25). Os dois inibidores foram usados a concentrações sub-inibitórias, 400 mg/L e 12,5 mg/L, respetivamente.

Neste trabalho, considerou-se que um efeito do IE indicativo de inibição de efluxo correspondendo ao decréscimo da CMI de um composto (EtBr ou CIP) na sua presença para, pelo menos, $\frac{1}{4}$ do valor inicial da CMI para o composto. Assim, em relação ao EtBr e para os 25 isolados MSSP da coleção, verificou-se um decréscimo da CMI_{EtBr} em 96% (24/25) dos isolados na presença do inibidor TZ e em 100% (25/25) dos isolados na presença de VER. Na grande maioria dos casos (21/25 isolados, 84%), verificou-se maior eficácia inibitória pelo VER, com reduções de CMI_{EtBr} entre 8 a 64 vezes, em comparação com TZ, que promoveu reduções de CMI_{EtBr} entre 2 a 32 vezes (Tabela 16, Fig.7).

Não se verificou uma diferença acentuada do efeito inibitório dos IEs entre isolados MSSP com ou sem fenótipo MDR.

Na Figura 8 encontra-se representada a distribuição dos valores de CMI_{EtBr} , na ausência e presença de IEs, para os isolados MRSP estudados.

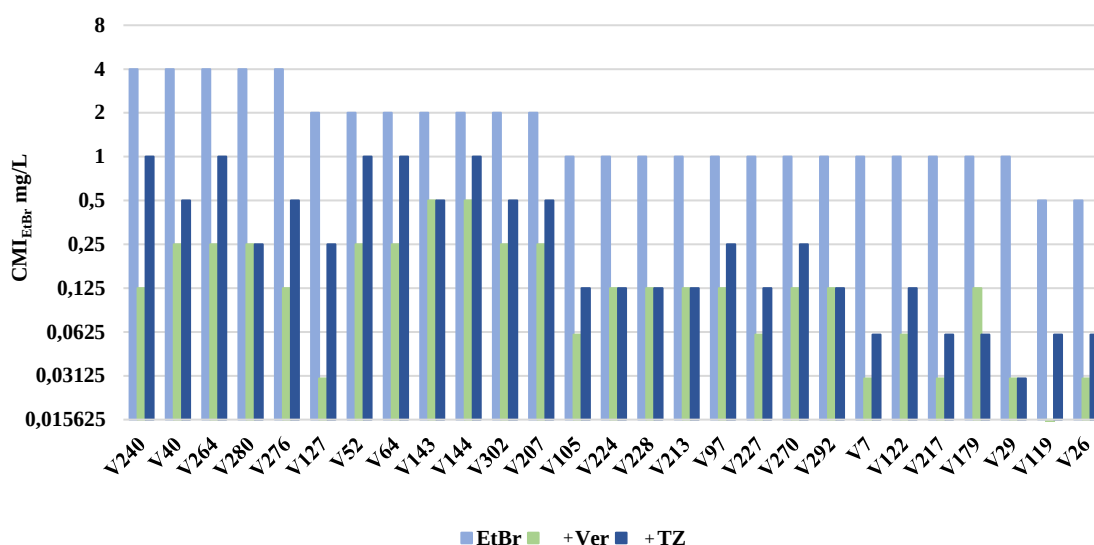


Figura 8. Comparação do efeito dos inibidores VER e TZ na diminuição da CMI_{EtBr} em isolados MRSP (n= 27). Os dois inibidores foram usados a concentrações sub-inibitórias, 400 mg/L e 12,5 mg/L, respetivamente.

Verificou-se um decréscimo significativo da CMI_{EtBr} (para pelo menos $\frac{1}{4}$ do valor original) em 100% (27/27) dos isolados MRSP com os dois IE testados. O inibidor VER demonstrou, para todos os isolados, igual ou maior eficácia, promovendo reduções da CMI_{EtBr} entre 4 a 64 vezes, enquanto o inibidor TZ, promoveu diminuição da CMI_{EtBr} em 74% (20/27) dos isolados MRSP, com reduções entre 2 a 32 vezes (Tabela 16, Fig.8).

No geral, verificou-se que o efeito dos IE foi mais eficaz na diminuição da CMI_{EtBr} inicial nos isolados MSSP em comparação com os isolados MRSP. Nos isolados com CMI_{EtBr} mais elevadas (2-4 mg/L), verificou-se uma diminuição da CMI_{EtBr} entre 16 a 64 vezes com o inibidor VER e de 4 a 32 vezes com o inibidor TZ. Para os restantes isolados (nos quais a CMI_{EtBr} inicial variou entre 0,5 e 1 mg/L), o efeito dos inibidores reduziu a CMI_{EtBr} até 8 a 64 vezes na presença de VER e 4 a 32 vezes na presença de TZ.

De um modo geral, o efeito dos inibidores de efluxo na CMI_{EtBr} inicial não permitiu estabelecer uma relação entre a CMI_{EtBr} inicial mais elevada (CMI_{EtBr} = 4 mg/L) e um efeito mais pronunciado dos IE. Os dados apresentados sugerem a presença de níveis consideráveis de atividade de efluxo em todos os isolados, através dos resultados obtidos para o EtBr, tendo em conta que para todos se verificou um decréscimo para pelo

menos $\frac{1}{4}$ da CMI_{EtBr} inicial na presença de pelo menos um dos inibidores de efluxo estudados.

3.5.3. Detecção dos genes plasmídicos *qacA/B* e *smr*

A presença dos genes *qacA/B* e *smr*, que codificam para as bombas de efluxo plasmídicas QacA/B e Smr, respetivamente, e que estão associadas à suscetibilidade reduzida a biocidas e ao EtBr, foi pesquisada inicialmente no grupo de 52 isolados em estudo e posteriormente estendida à coleção inicial de 157 isolados de *S. pseudintermedius* associados a SSTIs em animais de companhia, existentes no laboratório de Microbiologia Médica do IHMT/UNL.

Não se detetaram os genes *qacA/B* ou *smr* para nenhum dos 157 *S. pseudintermedius* testados. Na Figura 9 são apresentados dois dos resultados obtidos, onde apenas se verificou amplificação dos fragmentos pesquisados para as estirpes controlo *S. aureus* SM39 e SM52, respetivamente.

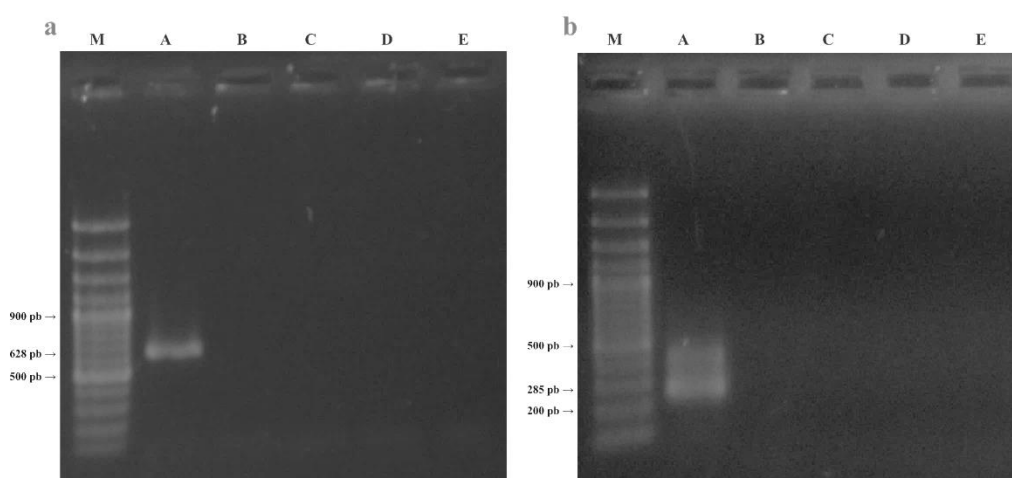


Figura 9. Eletroforese em gel de agarose a 1% dos produtos de amplificação de um fragmento interno ao gene *qacA/B* (a) e ao gene *smr* (b). M: Marcador 100 bp DNA Ladder Plus Gene Ruler; A: Controlo positivo *S. aureus* SM39; B: Controlo negativo ATCC®25923™; C: Controlo negativo da reação (H₂O); D: BIOS- V15; E: BIOS-V65. B) M: Marcador 100 bp DNA Ladder Plus Gene Ruler; A: Controlo positivo *S. aureus* SM52; B: Controlo negativo ATCC®25923™; C: Controlo negativo da reação (H₂O); D: BIOS-V68; E: BIOS- V218.

3.6. Análise dos mecanismos de resistência às fluoroquinolonas: Efluxo vs mutações no alvo

3.6.1. Efeito dos inibidores de efluxo na CMI da CIP

Em relação ao efeito dos inibidores de efluxo na CMI da ciprofloxacina, também se verificou um efeito significativo no decréscimo da CMI_{CIP} (para pelo menos ¼ do valor original) na presença dos Ies. Em relação aos isolados MSSP a distribuição dos valores de CMI_{CIP} na ausência e na presença dos Ies estudados, encontra-se representada na Figura 10.

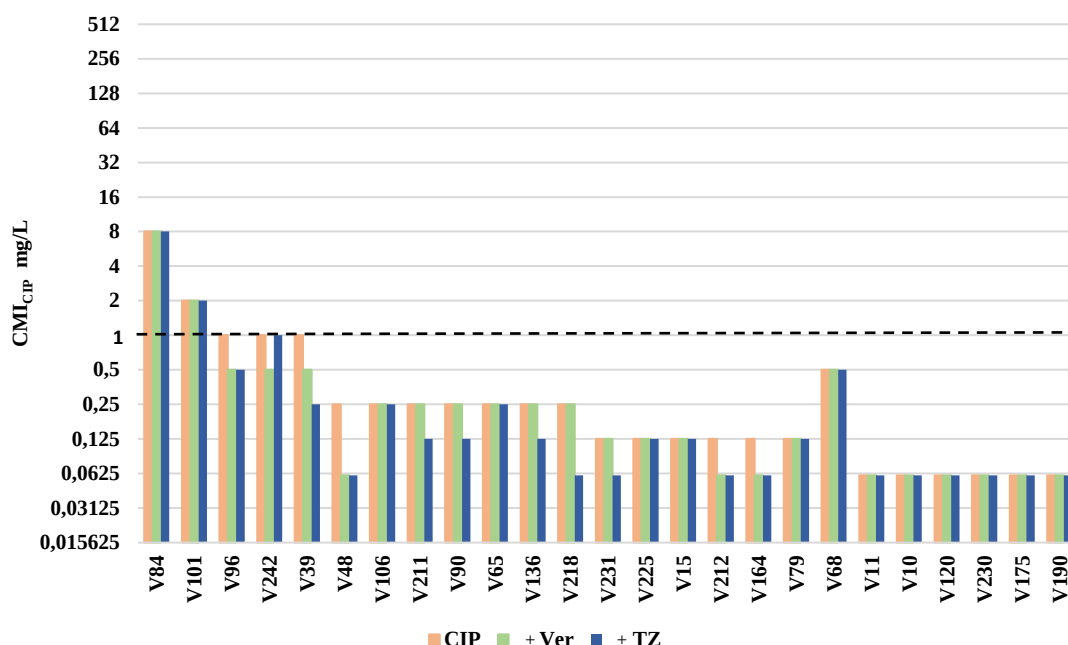


Figura 10. Comparação do efeito dos inibidores de efluxo em estudo na diminuição da CMI_{CIP} em isolados MSSP (n=25) Valor de *breakpoint* para a CIP: CMI ≤ 1 mg/L (Suscetível, linha a tracejado); CMI= 2 mg/L (Intermédio) ; CMI ≥ 4 mg/L (resistente) [109]. Os dois inibidores, verapamil (VER) e tioridazina (TZ), foram usados a concentrações sub-inibitórias, 400 mg/L e 12,5 mg/L, respetivamente.

Nos isolados MSSP, foi verificado um decréscimo significativo da CMI_{CIP} (para pelo menos ¼ do valor original) na presença de TZ em 12% (3/25) dos isolados, e num deles verificou-se também a sua diminuição na presença de VER. Em 7 isolados verificou-se uma redução para 1/2 da CMI_{CIP} inicial na presença do inibidor TZ e/ou do inibidor VER (4 isolados). Os restantes 15 isolados não sofreram redução da CMI_{CIP}

inicial com nenhum dos IE estudados. De um modo geral, verificou-se uma maior capacidade de diminuição do efluxo pelo inibidor TZ.

Para os isolados MRSP a distribuição dos valores de $CMICIP$, encontra-se representada na Figura 11 na ausência e presença dos IEs estudados.

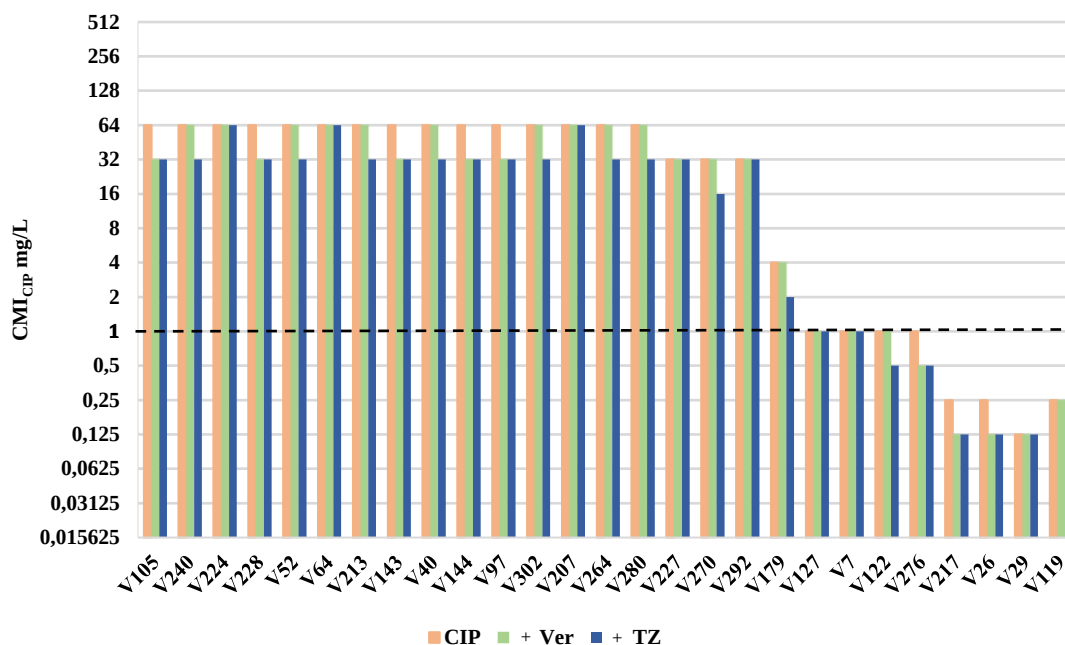


Figura 11. Comparação do efeito dos inibidores de efluxo em estudo na diminuição da $CMICIP$ em isolados MRSP (n=27). Valor de breakpoint para a CIP: $CMICIP \leq 1$ mg/L (Suscetível, linha a tracejado); $CMICIP = 2$ mg/L (Intermédio); $CMICIP > 4$ mg/L (resistente) [109]. Os dois inibidores foram usados a concentrações sub-inibitórias, 400 mg/L e 12,5 mg/L, respetivamente.

Não se verificou decréscimo significativo da $CMICIP$ (para pelo menos $\frac{1}{4}$ do valor original) em nenhum dos isolados MRSP, tanto na presença de TZ como de VER, como representado na Figura 11.

No geral para os isolados MRSP, e apesar de não ser considerado um decréscimo significativo da $CMICIP$ inicial, verificou-se uma redução para $\frac{1}{2}$ da $CMICIP$ inicial em cerca de 66% dos isolados (18/27), sendo que 18 isolados apresentaram diminuição da $CMICIP$ na presença do inibidor TZ e desses, 8 isolados também apresentaram redução da sua $CMICIP$ inicial na presença de VER. Os restantes 9 isolados não sofreram qualquer alteração.

Desta forma, apenas se detetou uma atividade de efluxo significativa para três isolados, todos eles MSSP e suscetíveis à CIP. No entanto, todos os isolados

fenotipicamente resistentes à ciprofloxacina e a outras fluoroquinolonas, revelaram $\text{CMI}_{\text{CIP}} \geq 4 \text{ mg/L}$. Para compreender melhor o(s) mecanismo(s) de resistência às fluoroquinolonas nestes isolados, foi realizada a análise de possíveis mutações na região QRDR dos genes *grlA* e *gyrA*, codificantes para os alvos celulares destes antibióticos (Tabela 17, página 45).

3.6.2. Detecção de mutações que conferem resistência a fluoroquinolonas

Da coleção de 52 *S. pseudintermedius* em estudo, selecionaram-se 42 isolados, com base no seu perfil de suscetibilidade à CIP, para rastreio de mutações no cromossoma frequentemente associadas a resistência a fluoroquinolonas em *Staphylococcus* spp., nomeadamente as mutações que ocorrem na região QRDR dos genes *grlA* e *gyrA*. Os 42 *S. pseudintermedius* selecionados englobam 21 isolados suscetíveis, 1 isolado com resistência intermédia e 20 isolados resistentes à CIP.

Para a deteção de possíveis mutações, foi amplificado por PCR um fragmento interno dos genes de interesse, que compreende a região QRDR de cada um dos genes. Na Figura 12, são apresentados alguns dos produtos de amplificação por PCR obtidos para os genes *grlA* e *gyrA*, respetivamente.

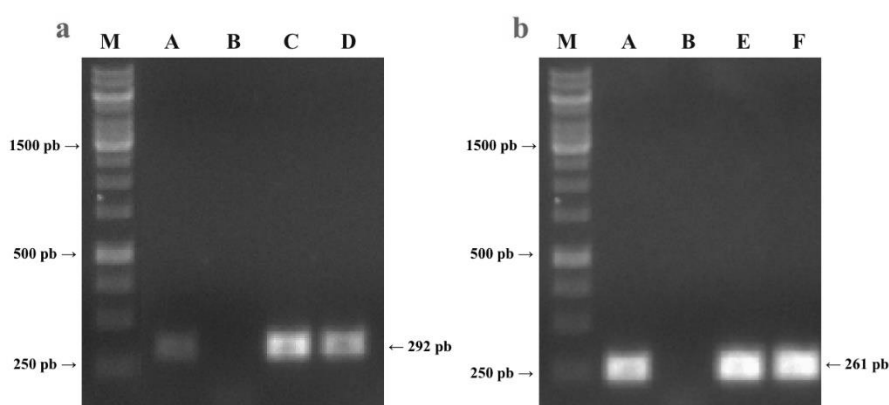


Figura 12. Eletroforese em gel de agarose a 1% dos produtos de amplificação de um fragmento interno ao gene *grlA* (a) e ao gene *gyrA* (b). M: Marcador 1kb Plus DNA Ladder Gene Ruler; A: Controlo positivo *S. pseudintermedius* DSM21284^T; B: Controlo Negativo (H₂O); C: BIOS-V48; D: BIOS- V65. E: BIOS- V122; F: BIOS- V127.

Os produtos de amplificação foram depois purificados, sequenciados e analisados, tendo por referência a estirpe *S. pseudintermedius* DSM21284^T, suscetível às fluoroquinolonas. No total, dos 43 isolados analisados (42 isolados da coleção e a estirpe

tipo *S. pseudintermedius* DSM21284^T), 27 apresentaram mutações na região QRDR dos genes *grlA* e/ou *gyrA*, em seis combinações diferentes ao nível da proteína (Tabela 17).

Tabela 17. Relação entre a presença de mutações na região QRDR de *grlA* e *gyrA* e perfil de resistência a fluoroquinolonas para um conjunto de 43 *S. pseudintermedius*.

Estirpe	Perfil de Resistência a FQ ^a	CMI _{CIP} (mg/L)	Mutações na região QRDR ^b	
			GrlA	GyrA
DSM21284 ^T	---	0,125	s.m.	s.m.
BIOS-V10	---	0,06	s.m.	s.m.
BIOS-V11	---	0,06	s.m.	s.m.
BIOS-V15	---	0,125	s.m.	s.m.
BIOS-V29	---	0,125	s.m.	s.m.
BIOS-V164	---	0,125	s.m.	s.m.
BIOS-V225	---	0,125	s.m.	s.m.
BIOS-V231	---	0,125	s.m.	s.m.
BIOS-V48	---	0,25	s.m.	s.m.
BIOS-V65	---	0,25	s.m.	s.m.
BIOS-V106	---	0,25	s.m.	s.m.
BIOS-V119	---	0,25	s.m.	s.m.
BIOS-V218	---	0,25	s.m.	s.m.
BIOS-V136	---	0,25	s.m.	s.m.
BIOS-V217	---	0,25	s.m.	s.m.
BIOS-V7	---	1	s.m.	s.m.
BIOS-V212	---	0,125	Ser80Ile	s.m.
BIOS-V39	---	1	Ser80Ile	s.m.
BIOS-V122	---	1	Ser80Ile	s.m.
BIOS-V127	---	1	Ser80Ile	s.m.
BIOS-V242	---	1	Ser80Ile	s.m.
BIOS-V276	---	1	Asp84Gly	s.m.
BIOS-V101	CIP(I), ENR(I)	2	Ser80Arg	Asp83Asn
BIOS-V179	CIP, MOX(I), ENR(I)	4	Asp84Asn	Ser84Leu
BIOS-V84	CIP, ENR	8	Asp84Gly	Ser84Leu
BIOS-V270	CIP, MOX, ENR, PRA	32	Ser80Ile	Ser84Leu
BIOS-V227	CIP, MOX, ENR, PRA	32	Ser80Ile	Ser84Leu
BIOS-V292	CIP, MOX, ENR, PRA	32	Ser80Ile	Ser84Leu
BIOS-V40	CIP, MOX, ENR, PRA	64	Ser80Ile	Ser84Leu
BIOS-V52	CIP, MOX, ENR, PRA	64	Ser80Ile	Ser84Leu
BIOS-V64	CIP, MOX, ENR, PRA	64	Ser80Ile	Ser84Leu
BIOS-V97	CIP, MOX, ENR, PRA	64	Ser80Ile	Ser84Leu
BIOS-V105	CIP, MOX, ENR, PRA	64	Ser80Ile	Ser84Leu
BIOS-V143	CIP, MOX, ENR, PRA	64	Ser80Ile	Ser84Leu
BIOS-V144	CIP, MOX, ENR, PRA	64	Ser80Ile	Ser84Leu
BIOS-V207	CIP, MOX, ENR, PRA(I)	64	Ser80Ile	Ser84Leu
BIOS-V213	CIP, MOX, ENR, PRA	64	Ser80Ile	Ser84Leu
BIOS-V224	CIP, MOX, ENR, PRA	64	Ser80Ile	Ser84Leu
BIOS-V228	CIP, MOX, ENR, PRA	64	Ser80Ile	Ser84Leu
BIOS-V240	CIP, MOX, ENR, PRA	64	Ser80Ile	Ser84Leu
BIOS-V264	CIP, MOX, ENR, PRA	64	Ser80Ile	Ser84Leu
BIOS-V280	CIP, MOX, ENR, PRA	64	Ser80Ile	Ser84Leu
BIOS-V302	CIP, MOX, ENR, PRA	64	Ser80Ile	Ser84Leu

^aCIP: ciprofloxacina; MOX: moxifloxacina; ENR: enrofloxacina (I): resistência intermédia; ---: sem resistências fenotípicas; ^bs.m.: sem mutação identificada na região QRDR; Ser: serina; Leu: leucina; Asp: ácido aspártico; Asn: asparagina; Ile: isoleucina; Gly: glicina; Arg: arginina.

A maioria dos isolados apresentou uma mutação em GrlA e uma mutação adicional em GyrA. O padrão mais comum, detetado em 18 isolados, corresponde às mutações Ser80Ile/Ser84Leu em GrlA e GyrA, respetivamente. Foram ainda detetados os padrões Asp84Gly/Ser84Leu (um isolado), Ser80Arg/Asp83Asn (um isolado), Asp84Asn/Ser84Leu (um isolado) e seis isolados com uma única mutação em GrlA; Ser80Ile (cinco isolados) ou Asp84Gly (um isolado).

Todos os isolados resistentes a fluoroquinolonas apresentam um dos padrões de mutações acima descritas consistindo numa mutação em cada alvo, maioritariamente Ser80Ile/Ser84Leu, Asp84Asn/ Ser84Leu ou Asp84Gly/Ser84Leu. O isolado V101, com perfil de suscetibilidade intermédia à CIP e ENR, apresenta as mutações Ser80Arg/Asp83Asn em GrlA e GyrA, respetivamente.

De referir os isolados V122, V127, V212, V242 e V39, que apesar de apresentarem um perfil de suscetibilidade a fluoroquinolonas, possuem uma mutação na região QRDR de GrlA (Ser80Ile) e o isolado V276, que apresenta mutação na região QRDR de GrlA (Asp84Gly). Os restantes 15 isolados, com fenótipo de suscetibilidade às fluoroquinolonas, não apresentaram qualquer mutação na região QRDR de GrlA ou GyrA (Tabela 17)

4. Discussão

A espécie *S. pseudintermedius* coloniza a pele e as mucosas de animais de companhia, maioritariamente cães. É também um agente patogénico oportunista, constituindo cerca de 90% dos isolados *Staphylococcus* spp. recolhidos de cães com pioderma canino, sendo uma importante causa de morbilidade nestes animais [20]. Apesar de raras, já foram descritas infeções em humanos causadas por *S. pseudintermedius*, demonstrando o potencial zoonótico desta espécie [40-56]. O tratamento das infeções causadas por *S. pseudintermedius* tem-se tornado cada vez mais desafiante devido à emergência e disseminação de vários mecanismos de resistência a antibióticos e a outros agentes antimicrobianos como os biocidas, contribuindo para o aumento de infeções recorrentes, para a morbilidade e mortalidade em animais de companhia [41-44].

As bombas de efluxo têm a capacidade de extrusar compostos antimicrobianos, como antibióticos e biocidas. Apesar de já terem sido identificados múltiplos sistemas de efluxo com potencial de contribuir para a resistência a antibióticos e outros compostos antimicrobianos em estafilococos [66], ainda são escassos os estudos que avaliam a contribuição do efluxo para a resistência aos antimicrobianos em *S. pseudintermedius*.

Nesta Dissertação, pretendemos estudar a contribuição do efluxo para a resistência de *S. pseudintermedius* a compostos antimicrobianos, em particular às fluoroquinolonas. Para tal, estudou-se um conjunto de 52 *S. pseudintermedius*, associados a SSTIs em animais de companhia, recolhidos de dois laboratórios de diagnóstico veterinário do distrito de Lisboa, Portugal. Este conjunto é representativo dos diferentes fenótipos de resistência às fluoroquinolonas e outros antibióticos identificados numa coleção mais ampla que engloba um total de 157 isolados de *S. pseudintermedius*, onde se verificou que 46% dos isolados são MDR e que 96% dos isolados MDR são MRSP. Em relação à resistência às fluoroquinolonas, verificou-se que 24,2% dos isolados são resistentes à ciprofloxacina, 23,5% à enrofloxacin, 22,9% à moxifloxacina e 20,4% à pradofloxacina. [112].

Um dos maiores problemas associados à resistência aos antibióticos em medicina veterinária, prende-se com o facto das opções terapêuticas serem bastante limitadas para os microrganismos multirresistentes, sendo necessário o recurso a antibióticos utilizados exclusivamente para tratamento humano (7, 64).

A primeira abordagem utilizada nesta Dissertação baseia-se no uso do EtBr como marcador de atividade de efluxo, uma vez que é substrato da maioria dos sistemas de efluxo MDR de estafilococos [66, 72, 73, 89, 98, 91, 101], tendo-se avaliado a suscetibilidade a este composto na coleção em estudo. Para tal, foi determinada a CMI_{EtBr} , já que vários estudos têm demonstrado que o seu aumento está associado a atividade de efluxo aumentada.

Os valores obtidos pela determinação da CMI_{EtBr} foram também utilizados para a determinação do valor de *cut-off* para o EtBr, o qual possibilitou a separação da população WT, desprovida de mecanismos de resistência adquirida ao EtBr, da população NWT [99]. A avaliação da distribuição de valores da CMI_{EtBr} e posterior cálculo do valor de *cut-off* para identificação da população NWT para o EtBr, é uma estratégia anteriormente aplicada a outros estafilococos como *S. epidermidis* [113] e *S. aureus* [114, 115]. Nestas espécies, a sua aplicação permitiu identificar isolados categorizados como NWT, transportando bombas de efluxo associadas à extrusão de EtBr. Esta abordagem não tinha sido ainda aplicada a *S. pseudintermedius*, não se conhecendo à partida a variação das CMI_{EtBr} para esta espécie. Os resultados obtidos permitiram estabelecer um valor de corte CO_{WT} de 8 mg/L, com base no qual, isolados de *S. pseudintermedius* com valores de $CMI_{EtBr} < 8$ mg/L são considerados como WT, enquanto isolados com CMI_{EtBr} acima desse valor são classificados como NWT ($CMI_{EtBr} > 8$ mg/L). A aplicação deste valor de corte à coleção estudada revelou que todos os isolados apresentam $CMI_{EtBr} < 8$ mg/L, sendo classificados como pertencentes à população WT. Apesar da ausência de uma população NWT, destacam-se cinco isolados que apresentaram o valor máximo de CMI_{EtBr} observado, 4 mg/L. Estes são MRSP e apresentam igualmente fenótipo MDR.

Em estafilococos, várias bombas de efluxo podem mediar a extrusão do EtBr, incluindo as bombas plasmídicas QacA/B e Smr. Desta forma, pesquisou-se a presença dos respetivos genes (*qacA/B* e *smr*) no grupo de 52 isolados selecionados, tendo-se posteriormente estendido a pesquisa a toda a coleção de 157 *S. pseudintermedius* disponível no laboratório. Verificou-se que nenhum dos isolados apresentou qualquer um destes três genes plasmídicos. Este foi um resultado inesperado, já que a presença destes genes tem sido reportada tanto em MRSP como em MSSP [74, 75, 79, 116]. Num estudo realizado por Couto *et al.*, detetaram-se dois *S. pseudintermedius* com os genes *qacA* (n=1) e *qacB* (n=1), num total de 20 isolados MSSP recolhidos na região de Lisboa [79]. Worthing *et al.*, em 2018, também verificaram a presença de genes *qac*, nomeadamente

qacG (n=8, MRSP), *qacJ* (n=15, MRSP e n=1, MSSP) e *smr* (n=2, MRSP), num total de 108 *S. pseudintermedius* recolhidos em Sydney, Australia [75]. Walker *et al.*, em 2020, conduziram uma investigação nos EUA, onde 74% dos isolados em estudo continham um ou mais genes *qac* [74]. No entanto, num outro estudo conduzido por Nobuo *et al.*, em 2013, no Japão, numa colecção de 100 *S. pseudintermedius* não foi identificado qualquer gene de resistência a biocidas [116]. Assim, podemos concluir que a frequência de genes *qac*, em isolados MSSP ou MRSP, pode depender da localização geográfica de recolha dos isolados, entre outros fatores.

A ausência de genes que codificam para as bombas de efluxo *qac*, codificadas em plasmídeos, e que estão geralmente associadas a valores de CMI_{EtBr} mais elevados [98] pode explicar o facto de não ter sido detetada, nesta coleção, uma população NWT para o EtBr.

Para complementar a avaliação da presença de atividade de efluxo nesta coleção, foi determinada a CMI_{EtBr} na presença dos inibidores de efluxo VER e TZ, tendo-se observado a diminuição da CMI_{EtBr} na presença de IEs, indicando a presença de atividade de efluxo e uma contribuição do efluxo nos níveis de suscetibilidade a este composto. Verificou-se uma diminuição da CMI inicial de 2 a 32 vezes na presença de TZ e/ou 4 a 64 vezes na presença de VER, tendo este último demonstrado uma maior capacidade inibitória de efluxo. Assim, os resultados obtidos sugerem que *S. pseudintermedius* pode mediar resistência ao EtBr e outros compostos antimicrobianos por efluxo.

No entanto, a atividade de efluxo detetada parece advir de sistemas de efluxo cromossómicos, os quais poderão ter adicionalmente o potencial de extrusão de antibióticos como as fluoroquinolonas. De facto, é possível que em *S. pseudintermedius* a extrusão de EtBr, à semelhança do observado para outros substratos de bombas de efluxo, como a clorexidina ou QACs, seja mediada por bombas de efluxo cromossómicas, cuja atividade está associada a pequenos incrementos de CMI [86, 98], não permitindo muitas vezes diferenciar populações WT e NWT.

Em *S. aureus*, várias destas bombas de efluxo MDR cromossómicas têm sido implicadas na extrusão de fluoroquinolonas, biocidas e corantes quando sobre-expressas [85-91]. Num estudo conduzido por Huet *et al.*, foi possível demonstrar que a pressão exercida por biocidas resulta num aumento da resistência a outros compostos, pela sobre-expressão de genes que codificam para as bombas de efluxo NorA, NorB, NorC, MepA

e MdeA [87]. Noutro estudo, conduzido por Costa *et al.*, foi possível demonstrar que a exposição de uma estirpe suscetível, como a estirpe *S. aureus* ATCC®25923™, a concentrações sub-inibitórias ou inibitórias de agentes como o biocida cetrimida, promoveu a resistência cruzada a fluoroquinolonas, revelando o potencial dos biocidas como agentes de pressão seletiva para o aparecimento de resistência a fluoroquinolonas [91].

Também *S. epidermidis* revelou potencial para desenvolver fenótipos de resistência mediados por sistemas de efluxo após exposição a compostos não antibióticos que são substratos de bombas de efluxo MDR. No estudo conduzido por Costa *et al.*, foi possível demonstrar o papel da bomba de efluxo NorA na suscetibilidade reduzida de *S. epidermidis* a biocidas e fluoroquinolonas como a ciprofloxacina e norfloxacin [117]. Até ao momento a única bomba de efluxo identificada no cromossoma de *S. pseudintermedius* é NorA [8], que poderá estar a contribuir para a atividade de efluxo detetada na coleção de *S. pseudintermedius* estudada. Uma vez que esta sobre-expressão pode estar associada a mutações na região promotora de *norA* [66], a eventual contribuição de NorA para os fenótipos observados poderia ser verificada por sequenciação desta região. Poder-se-ia também avaliar o nível de expressão de *norA* através de ensaios de RT-qPCR [66]. Um estudo mais aprofundado é importante para identificar e caracterizar outras bombas de efluxo cromossómicas que possam estar envolvidas no aumento da capacidade de efluxo de *S. pseudintermedius*.

Uma vez que o efluxo está igualmente implicado na resistência a fluoroquinolonas em estafilococos, nesta Dissertação avaliou-se também o papel do efluxo na resistência a esta classe de antibióticos. Dados da EMA, que reportam ao ano de 2018, indicam que as fluoroquinolonas são a terceira classe de antibióticos mais consumida em Portugal para a terapêutica de animais de companhia [118]. Estes dados são concordantes com o facto de a enrofloxacin ser o antibiótico mais prescrito em Portugal para o tratamento de foliculites e pioderma canino [119].

Nesta Dissertação, utilizou-se a ciprofloxacina como molécula repórter para a atividade de efluxo e níveis de resistência às FQ. Para além de ser a molécula habitualmente utilizada nestes estudos, a ciprofloxacina corresponde a um metabolito ativo da fluoroquinolona enrofloxacin [120, 121]. Foi realizado o cálculo da CMI_{CIP} com e sem os inibidores de efluxo TZ e VER. Os resultados da CMI_{CIP} variaram entre 0,06-

64 mg/L, e foram concordantes com fenótipo de resistência a fluoroquinolonas previamente estabelecido por difusão em disco. Na presença dos dois IEs (VER e TZ), apenas se verificou diminuição significativa da CMI_{CIP} em três isolados (5,7%), todos eles com fenótipo de suscetibilidade à CIP e MSSP. Na Tabela seguinte são detalhados os resultados obtidos para estes três isolados (Tabela 18).

Tabela 18. Isolados de *S. pseudintermedius* com diminuição da CMI_{CIP} na presença de inibidores de efluxo.

Estirpe	CMI _{EtBr} ^a			CMI _{CIP} ^b			Mutações na região QRDR ^c	
	Sem IE	+TZ	+VER	Sem IE	+TZ	+VER	GrlA	GyrA
BIOS-V39	2	0,125(↓16)	0,03(↓64)	1	0,25(↓4)	0,5(↓2)	Ser80Ile	s.m.
BIOS-V48	0,5	0,125(↓4)	0,015(↓32)	0,25	0,06(↓4)	0,06(↓4)	s.m.	s.m.
BIOS-V218	1	0,25(↓4)	0,125(↓8)	0,25	0,06(↓4)	0,25	s.m.	s.m.

^aEtBr: brometo de etídeo; IE: inibidor de efluxo; TZ: tioridazina; VER: verapamil. ^bCIP: ciprofloxacina. ^cSer: serina; Ile: isoleucina; s.m.: sem mutação identificada na região QRDR.

Destes três isolados evidenciando diminuição significativa da CMI_{CIP} inicial na presença de, pelo menos um dos IE em estudo, apenas o isolado com resistência intermédia à CIP, BIOS-V39, apresenta uma mutação na região QRDR de GrlA (Ser80Ile). Para os outros dois isolados não foi encontrada nenhuma mutação, revelando uma possível atividade de efluxo basal e o potencial de emergência de resistência às fluoroquinolonas pela exposição a estes antibióticos e sobre-expressão de sistemas de efluxo.

Apesar do papel do efluxo em *S. pseudintermedius* estar pouco aprofundado, vários estudos, com particular incidência em *S. aureus*, *S. epidermidis*, *Escherichia coli* e *Mycobacterium tuberculosis*, têm fornecido dados que apoiam a premissa de que o efluxo desempenha um papel importante na emergência de resistência a antimicrobianos [91, 113-115, 117]. Em particular, já foi demonstrada uma associação entre a sobre-expressão de bombas de efluxo e a suscetibilidade reduzida a fluoroquinolonas [72, 122, 123].

No entanto, e à semelhança do observado em *S. aureus*, sabe-se que em *S. pseudintermedius* a resistência a fluoroquinolonas está maioritariamente relacionada com a ocorrência de mutações nas regiões QRDR dos genes alvo *grlA/B* e *gyrA/B* [96, 115, 122]. Estas mutações estão associadas a elevados níveis de resistência, não permitindo

uma avaliação real da contribuição do efluxo, já que a presença de mutação não permite detectar a redução dos valores de CMI por estes compostos [66].

De acordo com a literatura, em *S. aureus*, mutações na região QRDR de *grlA* são o mecanismo primário de resistência a fluoroquinolonas [94, 122-124]. Em consequência, isolados clínicos de *S. aureus* resistentes a fluoroquinolonas com mutações apenas no gene *gyrA* são pouco frequentes. No entanto, isolados com uma única mutação em *grlA*, e que apresentam geralmente suscetibilidade reduzida a fluoroquinolonas, como o isolado BIOS-V39 (Tabela 18), adquirem rapidamente uma segunda mutação em *gyrA*, tornando-se assim isolados com alto nível de resistência [66, 122-125].

A resistência a fluoroquinolonas em *S. pseudintermedius* isolados de animais de companhia, com ou sem doenças dermatológicas subjacentes, é considerável. Em 2016, num estudo realizado por Couto *et al.*, com o intuito de avaliar a percentagem de resistências antimicrobianas em *Staphylococcus* spp., demonstrou uma prevalência de 8,1 a 9,2% de *S. pseudintermedius* com resistência a cada uma das fluoroquinolonas em estudo, incluindo a ciprofloxacina (9,2%). Para além disso, 39% destes *S. pseudintermedius* eram MDR [34]. Este estudo verificou ainda um aumento da prevalência de resistência a diversas classes de antibióticos, incluindo as fluoroquinolonas, ao longo de 16 anos (1999 e 2014) [34]. Vários estudos em *S. aureus* sugerem que as fluoroquinolonas têm exercido pressão seletiva para a disseminação de linhagens clonais com fenótipos de multirresistência [66, 124, 125]. De forma similar, a resistência às fluoroquinolonas poderá apresentar o potencial de promover o aparecimento e disseminação de linhagens multirresistentes em *S. pseudintermedius*, como a linhagem clonal ST71 [34, 126].

Da coleção inicial de 157 *S. pseudintermedius*, 24,2% (n=38) tinha um fenótipo de resistência a pelo menos uma das fluoroquinolonas estudadas (CIP, ENR, MOX e/ou PRA) [112]. Desta forma, foi feita a pesquisa de mutações nos genes alvo, *grlA* e *gyrA*. Esta pesquisa foi realizada em 42 dos 52 isolados em estudo (20 isolados resistentes à CIP, um isolado com resistência intermédia à CIP e 21 isolados suscetíveis à CIP) e na estirpe referência *S. pseudintermedius* DSM21284^T, como representado na Figura 13.

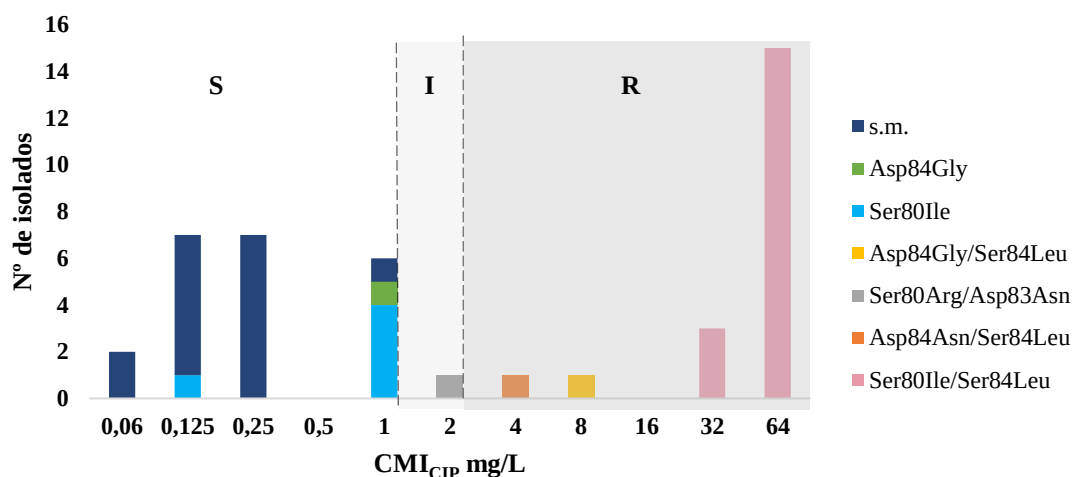


Figura 13 Gráfico representativo das mutações encontradas na região QRDR de GrlA e GyrA dos *S. pseudintermedius* em estudo e sua relação com valores de CMI_{CIP}. Mutações em GrlA: Ser80Ile, Asp84Asn; Ser80Arg, Asp84Gly; Mutações em GyrA: Ser84Leu, Asp83Asn. **Ser**: serina; **Leu**: leucina; **Asp**: ácido aspártico; **Asn**: asparagina; **Ile**: isoleucina; **Gly**: glicina; **Arg**: arginina; **s.m.**: nenhuma mutação identificada nas regiões QRDR de GrlA ou GyrA.

Através da análise do perfil de mutações da região QRDR de GrlA e GyrA e do valor de CMI_{CIP}, verifica-se que nos isolados para os quais não foi detetada nenhuma mutação, a CMI_{CIP} variou entre 0,06-1 mg/L; nos isolados que apresentam apenas mutação na região QRDR de GrlA, a CMI_{CIP} variou entre 0,125-1 mg/L; nos isolados que apresentaram uma mutação em cada gene (Ser80Ile/Ser84Leu) a CMI_{CIP} variou entre 32-64 mg/L e; nos restantes isolados, onde se detetaram mutações na região QRDR de GrlA e GyrA diferentes da anterior (Asp84Asn/Ser84Ile, Ser80Arg/Asp83Asn e Ser84Leu/Asp84Gly), a CMI_{CIP} variou entre 2-8 mg/L.

De acordo com o já descrito na literatura para *S. pseudintermedius*, isolados que apresentem mutações em *gyrA* e *grlA* estão associados a um fenótipo de resistência a fluoroquinolonas [96, 122, 125]. No presente estudo, os isolados apenas com uma mutação em GrlA, não apresentam resistência fenotípica à CIP. Não obstante, e de acordo com o já descrito por Kizerwetter-Świda em 2016, que correlaciona valores de CMI para a pradofloxacina com mutações na região QRDR de GryA e GrlA [124], isolados com CMIs entre 0,03 e 2 mg/L apresentaram uma única mutação em GrlA (Ser80Ile) ou mutação em GrlA Ser80Ile e GyrA Ser84Leu.

Todas as mutações na região QRDR encontradas neste trabalho já tinham sido anteriormente descritas para *S. pseudintermedius* [96, 122, 125], exceto a mutação na

região QRDR de GyrA na posição 83 correspondendo à substituição de ácido aspártico por asparagina (Asp83Asn). Esta mutação, que já tinha sido identificada em *S. aureus* [127], é identificada pela primeira vez neste trabalho em *S. pseudintermedius*.

A pesquisa de mutações nas regiões QRDR de GrlA e GyrA permitiu concluir que estas seriam a principal causa da resistência a fluoroquinolonas na coleção de *S. pseudintermedius* estudada. No entanto, não foi possível excluir a contribuição do efluxo para estes fenótipos de resistência, visto que os resultados obtidos para o EtBr, revelaram mecanismos de efluxo ativos em todos os isolados, potencialmente associados a sistemas de efluxo cromossômicos, os quais, por sua vez, estarão também implicados no efluxo de fluoroquinolonas. Verificou-se a possibilidade de vários mecanismos contribuírem para resistências de alto nível a fluoroquinolonas, tais como, mecanismos de efluxo sobre-expressos e mutações na região QRDR de GrlA e GyrA. Deste modo, torna-se essencial a correta utilização de antibióticos na terapêutica de infecções por *S. pseudintermedius*, já que é um fator decisivo no controlo da emergência e disseminação de resistências.

Apesar da infecção por *S. pseudintermedius* no humano não ser muito frequente, na última década verificou-se um aumento dos casos reportados, geralmente associados à resistência a antibióticos [48-56]. Como exemplo, têm sido descritos casos de infecção humana por *S. pseudintermedius* multirresistentes a antibióticos da linhagem clonal ST71 [34, 126]. Desta forma, torna-se imperativo acompanhar a evolução dos padrões de resistência para prevenir futuras complicações na sua transmissão para humanos. Esta preocupação justifica-se, tendo em conta o verificado para *S. aureus*, em particular para a linhagem clonal ST22 MRSA, capaz de colonizar e/ou provocar infecção tanto em humanos como em animais de companhia [34, 57, 79].

Ainda não se conhece ao certo o impacto que infecções por *S. pseudintermedius* têm na saúde pública. Assim, este trabalho foi desenvolvido com o intuito de avaliar a relevância do efluxo como potencial mecanismo da resistência a fluoroquinolonas, informação que poderá ser depois alargada a outros compostos antimicrobianos efluxáveis como os biocidas, utilizando o EtBr como marcador de atividade de efluxo. A procura por novas alternativas ao tratamento de infecções bacterianas tem sido desafiante, pelo que, alternativas a antibióticos no caso de infecções causadas por *S. pseudintermedius* devem ser investigadas, em particular MRSP, que se encontram muitas vezes associadas a fenótipos MDR.

O tratamento de infecções de *S. pseudintermedius* em animais de companhia, sobretudo cães, passa por uma combinação entre a terapia tópica e sistêmica. No entanto, devido ao aumento de estirpes multirresistentes, a terapia antibiótica torna-se cada vez mais limitada. Apesar da maioria das infecções não requerer a utilização de terapias sistêmicas, existem casos graves que podem ser fatais se não existirem antimicrobianos eficazes aprovados e disponíveis [23].

Contudo, como a gama de antibióticos de primeira linha disponíveis para o tratamento de infecções por *S. pseudintermedius* é reduzida, a utilização de antibióticos de segunda linha é frequente, nomeadamente antibióticos da classe das fluoroquinolonas. A sua utilização torna-se problemática porque o aparecimento de mutações em genes alvo compromete a eficácia terapêutica e leva a uma resistência a toda esta classe de antibióticos.

Desta forma, torna-se essencial uma correta identificação laboratorial do microrganismo e teste de suscetibilidade aos antibióticos antes do início da terapia, uma vez que permitirá dirigi-la para um tratamento eficaz. A aplicação de antibioterapia empírica em clínica, pode resultar no aparecimento de estirpes resistentes, na medicina humana e veterinária.

Concluindo, este estudo confirma a presença de atividade de efluxo em *S. pseudintermedius* sendo, no entanto, necessários mais estudos que possibilitem a sua caracterização. A presença deste mecanismo em *S. pseudintermedius*, sugere o possível desenvolvimento de resistências, potenciado pela utilização inadequada e excessiva de antibióticos e outros compostos efluxáveis como já demonstrado noutros estafilococos, nomeadamente *S. aureus* e *S. epidermidis*.

Sendo este um primeiro trabalho na área, que explora os mecanismos de efluxo em *S. pseudintermedius*, abre portas e perspectivas para trabalhos futuros na caracterização do efluxo desta espécie, tais como o estudo do papel desempenhado pela bomba de efluxo cromossômica NorA na atividade detetada, ou a relevância desta atividade na suscetibilidade a biocidas ou outros substratos efluxáveis.

O valor de *cut-off* para o EtBr calculado neste trabalho, 8 mg/L, poderá ser revisto e complementado com o estudo de coleções mais alargadas de *S. pseudintermedius*, que incluam estirpes com outras características, nomeadamente, contendo os genes *qacA/B*, o que permitirá uma determinação mais consolidada do valor de *cut-off*.

Estudou-se ainda a relação do efluxo na resistência a FQ, no entanto, e apesar de se terem detetado mecanismos de efluxo ativos, os resultados sugerem que este não é o principal mecanismo responsável pela resistência à CIP. Verificou-se que a elevada prevalência de mutações nos genes alvo *griA* e *gyrA* não permite a real caracterização do efluxo, ficando claro que as mutações nestes genes são o principal mecanismo associado à resistência na coleção em estudo. Neste trabalho foi ainda identificada uma nova mutação em GyrA Asp83Asn.

O trabalho desenvolvido nesta Dissertação, evidencia a dimensão da resistência a antimicrobianos em *S. pseudintermedius*. Esta problemática vai de encontro ao conceito Uma Só Saúde já que interliga a saúde humana e animal focando a relevância de *S. pseudintermedius* como agente de infeções em animais de companhia com o potencial de transmissão para o Humano.

5. Referências Bibliográficas

1. Murray, P., Tenenbaum, K. & Tenenbaum, M. (2012). Medical Microbiology. Seventh Edition. Elsevier, Amsterdam, Países Baixos.
2. Parte, A. C., Sardà Carbasse, J., Meier-Kolthoff, J. P., Reimer, L. C. & Göker, M. (2020). List of Prokaryotic names with Standing in Nomenclature (LPSN) moves to the DSMZ. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, **70**: 5607-5612.
3. Jorgensen, J. H. & Ferraro, M. J. (2009). Antimicrobial susceptibility testing: a review of general principles and contemporary practices. Clinical Infectious Diseases, **49**(11): 1749–1755.
4. Sykes, J. E. *Staphylococcus* Infections - Canine and Feline Infectious Diseases 1st ed. California: Elsevier, 2013. p. 347–354.
5. Tong, S. Y. C., Davis, J. S., Eichenberger, E., Holland, T. L. & Fowler, V. G. (2015). *Staphylococcus aureus* Infections: Epidemiology, Pathophysiology, Clinical Manifestations, and Management. Clinical Microbiology Reviews, **28**(3): 603–661.
6. Becker, K., Heilmann, C., & Peters, G. (2014). Coagulase-Negative *Staphylococci*. Clinical Microbiology Reviews, **27**(4): 870–926.
7. Hillier, A., Lloyd, D., Weese, J., Blondeau, J., Boothe, D., Breitschwerdt, E., Guardabassi, L., Papich, M., Rankin, S., Turnidge, J., & Sykes, J. (2014). 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, **25**(3): 163-e43.
8. Ruzauskas, M., Couto, N., Pavilonis, A., Klimiene, I., Siugzdiniene, R., Virgailis, M. & Pomba, C. (2016). Characterization of *Staphylococcus pseudintermedius* isolated from diseased dogs in Lithuania. Polish Journal of Veterinary Sciences, **19**(1): 7–14.
9. Griffeth, G. C., Morris, D. O., Abraham, J. L., Shofer, F. S., & Rankin, S. C. (2008). Screening for skin carriage of methicillin-resistant coagulase-positive staphylococci and *Staphylococcus schleiferi* in dogs with healthy and inflamed skin. Veterinary Dermatology, **19**: 142-149.

10. Haag, A. F., Fitzgerald, J. R., & Penadés, J. R. (2019). *Staphylococcus aureus* in Animals. *Microbiology Spectrum*, **7**(3): GPP3-0060.
11. González-Martín, M., Alberto Corbera, J., Suárez-Bonnet, A., & Tejedor-Junco, M. T. (2020). Virulence factors in coagulase-positive staphylococci of veterinary interest other than *Staphylococcus aureus*. *Veterinary Quarterly*, **40**(1): 118–131.
12. Murray, A., Lee, J. & Bendall, R. (2018). *Staphylococcus cornubiensis* sp. nov., a member of the *Staphylococcus intermedius* Group (SIG). *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, **68**(11): 3404-3408.
13. Perreten, V, A., Kania, S., & Bemis, D. (2020) *Staphylococcus ursi* sp. nov., a new member of the *Staphylococcus intermedius* group isolated from healthy black bears, *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, **70**: 4637–4645.
14. Hajek, V. (1976). *Staphylococcus intermedius*, a New Species Isolated from Animals. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, **26**(4): 401-408.
15. Bannoehr, J. & Guardabassi, L. (2012). *Staphylococcus pseudintermedius* in the dog: taxonomy, diagnostics, ecology, epidemiology and pathogenicity. *Veterinary Dermatology*, **23**(4): 253-66, e51-2.
16. Bond, R. & Loeffler, A. (2012). What's happened to *Staphylococcus intermedius*? Taxonomic revision and emergence of multi-drug resistance. *Journal of Small Animal Practice*, **53**(3): 147– 154.
17. Devriese, L. A., Hermans, K., Baele, M., & Haesebrouck, F. (2009). *Staphylococcus pseudintermedius* versus *Staphylococcus intermedius*. *Veterinary Microbiology*, **133**(1-2): 206–207.
18. Lee J., Murray, A., Bendall, R., Gaze, W., Zhang, L. & Vos, M. (2015). Improved detection of *Staphylococcus intermedius* group in a routine diagnostic laboratory. *Journal of Clinical Microbiology*, **53**:961–963.
19. Devriese, L. A., Vancanneyt, M., Baele, M., Vaneechoutte, M., De Graef, E., Snauwaert, C., Cleenwerck, I., Dawyndt, P., Swings, J. & Decostere, A. (2005) *Staphylococcus pseudintermedius* sp. nov., a coagulase-positive species from animals. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, **55**: 1569-1573.

20. Morris, D., Rook, K., Shofer, F. & Rankin, S. (2006). Screening of *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus intermedius*, and *Staphylococcus schleiferi* isolates obtained from small companion animals for antimicrobial resistance: a retrospective review of 749 isolates (2003–04). *Veterinary Dermatology*, **17**: 332–337.
21. González-Domínguez, M. S., Carvajal, H. D., Calle-Echeverri, D. A., & Chinchilla-Cárdenas, D. (2020). Molecular detection and characterization of the *mecA* and *nuc* genes from *Staphylococcus* species (*S. aureus*, *S. pseudintermedius*, and *S. schleiferi*) isolated from dogs suffering superficial pyoderma and their antimicrobial resistance profiles. *Frontiers in Veterinary Science*, **7**: 376.
22. Verstappen, K. M., Huijbregts, L., Spaninks, M., Wagenaar, J. A., Fluit, A. C., & Duim, B. (2017). Development of a real-time PCR for detection of *Staphylococcus pseudintermedius* using a novel automated comparison of whole-genome sequences. *PloS one*, **12**(8): e0183925.
23. Van Duijkeren, E., Catry, B., Greko, C., Moreno, M. A., Pomba, M. C. & Pyorala, S. (2011). Review on methicillin-resistant *Staphylococcus pseudintermedius*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, **66**(12): 2705–2714.
24. Gortel, K. (2013). Recognizing pyoderma: more difficult than it may seem. *Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice*, **43**(1): 1-18.
25. Chrobak-Chmiel, D., Golke, A., Dembele, K., Ćwiek, K., Kizerwetter-Świda, M., Rzewuska, M. & Binek, M. (2018). *Staphylococcus pseudintermedius*, both comensal and pathogen. *Medycyna weterynaryjna* **74**(1): 6042-2018.
26. Simou, C., Thoday, K. L., Forsythe, P. J., & Hill, P. B. (2005). Adherence of *Staphylococcus intermedius* to corneocytes of healthy and atopic dogs: effect of pyoderma, pruritus score, treatment, and gender. *Veterinary Dermatology*, **16**(6): 385–391.
27. McEwan, N.A., Mellor, D., & Kalna, G. (2006). Adherence by *Staphylococcus intermedius* to canine corneocytes: A preliminary study comparing noninflamed and inflamed atopic canine skin. *Veterinary Dermatology*, **17**(2): 151–154.
28. Loeffler, A., Linek, M., Moodley, A., Guardabassi, L., Sung, J. M. L., Winkler, M., Weiss, R. & Lloyd, D. H. (2007). First report of multiresistant, *mecA*-positive

- Staphylococcus intermedius* in Europe: 12 cases from a veterinary dermatology referral clinic in Germany. *Veterinary Dermatology*, **18**(6): 412–421.
29. Haenni, M., Garch, Farid., Miossec, C., Madec, J. Y., Hocquet, D. & Valot, B. (2020). High genetic diversity among methicillin-susceptible *Staphylococcus pseudintermedius* in dogs in Europe. *Journal of Global Antimicrobial Resistance*, **21**: 57-59.
30. Kawakami, T., Shibata, S., Murayama, N., Nagata, M., Nishifuji, K., Iwasaki, T. & Fukata, T. (2010). Antimicrobial susceptibility and methicillin resistance in *Staphylococcus pseudintermedius* and *Staphylococcus schleiferi* subsp. *coagulans* isolated from dogs with pyoderma in Japan. *Journal of Veterinary Medical Science - J-Stage*, **72**: 1615–1619.
31. Iyori, K., Shishikura, T., Shimoike, K., Minoshima, K., Imanishi, I. & Toyoda, Y. (2021). Influence of hospital size on antimicrobial resistance and advantages of restricting antimicrobial use based on cumulative antibiograms in dogs with *Staphylococcus pseudintermedius* infections in Japan. *Veterinary Dermatology* 10.1111/vde.12975 (Publicado online).
32. Weese, J. S., & van Duijkeren, E. (2010). Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus pseudintermedius* in veterinary medicine. *Veterinary Microbiology*, **140**(3-4): 418–429.
33. Shoen, H. R. C., Rose, S. J., Ramsey, S. A., de Moraes, H., & Bermudez, L. E. (2019). Analysis of *Staphylococcus* infections in a veterinary teaching hospital from 2012 to 2015. *Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases*, **66**: 101332.
34. Couto, N., Monchique, C., Belas, A., Marques, C., Gama, L. T., & Pomba, C. (2016). Trends and molecular mechanisms of antimicrobial resistance in clinical staphylococci isolated from companion animals over a 16-year period. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, **71**(6): 1479–1487.
35. Silva, V., Oliveira, A., Manageiro, V., Caniça, M., Contente, D., Capita, R., Alonso-Calleja, C., Carvalho, I., Capelo, J. L., Igrejas, G. & Poeta, P. (2021). Clonal Diversity and Antimicrobial Resistance of Methicillin-Resistant *Staphylococcus pseudintermedius* Isolated from Canine Pyoderma. *Microorganisms*, **9**(3): 482.

36. Peacock, S. J. & Paterson, G. K. Mechanisms of methicillin-resistance in *Staphylococcus aureus*. (2015). Annual Reviews of Biochemistry, **84**: 577–601.
37. Pinho, M. G., de Lencastre, H., & Tomasz, A. (2001). An acquired and a native penicillin-binding protein cooperate in building the cell wall of drug-resistant staphylococci. Proceedings of the National Academy of Sciences, **98**(19): 10886–10891.
38. Tenover, F. C. (2006). Mechanisms of Antimicrobial Resistance in Bacteria. The American Journal of Medicine, **119**(6): S3–S10.
39. Sweeney, M. T., Lubbers, B. V., Schwarz, S., & Watts, J. L. (2018). Applying definitions for multidrug resistance, extensive drug resistance and pandrug resistance to clinically significant livestock and companion animal bacterial pathogens. Journal of Antimicrobial Chemotherapy, **73**(6): 1460-1463.
40. European Centre for Disease Prevention and Control. (2020). Antimicrobial resistance in the EU/EEA (EARS-Net) - Annual Epidemiological Report 2019. Estocolmo.
41. Antibiotic Use Guidelines for Companion Animal Practice, 2nd edition Publisher: Companion Animal Group, Danish Veterinary Association, Peter Bangs Vej 30, 2012.
42. Pallo-Zimmerman L. M., Byron J. K. & Graves T. K. (2010). Fluoroquinolonas: Then and now. Compendium: Continuing Education for Veterinarians, **32**: E1-E8.
43. Pedersen, K., Pedersen, K., Jensen, H., Finster, K., Jensen, V. F. & Heuer, O. E. (2007). Occurrence of antimicrobial resistance in bacteria from diagnostic samples from dogs. Journal of Antimicrobial Chemotherapy, **60**: 775-781.
44. Centers for Disease Control and Prevention. One Health Basis. (2016). Clifton Road Atlanta, GA, USA. (<https://www.cdc.gov/onehealth/basics/index.html> acessado a setembro de 2021).
45. Tanner, M. A., Everett, C. L., & Youvan, D. C. (2000). Molecular phylogenetic evidence for noninvasive zoonotic transmission of *Staphylococcus intermedius* from a canine pet to a human. Journal of Clinical Microbiology, **38**(4): 1628–1631.

46. Van Hoovels, L., Vankeerberghen, A., Boel, A., Van Vaerenbergh, K., & De Beenhouwer, H. (2006). First Case of *Staphylococcus pseudintermedius* Infection in a Human. *Journal of Clinical Microbiology*, **44**(12): 4609–4612.
47. Chuang, C. Y., Yang, Y. L., Hsueh, P. R., & Lee, P. I. (2010). Catheter-Related Bacteremia Caused by *Staphylococcus pseudintermedius* Refractory to Antibiotic-Lock Therapy in a Hemophilic Child with Dog Exposure. *Journal of Clinical Microbiology*, **48**(4): 1497–1498.
48. Nomoto, H., Kutsuna, S., Nakamura, K., Nakamoto, T., Shimomura, A., Hirakawa, T., Kinoshita, N., Hayakawa, K., Nagashima, M., & Ohmagaria, N. (2020). Totally implantable venous access port infection caused by *Staphylococcus pseudintermedius*: Possible transmission from a companion dog to a human. *Journal of Infection and Chemotherapy*, **26**(12): 1305-1308.
49. Somayaji, R., Priyantha, M. A. R., Rubin, J. E., & Church, D. (2016). Human infections due to *Staphylococcus pseudintermedius*, an emerging zoonosis of canine origin: report of 24 cases. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, **85**(4): 471–476.
50. Stegmann, R., Burnens, A., Maranta, C. A., & Perreten, V. (2010). Human infection associated with methicillin-resistant *Staphylococcus pseudintermedius* ST71. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, **65**(9): 2047–2048.
51. Kempker, R., Mangalat, D. & Kongphet-Tran, T. (2009). Beware of the pet dog: a case of *Staphylococcus intermedius* infection. *Journal of Veterinary Medical Science - J-Stage*, **338**: 425 –7.
52. Savini, V., Barbarini, D., Polakowska, K., Gherardi, G., Bialecka, A., Kasproicz, A., Polilli, E., Marrollo, R., Di Bonaventura, G., Fazii, P., D’Antonio, D., Miedzobrodzki, J. & Carretto, E. (2013). Methicillin-Resistant *Staphylococcus pseudintermedius* Infection in a Bone Marrow Transplant Recipient. *Journal of Clinical Microbiology*, **51**(5): 1636–1638.
53. Gaggi, P., Errecalde, L., Wattam, A. R., De Belder, D., Ojeda Saavedra, M., Corso, A., & Rosato, A. E. (2020). Characterization of the First *mecA*-Positive Multidrug-Resistant *Staphylococcus pseudintermedius* Isolated from an Argentinian Patient. *Microbial Drug Resistance*, **26**(7): 717-721.

54. Riegel, P., Jesel-Morel, L., Laventie, B., Boisset, S., Vandenesch, F., & Prévost, G. (2011). Coagulase-positive *Staphylococcus pseudintermedius* from animals causing human endocarditis. *International Journal of Medical Microbiology*, **301**(3): 237–239.
55. Lozano, C., Rezusta, A., Ferrer, I., Pérez-Laguna, V., Zarazaga, M., Ruiz-Ripa, L., Revillo, M. J. & Torres, C. (2017). *Staphylococcus pseudintermedius* Human Infection Cases in Spain: Dog-to-Human Transmission. *Vector-Borne and Zoonotic Diseases*, **17**(4): 268–270.
56. Boost, M. V., So, S. Y. C., & Perreten, V. (2011). Low Rate of Methicillin-resistant Coagulase-positive Staphylococcal Colonization of Veterinary Personnel in Hong Kong. *Zoonoses and Public Health*, **58**(1): 36–40.
57. Pomba, C., Rantala, M., Greko, C., Baptiste, K. E., Catry, B., van Duijkeren, E., Mateus, A., Moreno, M. A., Pyorala, S., Ruzauskas, M., Sanders, P., Teale, C., Threlfall, E., J., Kunsagi, Z., Torren-Edo, J., Jukes, H. & Törneke, K. (2017). Public health risk of antimicrobial resistance transfer from companion animals. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, **72**: 957-968.
58. Lam, P. L., Lee, K. K. H., Wong, R. S. M., Cheng, G. Y. M., Bian, Z. X., Chui, C. H., & Gambari, R. (2017). Recent advances on topical antimicrobials for skin and soft tissue infections and their safety concerns. *Critical Reviews in Microbiology*, **44**(1): 40–78.
59. World Health Organization. (2015). Global action plan on antimicrobial resistance. World Health Organization (<https://apps.who.int/iris/handle/10665/193736>, acedido em setembro de 2021).
60. Critically important antimicrobials for human medicine, 6th revision. (2019). Geneva: World Health Organization, Licence: CC BY-NC-SA 3.0 IGO.
61. OIE -List of Antimicrobial Agents of Veterinary Importance. (2018). (https://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Our_scientific_expertise/docs/pdf/AMR/A_OIE_List_antimicrobials_May2018.pdf, acedido em setembro de 2021).
62. European Medicines Agency. “Categorisation of antibiotics used in animals promotes responsible use to protect public and animal health”. (2020). (<https://www.ema.europa.eu/en/documents/report/infographic-categorisation->

- [antibiotics-use-animals-prudent-responsible-use_en.pdf](#) , acedido em setembro 2021).
63. Costa, S., Viveiros, M., Amaral, L. & Couto, I. (2013). Multidrug Efflux Pumps in *Staphylococcus aureus*: an Update. *Open Microbiology Journal*, **7**: 59–71.
64. Williamson, D., Carter, G. & Howden, B. (2017). Current and Emerging Topical Antibacterials and Antiseptics: Agents, Action, and Resistance Patterns. *Clinical Microbiology Reviews*, **30**(3): 827-860.
65. Blair, J. M. A., Webber, M. A., Baylay, A. J., Ogbolu, D. O., & Piddock, L. J. V. (2014). Molecular mechanisms of antibiotic resistance. *Nature Reviews Microbiology*, **13**(1): 42–51.
66. Costa, S. S. Efflux pump activity in drug resistance of *Staphylococcus aureus* [PhD Tesis]. (2013). Universidade Nova de Lisboa – Instituto de Higiene e Medicina Tropical.
67. Ciusa, M. L., Furi, L., Knight, D., Decorosi, F., Fondi, M., Raggi, C., Coelho, J. R., Aragonés, L., Moce, L., Visa, P., Freitas, A. T., Baldassarri, L., Fani, R., Viti, C., Orefici, G., Martinez, J. L., Morrissey, I. & Oggioni, M. R. (2012). A novel resistance mechanism to triclosan that suggests horizontal gene transfer and demonstrates a potential selective pressure for reduced biocide susceptibility in clinical strains of *Staphylococcus aureus*. *International Journal of Antimicrobial Agents*, **40**(3): 210–220.
68. Maillard, J. Y. (2018). Resistance of Bacteria to Biocides. *Microbiology Spectrum*, **6**(2): ARBA-0006-2017.
69. Vijayakumar, R., & Sandle, T. (2018). A review on biocides reduced susceptibility due to plasmid-borne antiseptic resistant genes - Special notes on pharmaceutical environmental isolates. *Journal of Applied Microbiology*, **126**: 1011-1022.
70. Piddock, L. J. V. (2006). Clinically Relevant Chromosomally Encoded Multidrug Resistance Efflux Pumps in Bacteria. *Clinical Microbiology Reviews*, **19**(2): 382–402.

71. P. Tegos, G., Haynes, M., Jacob Strouse, J., Md. T. Khan, M., G. Bologa, C., I. Oprea, T., & A. Sklar, L. (2011). Microbial Efflux Pump Inhibition: Tactics and Strategies. *Current Pharmaceutical Design*, **17**(13): 1291–1302.
72. Couto, I., Costa, S. S., Viveiros, M., Martins, M. & Amaral, L. (2008). Efflux-mediated response of *Staphylococcus aureus* exposed to ethidium bromide. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, **62**: 504-13.
73. Costa, S. S, Viveiros, M., Pomba, C., Couto, I. Active antimicrobial efflux in *Staphylococcus epidermidis*: building up of resistance in a major opportunistic pathogen. *J Antimicrob Chemother*, **73**:320-4.
74. Walker, M. A., Singh, A., Gibson, T. W., Rousseau, J., & Weese, J. S. (2020). Presence of Qac genes in clinical isolates of methicillin-resistant and methicillin-susceptible *Staphylococcus pseudintermedius* and their impact on chlorhexidine digluconate susceptibility. *Veterinary Surgery*, **9**(5): 971-976.
75. Worthing, K. A., Marcus, A., Abraham, S., Trott, D. J., & Norris, J. M. (2018). Qac genes and biocide tolerance in clinical veterinary methicillin-resistant and methicillin-susceptible *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus pseudintermedius*. *Veterinary Microbiology*, **216**: 153–158.
76. Brown, M., & Skurray, R. (2001). Staphylococcal multidrug efflux protein QacA. *Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology*, **3**(2): 163-170.
77. Aeschlimann, J. R., Linda, D. D., Glenn, W. K., & Michael, J. R. (1999). Effects of NorA Inhibitors on In Vitro Antibacterial Activities and Postantibiotic Effects of Levofloxacin, Ciprofloxacin, and Norfloxacin in Genetically Related Strains of *Staphylococcus aureus*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, **43**(2): 335–340.
78. Grkovic, S., Brown, M. H., & Skurray, R. A. (2002). Regulation of bacterial drug export systems. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, **66**: 671-701.
79. Couto, N., Belas, A., Couto, I., Perreten, V., & Pomba, C. (2014). Genetic Relatedness, Antimicrobial and Biocide Susceptibility Comparative Analysis of Methicillin-Resistant and -Susceptible *Staphylococcus pseudintermedius* from Portugal. *Microbial Drug Resistance*, **20**(4): 364–371.

80. Bay, D. C., Rommens, K. L. & Turner, R. J. (2008). Small multidrug resistance proteins: a multidrug transporter family that continues to grow. *Biochim Biophys*, **1778**(9): 1814-38.
81. Grinius, L. L., & E. B. Goldberg. (1994). Bacterial multidrug resistance is due to a single membrane protein which functions as a drug pump. *Journal of Biological Chemistry*, **269**: 29998-30003.
82. Seier-Petersen, M. A., Nielsen, L. N., Ingmer, H., Aarestrup, F. M. & Agerso, Y. (2015). Biocide susceptibility of *Staphylococcus aureus* CC398 and CC30 isolates from pigs and identification of the biocide resistance genes, *qacG* and *qacC*. *Microbial Drug Resistance*, **21**(5): 527-36.
83. Ubukata, K., Itoh-Yamashita, N., & Konno, M. (1989). Cloning and expression of the *norA* gene for fluoroquinolone resistance in *Staphylococcus aureus*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, **33**: 1535–1539.
84. Yoshida, H., Bogaki, M., Nakamura, S., Ubukata, K., and Konno, M. (1990). Nucleotide sequence and characterization of the *Staphylococcus aureus norA* gene, which confers resistance to quinolones. *Journal of Bacteriology*, **172**: 6942–6949.
85. Neyfakh, A. A., Borsch, C. M., and Kaatz, G. W. (1993). Fluoroquinolone resistance protein NorA of *Staphylococcus aureus* is a multidrug efflux transporter. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, **37**: 128–129.
86. DeMarco, C. E., Cushing, L. A., Frempong-Manso, E., Seo, S. M., Jaravaza, T. A. A., & Kaatz, G. W. (2007). Efflux-Related Resistance to Norfloxacin, Dyes, and Biocides in Bloodstream Isolates of *Staphylococcus aureus*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, **51**(9): 3235-9.
87. Huet, A. A., Raygada, J. L., Mendiratta, K., Seo, S. M., & Kaatz, G. W. (2008). Multidrug efflux pump overexpression in *Staphylococcus aureus* after single and multiple in vitro exposures to biocides and dyes. *Microbiology*, **154**(10): 3144–3153.
88. Kosmidis, C., DeMarco, C. E., Frempong-Manso, E., Seo, S. M., & Kaatz, G. W. (2010). In silico genetic correlations of multidrug efflux pump gene expression in *Staphylococcus aureus*. *International Journal of Antimicrobial Agents*, **36**(3): 222–229.

89. Costa, S.S., Falcão, C., Viveiros, M., Machado, D., Martins M., Melo-Cristino, J., Amaral, L. & Couto, I. (2011). Exploring the contribution of efflux on the resistance to fluoroquinolones in clinical isolates of *Staphylococcus aureus*. *BMC Microbiology*, **11**: 241.
90. Marchi, E., Furi, L., Arioli, S., Morrissey, I., Di Lorenzo, V., Mora, D., Giovannetti, L., Oggioni, M. R., Viti, C. (2015). Novel insight into antimicrobial resistance and sensitivity phenotypes associated to *qac* and *norA* genotypes in *Staphylococcus aureus*. *Microbiological Research*, **170**: 184–194.
91. Costa, S. S., Viveiros, M., Rosato, A. E., Melo-Cristino, J. & Couto, I. (2015). Impact of efflux in the development of multidrug resistance phenotypes in *Staphylococcus aureus*. *BMC Microbiology*, **15**: 232.
92. Kang, M. -H., Chae, M. -J., Yoon, J. -W., Lee, S. -Y., Yoo, J. -H., Park, H. -M. (2014) Resistance to fluoroquinolones and methicillin in ophthalmic isolates of *Staphylococcus pseudintermedius* from companion animals. *Canadian Veterinary Journal*, **55**(7): 678–682.
93. Hooper, D. C. (1999). Mechanisms of fluoroquinolone resistance. *Drug Resistance Updates*, **2**(1): 38–55.
94. Intorre, L., Vanni, M., Di-Bello, D., Pretti, C., Meucci, V., Tognetti, R., Soldani, G., Cardini, G. & Jousson, O. (2007). Antimicrobial susceptibility and mechanism of resistance to fluoroquinolones in *Staphylococcus intermedius* and *Staphylococcus schleiferi*. *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics*, **30**(5): 464–469.
95. Lapierre, P., Huletsky, A., Fortin, V., Picard, F. J., Roy, P. H., Ouellette, M., & Bergeron, M. G. (2003). Real-Time PCR Assay for Detection of Fluoroquinolone Resistance Associated with *grlA* Mutations in *Staphylococcus aureus*. *Journal of Clinical Microbiology*, **41**(7): 3246–3251.
96. Onuma, K., Tanabe, T., & Sato, H. (2011). Antimicrobial resistance of *Staphylococcus pseudintermedius* isolates from healthy dogs and dogs affected with pyoderma in Japan. *Veterinary Dermatology*, **23**(1), 17–e5.
97. Andrews, J. M. (2002). Determination of minimum inhibitory concentrations. *Journal of Infection and Chemotherapy*, **49**(6): 1049.

98. Patel, D., Kosmidis, C., Seo, S. M., & Kaatz, G. W. (2010). Ethidium Bromide MIC Screening for Enhanced Efflux Pump Gene Expression or Efflux Activity in *Staphylococcus aureus*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, **54**(12): 5070–5073.
99. European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. MIC distributions and epidemiological *cut-off* value (ECOFF) setting, EUCAST SOP 10.1, 2019. <http://www.eucast.org>.
100. Lomovskaya, O., & Watkins, W. (2001). Inhibition of Efflux Pumps as a Novel Approach to Combat Drug Resistance in Bacteria. *Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology*, **3**(2): 225-236.
101. Viveiros, M., Martins, A., Paixão, L., Rodrigues, L., Martins, M., Couto, I., Fahnrich, E., Kern, W. V., & Amaral, L. (2008). Demonstration of intrinsic efflux activity of *Escherichia coli* K-12 AG100 by an automated ethidium bromide method. *International Journal of Antimicrobial Agents*, **31**(5): 458–462.
102. Amaral, L., Martins, M., & Viveiros, M. (2011). Thioridazine: Alternative and Potentially Effective Therapy of the XDR-TB Patient. *Letters in Drug Design & Discovery*, **8**: 2.
103. Kristiansen, M. M., Leandro, C., Ordway, D., Martins, M., Viveiros, M., Pacheco, T., Molnar, J., Kristiansen, J. E. & Amaral, L. (2006). Thioridazine reduces resistance of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* by inhibiting a reserpine-sensitive efflux pump. *In Vivo*, **20**: 361–6.
104. Treangen, T. J., Maybank, R. A., Enke, S., Friss, M. B., Diviak, L. F., Karaolis, D. K. R. & Rosovitz, M. J. (2014). Complete Genome Sequence of the Quality Control Strain *Staphylococcus aureus* subsp. *aureus* ATCC 25923. *Genome Announcements*, **17**: 210.
105. Costa, S. S., Palma, C., Kladec, K., Fessler, A. T., Viveiros, M., Melo-Cristino, J., Schwarz, S. & Couto, I. (2016). Plasmid-borne antimicrobial resistance of *Staphylococcus aureus* isolated in a hospital in Lisbon, Portugal. *Microbial Drug Resistance*, **22**: 617-626.

106. Costa, S. S., Mourato, C., Viveiros, M., Melo-Cristino, J., Amaral, L. & Couto, I. (2013). Description of plasmid pSM52, harbouring the gene for the Smr efflux pump, and its involvement in resistance to biocides in a meticillin-resistant *Staphylococcus aureus* strain. *International Journal of Antimicrobial Agents*, **41**: 488–498.
107. Anthonisen, I.-L., Sunde, M., Steinum, T. M., Sidhu, M. S., & Sorum, H. (2002). Organization of the Antiseptic Resistance Gene *qacA* and Tn552-Related-Lactamase Genes in Multidrug- Resistant *Staphylococcus haemolyticus* Strains of Animal and Human Origins. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, **46**(11): 3606–3612.
108. Bjorland, J., Sunde, M. & Waage, S. (2001). Plasmid-Borne *smr* gene Causes Resistance to Quaternary Ammonium Compounds in Bovine *Staphylococcus aureus*. *Journal of Clinical Microbiology*, **39**(11): 3999-4004.
109. Clinical and Laboratory Standards Institute. M100 Performance Standards for Antimicrobial Suscetibility Testing. 30ª Edição. Wayne, PA.
110. Turnidge, J., Kahlmeter, G. & Kronvall, G. (2006). Statistical characterisation of bacterial *wild-type* MIC value distributions and the determination of epidemiological *cut-off values*. *Clinical Microbiology and Infection*, **12**: 418-25.
111. Alexopoulou, K., Foka, A., Petinaki, E., Jelastopulu, E., Dimitracopoulos, G. & Spiliopoulou, I. (2006). Comparison of two commercial methods with PCR restriction fragment length polymorphism of the *tuf* gene in the identification of coagulase-negative staphylococci. *Letters in Applied Microbiology*, **43**: 450-454.
112. Morais, C., Costa, S. S., Abrantes, P., Pomba, M. & Couto, I. (2020). Antibiotic resistance in *Staphylococcus pseudintermedius* associated with skin and soft tissue infections in dogs and cats. 30th ECCMID. Paris, França.
113. Costa, S. S., Viveiros, M., Pomba, C., & Couto, I. (2018). Active antimicrobial efflux in *Staphylococcus epidermidis*: building up of resistance to fluoroquinolones and biocides in a major opportunistic pathogen. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, **73**(2): 320–324.
114. Rosa, M., Costa, S. S., Viveiros, M., Pomba, C. & Couto, I. (2017). Contribuição do efluxo para a resistência a compostos antimicrobianos em *Staphylococcus*

epidermidis. Poster session presented at 4th National Congress of Tropical Medicine, Lisbon, Portugal.

115. Ferreira, C. (2020). A resistência a biocidas e antibióticos tópicos em *Staphylococcus aureus* de origem humana. [Master Thesis]. Universidade Nova de Lisboa – Instituto de Higiene e Medicina Tropical.
116. Nobuo, M. (2013) In vitro antiseptic susceptibilities for *Staphylococcus pseudintermedius* isolated from canine superficial pyoderma in Japan. *Veterinary Dermatology*, **24**(1): 126-9.
117. Costa, S. S., Viveiros, M., Pomba, C., & Couto, I. (2017). Active antimicrobial efflux in *Staphylococcus epidermidis*: building up of resistance to fluoroquinolones and biocides in a major opportunistic pathogen. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, **73**(2): 320–324.
118. European Medicines Agency, European Surveillance of Veterinary Antimicrobial Consumption, 2020. Sales of veterinary antimicrobial agents in 31 European countries in 2018. (EMA/24309/2020).
119. Oliveira, A., Devesa, J., Hill, P., Silva, V. & Poeta, P. Treatment of selected canine dermatological conditions in Portugal - a research survey. (2018). *Journal of Veterinary Research*, **62**: 563-570.
120. The European Agency for the Evaluation of Medicinal Products. Committee for Veterinary Medicinal Products – Enrofloxacin, 1998.
121. Hawkins, E. C., Boothe, D. M., Guinn, A., Aucoin, D. P., & Ngyuen, J. (1998). Concentration of enrofloxacin and its active metabolite in alveolar macrophages and pulmonary epithelial lining fluid of dogs. *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics*, **21**(1): 18–23.
122. Gebru Awji, E., Tassew, D. D., Lee, J.-S., Lee, S.-J., Choi, M.-J., Reza, M. A & Park, S.-C. (2012). Comparative mutant prevention concentration and mechanism of resistance to veterinary fluoroquinolones in *Staphylococcus pseudintermedius*. *Veterinary Dermatology*, **23**(4): 376-80, e68-9.

123. Papkou, A., Hedge, J., Kapel, N., Young, B. & MacLean, R. C. (2020) Efflux pump activity potentiates the evolution of antibiotic resistance across *S. aureus* isolates. *Nature Communications*, **11**: 3970.
124. Kizerwetter-Świda, M., Chrobak-Chmiel, D., Rzewuska, M., & Binek, M. (2016). Resistance of canine methicillin-resistant *Staphylococcus pseudintermedius* strains to pradofloxacin. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, **28**(5): 514–518.
125. Descloux, S., Rossano, A., & Perreten, V. (2008). Characterization of New Staphylococcal Cassette Chromosome mec (SCCmec) and Topoisomerase Genes in Fluoroquinolone and Methicillin-Resistant *Staphylococcus pseudintermedius*. *Journal of Clinical Microbiology*, **46**(5): 1818-23.
126. Savini, V., Carretto, E., Polilli, E., Marrollo, R., Santarone, S., Fazii, P., D'Antonio, D., Rossano, A., & Perreten, V. (2014). Small colony variant of methicillin-resistant *Staphylococcus pseudintermedius* ST71 presenting as a sticky phenotype. *Journal of clinical microbiology*, **52**(4): 1225–1227.
127. Mitton-Fry, M. J., Brickner, S. J., Hamel, J. C., Brennan, L., Casavant, J. M., Chen, M., Chen, T., Ding, X., Driscoll, J., Hardink, J., Hoang, T., Hua, E., Huband, D. M., Maloney, M., Marfat, A., McCurdy, P. S., McLeod, D., Plotkin, M., Reilly, U., Robinson, S., Schafer, J., Shepard, M. R., Smith, F. J., Stone, G. G., Subramanyam, C., Yoon, K., Yuan, W., Zaniewski, P. R., Zook, C. (2013). Novel quinoline derivatives as inhibitors of bacterial DNA gyrase and topoisomerase IV. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, **23**(10): 2955–296.

ANEXOS

Tabela A1. Características da coleção de *S. pseudintermedius* estudada nesta Dissertação.

BIOS	Origem^a	Ano	Hospedeiro^b
V28	Faculdade de Medicina Veterinária - UL	2018	Cão
V15	Faculdade de Medicina Veterinária - UL	2018	Cão
V39	Faculdade de Medicina Veterinária - UL	2016	Cão
V12	Faculdade de Medicina Veterinária - UL	2018	Cão (5)
V38	Faculdade de Medicina Veterinária - UL	2018	Cão
V13	Faculdade de Medicina Veterinária - UL	2018	Cão
V29	Faculdade de Medicina Veterinária - UL	2018	Cão
V33	Faculdade de Medicina Veterinária - UL	2018	Cão (2)
V64	Faculdade de Medicina Veterinária - UL	2018	Cão
V10	Faculdade de Medicina Veterinária - UL	2018	Cão
V27	Faculdade de Medicina Veterinária - UL	2018	Cão
V34	Faculdade de Medicina Veterinária - UL	2018	Cão (2)
V36	Faculdade de Medicina Veterinária - UL	2017	Cão
V26	Faculdade de Medicina Veterinária - UL	2017	Cão
V40	Faculdade de Medicina Veterinária - UL	2016	Cão
V16	Faculdade de Medicina Veterinária - UL	2018	Cão
V54	Faculdade de Medicina Veterinária - UL	2018	Cão
V65	Faculdade de Medicina Veterinária - UL	2018	Cão
V25	Faculdade de Medicina Veterinária - UL	2016	Cão
V72	Faculdade de Medicina Veterinária - UL	2018	Cão
V14	Faculdade de Medicina Veterinária - UL	2018	Cão
V18	Faculdade de Medicina Veterinária - UL	2018	Cão
V32	Faculdade de Medicina Veterinária - UL	2018	Cão
V37	Faculdade de Medicina Veterinária - UL	2018	Cão (6)
V11	Faculdade de Medicina Veterinária - UL	2018	Cão (2)
V58	Faculdade de Medicina Veterinária - UL	2014	Cão (8)
V56	Faculdade de Medicina Veterinária - UL	2014	Cão
V106	Faculdade de Medicina Veterinária - UL	2017	Cão
V73	Faculdade de Medicina Veterinária - UL	2017	Cão
V101	Faculdade de Medicina Veterinária - UL	2017	Cão
V59	Faculdade de Medicina Veterinária - UL	2017	Cão
V105	Faculdade de Medicina Veterinária - UL	2017	Cão (1)
V97	Faculdade de Medicina Veterinária - UL	2015	Cão
V84	Faculdade de Medicina Veterinária - UL	2015	Cão
V96	Faculdade de Medicina Veterinária - UL	2015	Cão (4)
V110	Faculdade de Medicina Veterinária - UL	2015	Cão
V83	Faculdade de Medicina Veterinária - UL	2015	Cão
V103	Faculdade de Medicina Veterinária - UL	2015	Cão
V71	Faculdade de Medicina Veterinária - UL	2015	Cão
V102	Faculdade de Medicina Veterinária - UL	2015	Cão
V82	Faculdade de Medicina Veterinária - UL	2015	Cão (7)
V53	Faculdade de Medicina Veterinária - UL	2015	Cão (1)
V57	Faculdade de Medicina Veterinária - UL	2015	Cão
V99	Faculdade de Medicina Veterinária - UL	2015	Cão (9)
V104	Faculdade de Medicina Veterinária - UL	2014	Cão
V55	Faculdade de Medicina Veterinária - UL	2014	Cão
V122	Faculdade de Medicina Veterinária - UL	2018	Cão
V138	Faculdade de Medicina Veterinária - UL	2018	Cão
V120	Faculdade de Medicina Veterinária - UL	2017	Cão
V116	Faculdade de Medicina Veterinária - UL	2015	Cão (4)
V114	Faculdade de Medicina Veterinária - UL	2015	Cão

^aUL: Universidade de Lisboa; ^b(n) isolados recolhidos do mesmo animal n.

Tabela A1. (Continuação)

BIOS	Origem^a	Ano	Hospedeiro^b
V113	Faculdade de Medicina Veterinária - UL	2018	Cão
V145	Faculdade de Medicina Veterinária - UL	2018	Cão
V112	Faculdade de Medicina Veterinária - UL	2016	Cão (3)
V117	Faculdade de Medicina Veterinária - UL	2018	Cão
V127	Faculdade de Medicina Veterinária - UL	2016	Cão (4)
V143	Faculdade de Medicina Veterinária - UL	2014	Cão (5)
V121	Faculdade de Medicina Veterinária - UL	2018	Cão
V141	Faculdade de Medicina Veterinária - UL	2015	Cão (3)
V124	Faculdade de Medicina Veterinária - UL	2015	Cão
V125	Faculdade de Medicina Veterinária - UL	2015	Cão
V137	Faculdade de Medicina Veterinária - UL	2014	Cão
V140	Faculdade de Medicina Veterinária - UL	2015	Cão
V133	Faculdade de Medicina Veterinária - UL	2014	Cão
V131	Faculdade de Medicina Veterinária - UL	2014	Cão
V142	Faculdade de Medicina Veterinária - UL	2014	Cão
V135	Faculdade de Medicina Veterinária - UL	2015	Cão
V134	Faculdade de Medicina Veterinária - UL	2014	Cão
V132	Faculdade de Medicina Veterinária - UL	2015	Cão
V146	Faculdade de Medicina Veterinária - UL	2015	Cão
V144	Faculdade de Medicina Veterinária - UL	2014	Cão (5)
V136	Faculdade de Medicina Veterinária - UL	2015	Cão
V123	Faculdade de Medicina Veterinária - UL	2015	Cão
V48	Faculdade de Medicina Veterinária - UL	2014	Cão
V49	Faculdade de Medicina Veterinária - UL	2015	Cão
V50	Faculdade de Medicina Veterinária - UL	2015	Cão (7)
V66	Faculdade de Medicina Veterinária - UL	2015	Cão
V67	Faculdade de Medicina Veterinária - UL	2018	Cão
V68	Faculdade de Medicina Veterinária - UL	2015	Cão
V77	Faculdade de Medicina Veterinária - UL	2015	Cão
V78	Faculdade de Medicina Veterinária - UL	2015	Cão
V79	Faculdade de Medicina Veterinária - UL	2015	Cão
V87	Faculdade de Medicina Veterinária - UL	2014	Cão
V88	Faculdade de Medicina Veterinária - UL	2015	Cão (8)
V89	Faculdade de Medicina Veterinária - UL	2015	Cão (9)
V90	Faculdade de Medicina Veterinária - UL	2015	Cão
V108	Faculdade de Medicina Veterinária - UL	2015	Cão
V52	Faculdade de Medicina Veterinária - UL	2017	Cão (6)
V92	Faculdade de Medicina Veterinária - UL	2005	Cão
V7	Faculdade de Medicina Veterinária - UL	2015	Cão
V130	Faculdade de Medicina Veterinária - UL	2003	Cão
V119	Faculdade de Medicina Veterinária - UL	2018	Cão
V260	Laboratório de Diagnóstico Veterinário	2018	Cão
V287	Laboratório de Diagnóstico Veterinário	2018	Cão
V226	Laboratório de Diagnóstico Veterinário	2018	Cão
V290	Laboratório de Diagnóstico Veterinário	2018	Cão
V227	Laboratório de Diagnóstico Veterinário	2018	Cão
V268	Laboratório de Diagnóstico Veterinário	2018	Cão
V230	Laboratório de Diagnóstico Veterinário	2018	Cão
V228	Laboratório de Diagnóstico Veterinário	2018	Cão
V285	Laboratório de Diagnóstico Veterinário	2018	Cão

^aUL: Universidade de Lisboa; ^b(n) isolados recolhidos do mesmo animal n.

Tabela A1. (Continuação)

BIOS	Origem	Ano	Hospedeiro
V264	Laboratório de Diagnóstico Veterinário	2018	Cão
V231	Laboratório de Diagnóstico Veterinário	2018	Cão
V263	Laboratório de Diagnóstico Veterinário	2018	Cão
V286	Laboratório de Diagnóstico Veterinário	2018	Cão
V233	Laboratório de Diagnóstico Veterinário	2018	Cão
V234	Laboratório de Diagnóstico Veterinário	2018	Cão
V259	Laboratório de Diagnóstico Veterinário	2018	Cão
V224	Laboratório de Diagnóstico Veterinário	2018	Cão
V262	Laboratório de Diagnóstico Veterinário	2018	Cão
V225	Laboratório de Diagnóstico Veterinário	2018	Cão
V219	Laboratório de Diagnóstico Veterinário	2018	Cão
V223	Laboratório de Diagnóstico Veterinário	2018	Cão
V292	Laboratório de Diagnóstico Veterinário	2018	Gato
V221	Laboratório de Diagnóstico Veterinário	2018	Cão
V211	Laboratório de Diagnóstico Veterinário	2018	Cão
V217	Laboratório de Diagnóstico Veterinário	2018	Cão
V218	Laboratório de Diagnóstico Veterinário	2018	Cão
V212	Laboratório de Diagnóstico Veterinário	2018	Cão
V270	Laboratório de Diagnóstico Veterinário	2018	Cão
V214	Laboratório de Diagnóstico Veterinário	2018	Cão
V302	Laboratório de Diagnóstico Veterinário	2018	Cão
V297	Laboratório de Diagnóstico Veterinário	2018	Cão
V213	Laboratório de Diagnóstico Veterinário	2018	Cão
V299	Laboratório de Diagnóstico Veterinário	2018	Cão
V244	Laboratório de Diagnóstico Veterinário	2018	Cão
V242	Laboratório de Diagnóstico Veterinário	2018	Cão
V240	Laboratório de Diagnóstico Veterinário	2018	Gato
V241	Laboratório de Diagnóstico Veterinário	2018	Cão
V239	Laboratório de Diagnóstico Veterinário	2018	Cão
V235	Laboratório de Diagnóstico Veterinário	2018	Cão
V236	Laboratório de Diagnóstico Veterinário	2018	Cão
V237	Laboratório de Diagnóstico Veterinário	2018	Cão
V298	Laboratório de Diagnóstico Veterinário	2018	Cão
V238	Laboratório de Diagnóstico Veterinário	2018	Cão
V276	Laboratório de Diagnóstico Veterinário	2018	Cão
V176	Laboratório de Diagnóstico Veterinário	2018	Cão
V273	Laboratório de Diagnóstico Veterinário	2018	Cão
V179	Laboratório de Diagnóstico Veterinário	2018	Cão
V162	Laboratório de Diagnóstico Veterinário	2018	Cão
V247	Laboratório de Diagnóstico Veterinário	2018	Cão
V164	Laboratório de Diagnóstico Veterinário	2018	Cão
V190	Laboratório de Diagnóstico Veterinário	2018	Cão
V167	Laboratório de Diagnóstico Veterinário	2018	Cão
V281	Laboratório de Diagnóstico Veterinário	2018	Cão
V194	Laboratório de Diagnóstico Veterinário	2018	Cão
V280	Laboratório de Diagnóstico Veterinário	2018	Cão
V249	Laboratório de Diagnóstico Veterinário	2018	Cão
V207	Laboratório de Diagnóstico Veterinário	2018	Gato

Tabela A1. (Continuação)

BIOS	Origem	Ano	Hospedeiro
V170	Laboratório de Diagnóstico Veterinário	2018	Cão
V195	Laboratório de Diagnóstico Veterinário	2018	Cão
V196	Laboratório de Diagnóstico Veterinário	2018	Cão
V182	Laboratório de Diagnóstico Veterinário	2018	Cão
V175	Laboratório de Diagnóstico Veterinário	2018	Cão
V251	Laboratório de Diagnóstico Veterinário	2018	Cão
V188	Laboratório de Diagnóstico Veterinário	2018	Cão
V189	Laboratório de Diagnóstico Veterinário	2018	Cão

