



INSTITUTO DE HIGIENE E
MEDICINA TROPICAL
DESDE 1902

Universidade Nova de Lisboa
Instituto de Higiene e Medicina Tropical

Avaliação da atividade de efluxo em *Staphylococcus pseudintermedius* e a sua relação com a suscetibilidade reduzida a agentes antimicrobianos

Marta Sofia Pires Leal

Dissertação para obtenção do grau de Mestre em Ciências Biomédicas,
Especialidade em Biologia Molecular em Saúde Tropical e Internacional

JANEIRO, 2022



INSTITUTO DE HIGIENE E
MEDICINA TROPICAL
DESDE 1902

Universidade Nova de Lisboa
Instituto de Higiene e Medicina Tropical

Avaliação da atividade de efluxo em *Staphylococcus pseudintermedius* e a sua relação com a suscetibilidade reduzida a agentes antimicrobianos

Marta Sofia Pires Leal

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

Orientadora: Prof. Doutora Isabel Couto

Coorientadora: Doutora Sofia Santos Costa

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

Comunicações Científicas

Os resultados apresentados nesta Dissertação foram apresentados, em coautoria, nas seguintes comunicações, sob a forma de *Poster*:

Morais, C., Costa, S. S., Andrade, M., Ramos, B., **Leal, M.**, Abrantes, P., Pomba, C., Couto, I. Clonal lineages of *Staphylococcus pseudintermedius* associated with skin and soft tissue infections in pets, Portugal. ID3395. European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases (ECCMID), 9-12 de Julho, 2021, *Webconference*.

Leal, M., Costa, S.S., Ramos, B., Morais, C., Ferreira, C., Pomba, C., Couto, I. Evaluation of efflux activity in *Staphylococcus pseudintermedius* and its contribution for biocide decreased susceptibility. ID52. Congress of Microbiology and Biotechnology 2021 (MicroBiotec21), 23-26 de Novembro, *Webconference*.

Ramos, B., Costa, S. S., **Leal, M.**, Morais, C., Pomba, C., Couto, I. Fluoroquinolone resistance and associated mechanisms in *Staphylococcus pseudintermedius*. ID416. Congress of Microbiology and Biotechnology 2021 (MicroBiotec21), 23-26 de Novembro, *Webconference*.

Morais, C., Costa, S. S., Andrade, M., Ramos, B., **Leal, M.**, Abrantes, P., Pomba, C., Couto, I. Molecular characterization of *Staphylococcus pseudintermedius* associated with skin and soft tissue infections in pets, Portugal. ID145. Congress of Microbiology and Biotechnology 2021 (MicroBiotec21), 23-26 de Novembro, *Webconference*.

Os resultados apresentados nesta Dissertação foram ainda submetidos para apresentação, em coautoria, na seguinte comunicação sob a forma de *Abstract*:

Leal, M., Costa, S. S., Ramos, B., Morais, C., Ferreira, C., Pomba, C., Couto, I. Efflux and biocide reduced susceptibility in *Staphylococcus pseudintermedius*. Abstract submitted to the 32nd European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Disease (ECCMID), 23-26 de Abril, 2022, *Webconference/Lisbon*.

Agradecimentos

Este é o espaço que encontro para reforçar e dar ênfase ao contributo de todos os que me acompanharam, de uma forma direta e indireta, ao longo desta experiência.

Em primeiro lugar, gostaria de agradecer à Professora Doutora Isabel Couto, pela oportunidade, pela sua amável disponibilidade em receber-me, pelos conselhos e orientação dados ao longo desta Dissertação.

À minha coorientadora, Doutora Sofia Santos Costa, pela orientação, conselhos e conhecimentos transmitidos. Por todo o apoio e ajuda constante ao longo desta Dissertação.

À Professora Doutora Constança Pomba da Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade de Lisboa pela disponibilização das estirpes clínicas de *S. pseudintermedius* estudadas nesta Dissertação.

À equipa do projeto BIOSAFE, pelo apoio, companheirismo, sentido de entreaajuda e partilha de conhecimentos.

À minha família, por todo o amor, apoio, encorajamento e motivação ao longo destes meses. Em especial, pelo interesse demonstrado e pela sua paciência em relação ao meu entusiasmo nas explicações científicas do tema. Obrigada por terem sempre acreditado em mim, e saberem que conseguiria sempre voar mais alto.

Resumo

Staphylococcus pseudintermedius é o principal agente bacteriano de infecções de pele e tecidos moles (SSTIs) em animais de companhia, particularmente no cão. A emergência de estirpes de *S. pseudintermedius* resistentes à meticilina (MRSP), muitas vezes associadas a um fenótipo de multirresistência, é considerada um problema de saúde pública. Neste trabalho pretendeu-se avaliar a atividade de efluxo como um mediador da suscetibilidade reduzida a biocidas e resistência a fluoroquinolonas, aspetos ainda pouco caracterizados em *S. pseudintermedius*.

Para isso, estudou-se uma coleção de 155 estirpes de *S. pseudintermedius* associadas a SSTIs em animais de companhia. A suscetibilidade aos substratos de bombas de efluxo brometo de etídio (EtBr), brometo de tetrafenilfosfónio (TPP) e ciprofloxacina (CIP) foi avaliada por determinação de concentrações mínimas inibitórias (CMI). As distribuições de CMIs foram analisadas e usadas para estimar valores de *cut-off* (CO_{WT}) para o EtBr e TPP, utilizando o programa ECOFFinder. A presença de atividade de efluxo aumentada foi avaliada para estirpes representativas por (i) re-determinação das CMIs na presença dos inibidores de efluxo (IEs) tioridazina e verapamil e (ii) ensaios de acumulação de EtBr em tempo real, na presença/ausência de glucose e presença/ausência de IEs. Foram determinados os níveis de expressão do gene *norA*, que codifica para a bomba de efluxo NorA, em seis estirpes representativas, por RT-qPCR. Foi ainda pesquisada a presença de mutações nos genes *grlA* e *gyrA*, que codificam para os alvos das fluoroquinolonas.

A aplicação do CO_{WT} estimado permitiu detetar uma população *non wild type* de *S. pseudintermedius* para o TPP (TPP^{NWT}), correspondendo a 11,6% (18/155) da coleção. O efeito dos IEs foi avaliado nestas 18 estirpes TPP^{NWT} e em 12 estirpes TPP^{WT} (*wild type*), tendo-se observado uma redução significativa da CMI_{TPP} na população TPP^{NWT} para valores equivalentes aos apresentados pela população WT. Os ensaios de fluorometria aplicados, que seja do nosso conhecimento, pela primeira vez nesta espécie, confirmaram a maior atividade de efluxo nas estirpes TPP^{NWT}, a qual foi inibida pelos IEs. Entre os dois IEs testados, o verapamil apresentou maior atividade inibitória de efluxo. A análise dos níveis de expressão de *norA* relacionou a sobreexpressão deste gene com a maior atividade de efluxo numa das estirpes TPP^{NWT}. Relativamente à

ciprofloxacina, não foram observados efeitos significativos dos IEs sobre os valores de CMI_{CIP} na população TPP^{NWT}, maioritariamente resistente às fluoroquinolonas. A detecção de mutações QRDR (GrlA:Ser80Ile/GyrA:Ser84Leu) nestas estirpes indica que em *S. pseudintermedius* o principal mecanismo de resistência a esta classe de antibióticos será mutação do alvo.

Este trabalho revelou a presença de suscetibilidade reduzida ao biocida TPP, potencialmente mediada por bombas de efluxo MDR, em 11,6% desta coleção de *S. pseudintermedius*. Salienta-se ainda a associação deste fenótipo a estirpes MRSP, as quais apresentam adicionalmente multirresistência. Esta Dissertação realça assim a relevância do efluxo como mediador da suscetibilidade reduzida a biocidas em *S. pseudintermedius*, descrevendo uma abordagem experimental que poderá ser explorada na vigilância da resistência mediada por efluxo neste importante agente patogénico de animais de companhia.

Palavra-chave: *S. pseudintermedius*, efluxo, biocidas, fluoroquinolonas, resistência

Abstract

Staphylococcus pseudintermedius is the main bacterial agent of skin and soft tissue (SSTI) infections in companion animals, particularly dogs. The emergence of methicillin-resistant *S. pseudintermedius* strains (MRSP), often associated with a multidrug resistance phenotype is considered a public health concern. This study aimed to evaluate efflux as a mediator of biocide decreased susceptibility and fluoroquinolone resistance, still poorly characterized in *S. pseudintermedius*.

The study focused on a collection of 155 SSTI-related *S. pseudintermedius* isolated from companion animals. The susceptibility to the efflux pumps substrates ethidium bromide (EtBr), tetraphenylphosphonium bromide (TPP) and ciprofloxacin (CIP) was evaluated by minimum inhibitory concentration (MIC) determination. MIC distributions were analyzed and used to estimate cut-off (CO_{WT}) values for EtBr and TPP by the ECOFFinder program. The presence of increased efflux activity was evaluated for representative strains by (i) re-determination of MICs in the presence of efflux inhibitors (EI), thioridazine and verapamil and (ii) real-time evaluation of EtBr accumulation in the presence/absence of glucose, with/without EIs. Expression levels of the *norA* gene, encoding the NorA efflux pump, was determined in six representative strains by RT-qPCR. The presence of mutations in *grlA* and *gyrA* genes, which code for fluoroquinolones targets, was also investigated.

Determination of CO_{WT} values allowed the detection of a *S. pseudintermedius* non-wild-type population against TPP (TPP^{NWT}) corresponding to 11.6% (18/155) of the collection. The EIs effect was evaluated on these 18 TPP^{NWT} and on 12 TPP^{WT} (wild-type) strains, and significant reductions in CMI_{TPP} were observed for the TPP^{NWT} population to values equivalent to those presented by the WT population. Fluorometric assays confirmed the highest efflux activity in the TPP^{NWT} strains, which was diminished by EIs. Among the two EIs tested, verapamil presented the highest efflux inhibitory activity. The overexpression of *norA* was correlated with highest efflux activity in one TPP^{NWT} strain. Regarding ciprofloxacin, no significant effects of EIs on CMI_{CIP} values were observed in the TPP^{NWT} population, mostly resistant to fluoroquinolones. The detection of QRDR mutations (GrlA:Ser80Ile/GyrA:Ser84Leu) in these strains indicates

that in *S. pseudintermedius* the main mechanism of resistance to these antibiotics is target mutation.

This work revealed the presence of reduced susceptibility to the biocide TPP, potentially mediated by MDR efflux pumps in 11.6 % of a collection of SSTI-related *S. pseudintermedius*. This phenotype was associated to MRSP strains, which showed additionally multiresistance.

This Dissertation highlights the relevance of efflux as a contributor to biocide decreased susceptibility in *S. pseudintermedius*, describing an experimental approach to be explored in surveillance studies of efflux mediated antimicrobial resistance in this important pathogen of companion animals.

Keywords: *S. pseudintermedius*, efflux, biocides, fluoroquinolones, resistance

Índice

| | |
|---|------|
| Comunicações Científicas | i |
| Agradecimentos | iii |
| Resumo | v |
| Abstract | vii |
| Índice de Tabelas | xi |
| Índice de Figuras | xiii |
| Índice de Equações | xv |
| Lista de Abreviaturas, Siglas e Unidades | xvii |
| 1. Introdução | 1 |
| 1.1. Gênero <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> na Medicina Veterinária | 2 |
| 1.3. Antimicrobianos: conceitos e aplicabilidade em <i>S. pseudintermedius</i> | 3 |
| 1.3.1. Biocidas | 3 |
| 1.3.2. Antibióticos | 4 |
| 1.3.3. Terapêutica aplicada no tratamento de SSTIs | 4 |
| 1.4. Mecanismos de resistência aos antimicrobianos em <i>S. pseudintermedius</i> | 7 |
| 1.4.1. Biocidas | 7 |
| 1.4.2. Antibióticos | 7 |
| 1.5. Sistemas de efluxo em estafilococos | 9 |
| 1.5.1. Características gerais | 9 |
| 1.5.2. Bombas de efluxo MDR em estafilococos | 10 |
| 1.5.3. Metodologias de detecção e caracterização da atividade de efluxo | 13 |
| 1.6. Objetivos da Dissertação | 14 |
| 2. Materiais e Métodos | 15 |
| 2.1. Materiais | 15 |
| 2.1.1. Estirpes bacterianas | 15 |
| 2.1.2. Outro material biológico | 15 |
| 2.1.3. Meios de cultura, enzimas e soluções | 15 |
| 2.2. Métodos | 18 |

| | | |
|----------|---|----|
| 2.2.1. | Determinação de concentração mínima inibitória (CMI) pelo método de microdiluição | 18 |
| 2.2.2. | Determinação de valores de <i>Cut-off</i> de biocidas | 20 |
| 2.2.3. | Deteção da atividade de efluxo por fluorometria em tempo real | 21 |
| 2.2.4. | Pesquisa de mutações que conferem resistência a fluoroquinolonas | 22 |
| 2.2.5. | Análise da expressão do gene <i>norA</i> | 24 |
| 2.2.5.1. | Extração de RNA total | 24 |
| 2.2.5.2. | Quantificação relativa da expressão do gene <i>norA</i> por RT-qPCR | 25 |
| 2.2.6. | Análise Estatística | 26 |
| 3. | Resultados | 27 |
| 3.1. | Identificação de populações <i>Non wild type</i> de <i>S. pseudintermedius</i> para EtBr e TPP | 28 |
| 3.1.1. | Avaliação da suscetibilidade ao EtBr e TPP por determinação da concentração mínima inibitória..... | 28 |
| 3.1.2. | Determinação de valores de <i>Cut-off</i> e identificação de populações NWT para o EtBr e TPP | 30 |
| 3.2. | Deteção e caracterização da atividade de efluxo | 31 |
| 3.2.1. | Efeito dos inibidores de efluxo nas CMI _{EtBr} e CMI _{TPP} | 31 |
| 3.2.2. | Deteção e análise da atividade de efluxo por fluorometria em tempo real | 34 |
| 3.2.3. | Efeito da presença de inibidores de efluxo nos valores de CMI _{CIP} | 40 |
| 3.2.4. | Pesquisa de mutações que conferem resistência a fluoroquinolonas | 42 |
| 3.3. | Análise da expressão do gene <i>norA</i> | 42 |
| 4. | Discussão e Conclusões | 45 |
| 5. | Referências Bibliográficas | 53 |
| 6. | Anexos | 69 |

Índice de Tabelas

| | |
|--|----|
| Tabela 1. Terapêutica tópica utilizada em tratamento de SSTI de animais de companhia consoante o tipo de lesão | 5 |
| Tabela 2. Opções de tratamento sistémico no tratamento de infeções SSTI em animais de companhia | 6 |
| Tabela 3. Mecanismos de resistência conhecidos para diversas classes de biocidas em <i>S. pseudintermedius</i> | 7 |
| Tabela 4. Mecanismos de resistência conhecidos para diversas classes de antibióticos em <i>S. pseudintermedius</i> | 8 |
| Tabela 5. Bombas de efluxo MDR descritas em estafilococos | 11 |
| Tabela 6. Composição dos meios de cultura utilizados..... | 16 |
| Tabela 7. Enzimas utilizadas..... | 16 |
| Tabela 8. Soluções e tampões utilizados, com respetivas composições..... | 17 |
| Tabela 9. Soluções de compostos utilizadas. | 17 |
| Tabela 10. Sequências de <i>primers</i> utilizados na amplificação da zona QRDR dos genes <i>grrA</i> e <i>gyrA</i> de <i>S. pseudintermedius</i> e respetivos amplicões..... | 23 |
| Tabela 11. Sequências de <i>primers</i> utilizados na análise da expressão relativa dos genes <i>norA</i> e <i>gyrB</i> de <i>S. pseudintermedius</i> por RT-qPCR e respetivos amplicões. | 26 |
| Tabela 12. Concentrações mínimas inibitórias de EtBr e TPP para a subcoleção de 57 de estirpes de <i>S. pseudintermedius</i> e respetivo perfil de resistência à metilina..... | 28 |
| Tabela 13. Valores de CO _{WT} , desvio padrão e estirpes NWT para EtBr e TPP para <i>S. pseudintermedius</i> | 31 |
| Tabela 14. Efeito dos inibidores de efluxo TZ e VER nos valores de CMI de TPP e EtBr..... | 32 |
| Tabela 15. Valores de RFF das estirpes TPP ^{WT} e TPP ^{NWT} , determinados a partir dos ensaios de acumulação de EtBr na presença de inibidores de efluxo..... | 39 |
| Tabela 16. Efeito dos IEs nas CMI _{EtBr} , CMI _{TPP} e CMI _{CIP} e mutações nos genes alvo das fluoroquinolonas no conjunto de estirpes representativas de <i>S. pseudintermedius</i> selecionadas para os ensaios de fluorimetria, assim como as respetivas características genóticas e fenotípicas | 41 |

Tabela A 1. Caracterização das estirpes de *S. pseudintermedius* recolhidos em SSTIs de animais de companhia proveniente do Laboratório de Resistência aos Antibióticos e Biocidas (FMV/UL) e de um laboratório de diagnóstico veterinário (Lisboa). 69

Índice de Figuras

| | |
|---|----|
| Figura 1. Alvos das classes de diferentes classes de antibióticos. | 4 |
| Figura 2. Representação das principais famílias de bombas efluxo MDR em bactérias..... | 10 |
| Figura 3. Esquema de preparação de placa de 96 poços para determinação de CMI pelo método de microdiluição. | 19 |
| Figura 4. Esquema de preparação de placa de 96 poços para determinação de CMI, na presença de inibidores, pelo método de microdiluição..... | 20 |
| Figura 5. Esquema representativo da abordagem experimental seguida nesta Dissertação para a caracterização da atividade de efluxo em <i>S. pseudintermedius</i> | 27 |
| Figura 6. Distribuição de CMI de EtBr e TPP para a coleção total de 155 <i>S. pseudintermedius</i> e respetivo perfil de resistência à metilicina..... | 29 |
| Figura 7. Distribuição de valores de CMI _{EtBr} e CMI _{TPP} e estimativa do respetivo valor de CO _{WT} | 30 |
| Figura 8. Efeito dos inibidores de efluxo TZ e VER na CMI _{EtBr} e CMI _{TPP} na população TPP ^{WT} e TPP ^{NWT} | 33 |
| Figura 9. Ensaio de acumulação na presença de concentrações crescentes de EtBr de <i>S. pseudintermedius</i> , na ausência e presença de glucose 0,4 % | 36 |
| Figura 10. Ensaio de acumulação EtBr na ausência/presença de glucose 0,4 % e na ausência/presença dos inibidores TZ e VER. | 38 |
| Figura 11. Quantificação relativa da expressão do gene <i>norA</i> em seis <i>S. pseudintermedius</i> recorrendo a RT-qPCR. | 43 |

Índice de Equações

| | |
|---|----|
| Equação 1. Cálculo do valor de RFF para um determinado composto | 22 |
| Equação 2. Cálculo da expressão génica relativa, segundo o método comparativo Ct | 25 |

Lista de Abreviaturas, Siglas e Unidades

Abreviaturas e Siglas

CIP - Ciprofloxacina

CLSI - *Clinical Laboratory Standards Institute*

CMI - Concentração Mínima Inibitória

DNA - Ácido desoxirribonucleico, do inglês *Deoxyribonucleic acid*

DO₆₀₀ - Densidade ótica a 600 nm

EDTA - Ácido etilenodiamino tetra-acético, do inglês *Ethylenediamine tetraacetic acid*

EtBr - Brometo de etídio

EMA - *European Medicines Agency*

EUCAST - *European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing*

IE - Inibidor de efluxo

MDR - Multiresistente, do inglês *multidrug resistant*

MHA - *Mueller-Hinton Agar*

MHB - *Mueller- Hinton Broth*

CA-MHB - *Mueller- Hintor Broth* ajustado a catiões

MRSA- *Staphylococcus aureus* resistente à meticilina, do inglês *methicillin-resistant Staphylococcus aureus*

MRSP - *Staphylococcus pseudintermedius* resistente à meticilina, do inglês *methicillin-resistant Staphylococcus pseudintermedius*

MSSP - *Staphylococcus pseudintermedius* suscetível à meticilina, do inglês *methicillin-susceptible Staphylococcus pseudintermedius*

NWT - *Non wild type*

PCR - Reação de polimerase em cadeia, do inglês *Polimerase Chain Reaction*

PBP - Proteína de ligação à penicilina, do inglês *Penicilium Binding Protein*

PBS - Tampão fosfato salino, do inglês *Phosphate buffer saline*

RFF - Fluorescência final relativa, do inglês *Relative final fluorescence*

RNA - Ácido ribonucleico, do inglês *Ribonucleic acid*

SIG - Grupo de *Staphylococcus intermedius*, do inglês *Staphylococcus intermedius group*

SSTI - Infecções de pele e tecidos moles, do inglês *skin and soft tissues infections*

TPP - Brometo de tetrafenilfosfônio

TSA - *Tryptone Soya Agar*

TSB - *Tryptone Soya Broth*

TZ - Tioridazina

VER - Verapamil

WT - *Wild type*

Unidades

g- Grama

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

M - Molar; **mM** - milimolar; **µM** - micromolar; **nM** - nanomolar

p/v - Peso por volume

pb - Pares de base; kb – Kilo base

rpm - Rotações por minuto

v/v - Volume por volume

1. Introdução

1.1. Género *Staphylococcus*

O género *Staphylococcus*, descrito formalmente por Rosenbach em 1884, inclui atualmente 61 espécies de bactérias em forma de cocos, de coloração de Gram-positiva (1), produtoras de catalase, anaeróbias facultativas (2,3). As células, com diâmetro entre 0,5 – 1 µm, estão habitualmente dispostas em aglomerados em forma de cachos, podendo também se apresentar em pares ou em pequenas cadeias. Os estafilococos não apresentam motilidade e não formam esporos, podendo em alguns casos apresentar microcápsula (2). Embora sejam capazes de sobreviver numa gama alargada de temperaturas (6,5 - 46 °C), a sua temperatura ideal de crescimento é de 30-37 °C (2). Estas bactérias encontram-se distribuídas na natureza, embora a sua presença seja mais notória na pele e mucosas de mamíferos, onde vivem de forma comensal (2).

Dentro do género *Staphylococcus*, é possível diferenciar as espécies consoante a produção da enzima coagulase, distinguindo-se as espécies produtoras de coagulase, onde se inclui *Staphylococcus aureus* e *Staphylococcus pseudintermedius* e restantes membros do grupo de *Staphylococcus intermedius*, das espécies não produtoras de coagulase (2,3).

A nível clínico, destacam-se algumas espécies de *Staphylococcus* que são consideradas de maior importância, em particular *S. aureus*, pela sua importância como agente de infeção primário, elevada adaptabilidade, presença de diversos fatores de virulência e capacidade de aquisição de mecanismos de resistência a inúmeras classes de antimicrobianos. No entanto, em medicina veterinária, a espécie *S. pseudintermedius* adquire maior importância, sobretudo a nível dos animais de companhia.

1.2. *Staphylococcus pseudintermedius*

1.2.1. Características gerais

A espécie *S. intermedius* foi descrita na década de 1970, como sendo o principal agente bacteriano de infecções de pele em animais. Em 2005, através de técnicas moleculares (análise de sequências de 16S rRNA), a espécie *S. pseudintermedius* foi proposta como uma nova espécie, diferenciando-se de *S. intermedius* (4). Atualmente, pertence ao grupo de *S. intermedius* (SIG, de *S. intermedius group*), o qual inclui também se incluem as espécies *Staphylococcus delphini* e *Staphylococcus cornubiensis*, tendo ainda sido proposta a inclusão de *Staphylococcus ursi*, embora esta espécie ainda não esteja validada (5).

S. pseudintermedius é uma espécie comensal da pele e mucosas de animais, principalmente de cães (6–8), podendo atingir cerca de 90% dos isolados microbianos da microflora destas zonas (9,10). Em cães saudáveis, *S. pseudintermedius* pode ser isolado na região da boca, região anal, narinas, faringe, testa e virilhas (9,11,12).

A espécie *S. pseudintermedius* também possui potencial patogênico, já que pode apresentar vários fatores de virulência, onde se incluem enzimas (coagulase, termonuclease e protease), fatores de adesão ao hospedeiro (proteína A, formação de biofilmes) e toxinas (citotoxina, toxina esfoliativa, enterotoxina, leucocidinas e hemolisina) (13).

1.2.2. Importância de *S. pseudintermedius* na Medicina Veterinária

S. pseudintermedius é um dos principais microrganismos colonizadores da microflora de animais de estimação, tais como cães e gatos (6–8). No entanto, este organismo pode tornar-se patogênico, originando uma gama variada de infecções, podendo estas ser moderadas ou severas (6,10,12). *S. pseudintermedius* tem a capacidade de provocar infecções de pele e tecidos moles (SSTI, do inglês *skin and soft tissue infections*), como pioderma, dermatite atópica, abscessos, feridas pós-operatórias (6,10,12,14). Esta espécie é também agente de otites, infecções do trato respiratório, do trato urinário e do trato reprodutor (11,12,14,15).

As infecções causadas por *S. pseudintermedius* não se limitam aos hospedeiros de origem animal, podendo ocorrer transmissão zoonótica para humanos (7,16–18). A frequência destas infecções em humanos aparenta ser baixa, com maior propensão para ocorrer em donos de animais de estimação e veterinários, devido ao contato próximo entre estes e animais colonizados e/ou infetados com *S. pseudintermedius* (19,20). No entanto, as infecções em humanos podem ser severas, incluindo bacteremias, cardiomiopatias e endocardites (20).

A espécie *S. pseudintermedius* apresenta também a capacidade de adaptação e resposta face à exposição aos antimicrobianos utilizados na prática clínica veterinária. A emergência na última década de estirpes de *S. pseudintermedius* resistentes à meticilina (MRSP, do inglês *methicillin resistant S. pseudintermedius*), tem-se demonstrado desafiante na saúde animal (8). Este desafio limita a terapêutica disponível, dado que estas estirpes são resistentes a todos os β -lactâmicos e por, geralmente, apresentarem fenótipos de multirresistência (resistência três ou mais classes de antibióticos) (21–23).

1.3. Antimicrobianos: conceitos e aplicabilidade em *S. pseudintermedius*

1.3.1. Biocidas

Os biocidas são compostos que são aplicados para desinfecção e antissepsia (24,25). São comumente utilizados em ambiente hospitalar, no âmbito da prevenção de infecções nosocomiais, para desinfecção de materiais/superfícies, mas também para uso tópico. No entanto, a sua utilização estende-se a outras áreas como a agricultura, as indústrias cosmética e alimentar, entre outras (25). São também amplamente usados em diversos produtos de higiene e limpeza na comunidade (26).

Os agentes químicos presentes nos biocidas incluem álcoois, fenóis, biguanidas, iodetos e compostos de amónio quaternário (24,25). Estes compostos atuam sobre múltiplos alvos celulares em simultâneo, diferenciando-os dos antibióticos (24). Esta característica pode explicar a menor prevalência de resistência a estes antimicrobianos. No entanto, o aumento da utilização de biocidas tem vindo a promover o aparecimento de estirpes com menor suscetibilidade para estes compostos (27,28).

1.3.2. Antibióticos

Os antibióticos são substâncias capazes de interferir com o crescimento de microrganismos, tendo uma ação bacteriostática, ou promovendo a eliminação dos microrganismos, apresentando neste caso uma ação bactericida.

Os antibióticos são agrupados em diferentes classes, consoante o seu mecanismo de ação, estrutura química ou espectro de atividade (Figura 1). As classes de antibióticos com ação bactericida têm maioritariamente como alvo a inibição da síntese da parede celular (classes dos β -lactâmicos e glicopéptidos), a permeabilidade da parede celular (polimixinas) e a biossíntese de ácidos nucleicos e replicação de DNA (quinolonas, rifamicinas, sulfamidas e 2-4-diaminopirimidinas/trimetoprim) (29). Por sua vez, os antibióticos com ação bacteriostática atuam geralmente ao nível da inibição da síntese proteica, incluindo as classes das tetraciclina, macrólidos-lincosaminas, estreptograminas, cloranfenicol/fenicois e oxazolidinonas, à exceção dos aminoglicósidos, que apresentam ação bactericida (29).

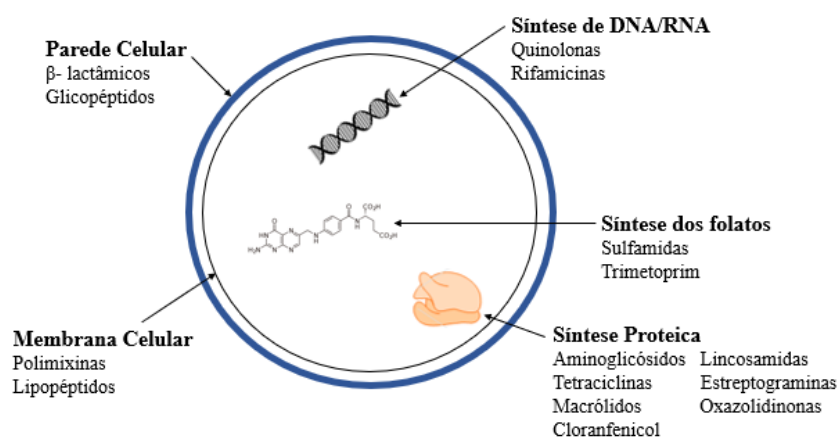


Figura 1. Alvos celulares de diferentes classes de antibióticos.

1.3.3. Terapêutica aplicada no tratamento de SSTIs

O tratamento preconizado em infeções de pele causadas por *S. pseudintermedius* envolve uma combinação de terapêutica tópica e sistémica (30).

Em infeções mais superficiais ou localizadas, é preconizada a utilização exclusiva de terapêutica tópica, nomeadamente a aplicação de biocidas e alguns antibióticos

(31,32). A utilização destes antimicrobianos é preferida, visto que são eficazes no tratamento destas infecções, apresentam menores efeitos secundários e diminuem a frequência de utilização de antibióticos, diminuindo a longo prazo, o aparecimento de resistência (12,32). As formulações utilizadas consistem em champôs, loções, géis, *sprays*, cremes e pomadas. A utilização destas formulações depende da extensão da infecção, sendo os champôs, loções, *sprays* indicados para infecções mais extensas e generalizadas, enquanto as restantes formulações são aplicadas em infecções mais localizadas (12,32) (Tabela 1).

A utilização da terapêutica tópica é também aconselhada no tratamento de infecções de pele superficiais causadas por estirpes MRSP (33), visto que a terapêutica sistémica é bastante limitada no tratamento de infecções provocadas por estas estirpes (30,34,35).

Tabela 1. Terapêutica tópica utilizada em tratamento de SSTI de animais de companhia consoante o tipo de lesão (32).

| Tipo de lesão | Formulações | Antimicrobiano |
|-------------------------|-------------------------------|---------------------------------|
| Extensa ou generalizada | Champô, loção, <i>spray</i> | Clorexidina |
| | | Peróxido de benzoílo |
| | | Iodopovidona |
| | | Lactato de etilo |
| | | Triclosan |
| Local | Géis, cremes, pomadas, loções | Clorexidina |
| | | Peróxido de benzoílo |
| | | Ácido acético, láctico e málico |
| | Antibióticos tópicos | Sulfadiazina de prata |
| | | Ácido fusídico |
| | | Mupirocina |
| | | Novobiocina |
| | | Bacitracina |
| | | Pristinamicina |

Por outro lado, a utilização da terapêutica sistémica é preconizada quando são identificadas infecções de pele mais severas e/ou na presença de outros fatores, tais como reações adversas ou baixa recetividade do animal à terapêutica tópica (33). Os

antibióticos utilizados no tratamento sistêmico subdividem-se em 1^a, 2^a e 3^a linha (32) (Tabela 2).

A 1^a linha consiste num tratamento empírico, na qual são utilizados antibióticos com espectros de ação variada, desde que apresentem atividade anti-estafilocócica (β -lactâmicos, lincosamidas e trimetopim). A 2^a linha é aplicada quando é demonstrada resistência face aos antibióticos de 1^a linha. Os antibióticos de 2^a linha incluem alguns β -lactâmicos, tetraciclina, cloranfenicol, fluoroquinolonas, aminoglicósidos e rifamicinas. A utilização destes antibióticos é partilhada na saúde humana e animal, podendo a sua utilização promover o desenvolvimento de resistências. Por último, a 3^a linha está reservada para o tratamento de estirpes multirresistentes. A 3^a linha é constituída por antibióticos que não estão licenciados para uso veterinário. Estes antibióticos são aplicados na saúde humana, para o tratamento de infeções graves causadas por estirpes de *S. aureus* resistentes à meticilina (MRSA). No entanto, os antibióticos de 3^a linha podem ser utilizados, quando os antibióticos de 1^a e 2^a linha não são efetivos e mediante a opinião de especialistas. Contudo, a sua utilização é fortemente desencorajada (32,36).

Tabela 2. Opções de tratamento sistêmico no tratamento de infeções SSTI em animais de companhia (32).

| Categoria | Antimicrobiano |
|----------------------|--|
| 1 ^a linha | Clindamicina ou lincomicina |
| | 1 ^a geração de cefalosporinas (cefalexina, cefadroxila) |
| | Amoxicilina-ácido clavulânico |
| | Trimetoprim |
| 2 ^a linha | 3 ^a geração de cefalosporinas (cefovecina, cefpodoxima) |
| | 3 ^a geração de cefalosporinas (cefovecina, cefpodoxima) |
| | Doxiciclina ou minociclina |
| | Cloranfenicol |
| | Fluoroquinolonas (difloxacina, enrofloxacina, marbofloxacina, orbifloxacina, pradofloxacina, ciprofloxacina) |
| | Rifampicina |
| 3 ^a linha | Gentamicina ou amicacina |
| | Linezolida |
| | Teicoplanina |
| | Vancomicina |

1.4. Mecanismos de resistência aos antimicrobianos em *S. pseudintermedius*

1.4.1. Biocidas

Dado que os biocidas apresentam uma ação inespecífica contra os microrganismos, o surgimento de mecanismos de resistência a estes compostos é menos frequente (24). No entanto, tem-se vindo a identificar alguns mecanismos de resistência associados a uma diminuição da suscetibilidade a vários biocidas em estafilococos (24,37–39).

Na Tabela 3, são descritos alguns mecanismos de resistência identificados para biocidas em *S. pseudintermedius*.

Tabela 3. Mecanismos de resistência conhecidos para diversas classes de biocidas em *S. pseudintermedius*.

| Classe de Biocida | Exemplo de Biocidas | Genes envolvidos e localização | Mecanismo de Resistência | Referências |
|--|------------------------|--|--------------------------|-------------|
| Biguanidas | Clorexidina | <i>qacA/B</i> , <i>smr</i> (P) | Efluxo | (38,40) |
| Compostos de amónio quaternário | Cloreto de benzalcónio | <i>qacA/B</i> (P) <i>qacG</i> (P) <i>qacJ</i> (P) <i>norA</i> (C) <i>smr</i> (P) | Efluxo | (38,40–42) |

P: Plasmídeo; C: Cromossoma.

1.4.2. Antibióticos

Os mecanismos de resistência já descritos em estafilococos, incluindo *S. pseudintermedius*, englobam a modificação do antibiótico (inativação ou modificação enzimática do antibiótico), diminuição da concentração intracelular do antibiótico (sistemas de efluxo) e modificação do alvo (mutações pontuais, modificação enzimática do alvo) ou *bypass* do alvo (substituições do alvo original) (43,44).

Na Tabela 4 encontram-se exemplificados alguns dos mecanismos já conhecidos e estudados em *S. pseudintermedius* para as diferentes classes de antibióticos.

Tabela 4. Mecanismos de resistência conhecidos para diversas classes de antibióticos em *S. pseudintermedius*.

| Classe de antibiótico | Exemplos de Antibióticos | Genes envolvidos e localização | Mecanismo de Resistência | Referências |
|-------------------------------|---|--|--|-------------|
| β-lactâmicos | Penicilinas Cefalosporinas | <i>blaZ</i> (P) | Inativação do antibiótico beta-lactamase | (40,43,45) |
| | | <i>mecA</i> (C) | Substituição do alvo ou “bypass” (PBP2a) | |
| Aminoglicósidos | Estreptomicina Canamicina Amicacina Gentamicina Neomicina | <i>aacA-aphD</i> | Modificação do antibiótico | (43,44) |
| | | <i>aphA-3</i> | Acetiltransferase (AAC) | |
| | | <i>aadE</i> | Fosfotransferase (APH) | |
| | | (P, C, Tnp) | Nucleotidiltransferase (ANT) | |
| Tetraciclina | Tetraciclina | <i>tetK, tetL</i> (P) | Efluxo | (40,43,46) |
| | | <i>tetM, tetO</i> (C, Tnp) | Proteção ribossomal | |
| Macrólidos | Eritromicina | <i>ermA</i> | Modificação do alvo | (40,43) |
| | | <i>ermB</i> <i>ermC</i> (P, Tnp) | Metiltransferases | |
| | | <i>msr(A)</i> (P) | Efluxo | (43,44) |
| Lincosaminas | Clindamicina | <i>ermA</i> <i>ermB</i> <i>ermC</i> (P, Tnp) | Modificação do alvo | (43,47,48) |
| | | <i>lnu</i> (P) | Metiltransferase | |
| Fenicois | Cloranfenicol | <i>cat_{pc221}</i> (P) | Modificação do antibiótico | (43,47) |
| | | <i>fxA</i> (P) | Acetiltransferase | |
| Quinolonas | Enrofloxacina Ciprofloxacina | <i>norA</i> (C) | Efluxo | (43) |
| | | <i>grlA/B</i> (C) | Efluxo | (41) |
| | | <i>gyrA/B</i> (C) | DNA topoisomerase IV DNA gyrase | (47,49,50) |
| Rifamicinas | Rifampicina | <i>rpoB</i> (C) | Modificação do alvo Subunidade β da RNA polimerase | (43,47) |
| 2-4-diaminopirimidinas | Trimetoprim | <i>dfrG</i> (C) | Substituição do alvo ou “bypass” Dihidrofolato redutase | (8,43,51) |
| Fusidanos | Ácido fusídico | <i>fusC</i> (C) | Proteção do alvo Metaloproteína | (24,43,47) |
| Ácido carboxílico | Mupirocina | <i>ileS</i> (C) | Modificação do alvo | (52,53) |
| | | <i>ileS-2</i> (P) | Isoleucil-tRNA sintetase Isoleucil-tRNA sintetase | |

P: Plasmídeo; C: Cromossoma; Tnp: Transposição.

1.5. Sistemas de efluxo em estafilococos

1.5.1. Características gerais

As bombas de efluxo são proteínas transmembranares presentes em células procarióticas e eucarióticas. Estas proteínas são codificadas por genes que se podem encontrar no cromossoma, em plasmídeos ou noutros elementos genéticos móveis (48). A função destas proteínas assenta na extrusão de diversos compostos tóxicos para a célula, libertando-os para o seu exterior (54). Estes compostos podem ser metabolitos celulares, detergentes, metais pesados, solventes orgânicos, antimicrobianos, entre outros (55).

Desde os anos de 1980 que diversos sistemas de efluxo começaram a ser identificados em bactérias e associados à emergência de resistência aos antimicrobianos. Tem sido sugerido para várias espécies bacterianas, incluindo estafilococos (56–58), que muitos destes sistemas de efluxo atuam como uma resposta primária das células bacterianas à presença de antimicrobianos, que lhe permite sobreviver até que se estabeleçam outros mecanismos de resistência mais estáveis (59). Os sistemas de efluxo podem ser classificados quanto à sua especificidade de substrato, sendo classificados como específicos quando ocorre extrusão de apenas uma classe de antibiótico ou como MDR (*multidrug-resistance*) quando transportam antimicrobianos estrutural e quimicamente distintos (48). As bombas de efluxo específicas podem ser codificadas por genes presentes tanto em elementos genéticos móveis como no cromossoma, enquanto as bombas de efluxo MDR são codificadas, maioritariamente, por genes localizados no cromossoma (58).

As bombas de efluxo MDR estão divididas em várias famílias: superfamília “*ATP (adenosine-triphosphate)-Binding cassette*” (ABC), superfamília “*Major facilitator*” (MFS), superfamília “*Resistance-nodulation-cell division*” (RND), família “*Small multidrug resistance*” (SMR) e família “*Multidrug and toxic compound extrusion*” (MATE) (55,60) (Figura 2). À exceção da família RND, que se encontra maioritariamente em bactérias de coloração Gram-negativa, as restantes famílias de transportadores podem encontrar-se distribuídas em bactérias de coloração Gram-positiva e Gram-negativa (61). Estas famílias de transportadores podem ainda diferenciar-se de acordo com a fonte de

energia que usam, em transportadores ativos primários e transportadores ativos secundários. Os transportadores ativos primários utilizam a hidrólise de ATP para efetuarem a extrusão de compostos contra o gradiente de concentração (superfamília ABC). Por outro lado, os transportadores secundários utilizam o gradiente de prótons (superfamílias MFS, RND e SMR) e/ou de sódio (família MATE) para exportar os antimicrobianos, através de antiporte de iões H^+ e/ou Na^+ , respetivamente (48).

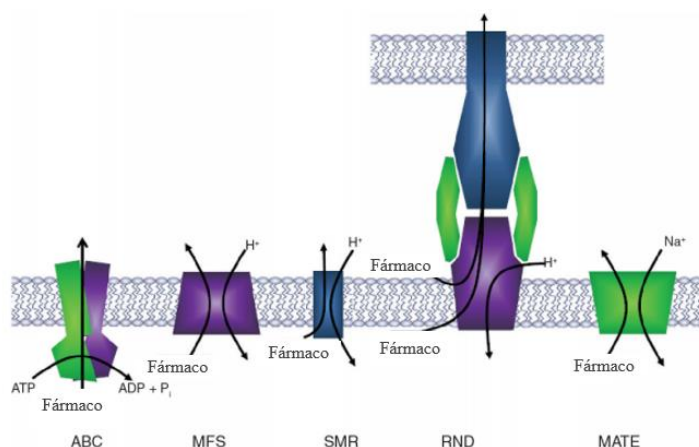


Figura 2. Representação das principais famílias de bombas efluxo MDR em bactérias.
Adaptado de Blair *et al.*, 2014 (62).

1.5.2. Bombas de efluxo MDR em estafilococos

Dentro do género *Staphylococcus*, *S. aureus* é a espécie para a qual os sistemas de efluxo MDR estão caracterizados em maior detalhe. Atualmente, são conhecidas mais de quinze bombas de efluxo codificadas por genes presentes no cromossoma ou em plasmídeos de *S. aureus* (58,63–66). Estas bombas de efluxo estão associadas à extrusão de antibióticos, como fluoroquinolonas, tetraciclina, macrólidos, bem como à extrusão de biocidas como compostos de amónio quaternário e corantes (48,63,64,67) (Tabela 5).

Um dos sistemas de efluxo mais bem estudado em *S. aureus* é a bomba NorA, constituída por 388 aminoácidos e doze segmentos transmembranares. Esta proteína é codificada pelo gene cromossómico *norA*, identificado pela primeira vez num isolado de *S. aureus* resistente a fluoroquinolonas, no Japão (68). A expressão deste gene é basal em *S. aureus*, mas pode aumentar por ação de genes reguladores ou por mutações na sua região promotora. A sobreexpressão de NorA está relacionada com fenótipos de resistência aos

substratos utilizados por esta bomba, nomeadamente, fluoroquinolonas, biocidas e corantes (48,69,70). A presença de homólogos do gene *norA* já foi reportada noutras espécies de estafilococos (71,72), incluindo *S. pseudintermedius* (41,73). Apesar de a resistência mediada por bombas de efluxo ainda estar pouco caracterizada em *S. pseudintermedius*, sabe-se que este mecanismo está envolvido no desenvolvimento de resistência a algumas classes de antibióticos, como as tetraciclina e macrólidos/lincosamidas (44,47). Relativamente a outros antimicrobianos, como os biocidas, é descrita a presença de genes plasmídicos (*qac* e *smr*) em *S. pseudintermedius*, que estão associados à atividade de efluxo (38,40). Os genes *qac* estão associados a uma diminuição da suscetibilidade a biocidas, tais como compostos de amónio quaternário e corantes, como verificado em outras espécies de estafilococos, nomeadamente *S. aureus* (48). Para *S. pseudintermedius*, apesar de já estar descrita a diminuição da suscetibilidade a biocidas, ainda não foi identificada uma associação entre a diminuição da suscetibilidade e a presença destes genes plasmídicos (38,42,74).

Tabela 5. Bombas de efluxo MDR descritas em estafilococos (codificadas por genes presentes no cromossoma ou em plasmídeos).

| Bomba efluxo | Família | Especificidade do substrato | Gene e sua Localização | Espécie | Referências |
|--------------|---------|--|------------------------|---|---------------|
| NorA | MFS | Fluoroquinolonas hidrofílicas QAC's (Cloreto de benzalcónio) QPC's (Tetrafenilfosfónio (TPP)) Corantes (Brometo de etídio (EtBr), rodamina) | <i>norA</i> (C) | <i>S. aureus</i> <i>S. pseudintermedius</i> <i>S. epidermidis</i> | (48,75–78) |
| NorB | MFS | Fluoroquinolonas hidrofílicas Fluoroquinolonas hidrofóbicas Tetraciclina QAC's (Cetrimida) QPC's (TPP) Corantes (EtBr) | <i>norB</i> (C) | <i>S. aureus</i> <i>S. epidermidis</i> | (48,76–78) |
| NorC | MFS | Fluoroquinolonas hidrofílicas Fluoroquinolonas hidrofóbicas Corantes (EtBr) | <i>norC</i> (C) | <i>S. aureus</i> <i>S. epidermidis</i> | (48,76–78) |
| MepA | MATE | Fluoroquinolonas hidrofílicas Fluoroquinolonas hidrofóbicas Gliciliclinas (Tigeciclina) QAC's (Cetrimida, cloreto de benzalcónio) QPC's (TPP) Corantes (EtBr) | <i>mepA</i> (C) | <i>S. aureus</i> | (48,61,75,76) |

Fluoroquinolonas hidrofílicas: ciprofloxacina e norfloxacina; Fluoroquinolonas hidrofóbicas: moxifloxacina, sparfloxacina; QAC's: compostos de amónio quaternário; QPC's: compostos de fosfónio quaternário; TPP: tetrafenilfosfónio; EtBr: brometo de etídio; C: cromossoma; P: plasmídeo.

Tabela 5. (Continuação)

| Bomba efluxo | Família | Especificidade do substrato | Gene e sua Localização | Espécie | Referências |
|----------------------|---------|---|------------------------|---|----------------------------|
| MdeA | MFS | Fluoroquinolonas hidrofílicas Virginiamicina, novobiocina, mupirocina, ácido fusídico QAC's (Cloreto de benzalcónio, dequalínio) QPC's (TPP) Corantes (EtBr) | <i>mdeA</i> (C) | <i>S. aureus</i> | (48,75,76) |
| SepA | SMR | QAC's (Cloreto de benzalcónio) Biguanidinas (Clorhexidina) Corantes (acriflavina) | <i>sepA</i> (C) | <i>S. aureus</i> | (48,75,79) |
| SdrM | MFS | Fluoroquinolonas hidrofílicas Corantes (EtBr, acriflavina) | <i>sdrM</i> (C) | <i>S. aureus</i> | (48,75,76,79) |
| LmrS | MFS | Oxazolidinonas (Linezolida) Fenicois (Cloranfenicol, florfenicol) Lincosamida (Lincomicina) Aminoglicosídeos (Estreptomicina, canamicina) Macrólidos (Eritromicina) Trimetoprim, ácido fusídico QPC's (TPP) Detergentes (SDS) Corantes (EtBr) | <i>lmrS</i> (C) | <i>S. aureus</i> | (48,75,76) |
| QacA | MFS | QAC's (Cloreto de benzalcónio, dequalínio, brometo de cetrimónio) QPC's (TPP) Biguanidas (Clorhexidina) Diamidinas (Pentamidina) Corantes (EtBr, rodamina, acriflavina, cristal de violeta) | <i>qacA</i> (P) | <i>S. aureus</i> <i>S. pseudintermedius</i> <i>S. epidermidis</i> | (42,48,61,75 ,76,78,79) |
| QacB | MFS | QAC's (Cloreto de benzalcónio) QPC's (TPP) Corantes (EtBr, rodamina, acriflavina, cristal de violeta) | <i>qacB</i> (P) | <i>S. aureus</i> <i>S. pseudintermedius</i> <i>S. epidermidis</i> | (42,48,76,78 ,79) |
| Smr | SMR | QAC's (Cloreto de benzalcónio, cetrimida) Corantes (EtBr, cristal de violeta) | <i>smr</i> (P) | <i>S. aureus</i> <i>S. pseudintermedius</i> <i>S. epidermidis</i> | (42,48,75,78) |
| QacG/ J/H | SMR | QAC's (Cloreto de benzalcónio, cetiltrimetilamónio) Corantes (EtBr) | <i>qacG/H/J</i> (P) | <i>S. aureus</i> <i>S. pseudintermedius</i> (<i>qacG/J</i>) <i>S. epidermidis</i> (<i>qacJ</i>) | (42,48,76,78 ,79) |

Fluoroquinolonas hidrofílicas: ciprofloxacina e norfloxacina; Fluoroquinolonas hidrofóbicas: moxifloxacina, sparfloxacina; QAC's: compostos de amónio quaternário; QPC's: compostos de fosfónio quaternário; TPP: tetrafenilfosfónio; EtBr: brometo de etídio; SDS: dodecil sulfato de sódio; C: cromossoma; P: plasmídeo.

1.5.3. Metodologias de detecção e caracterização da atividade de efluxo

O reconhecimento da importância do efluxo na resistência a diversos antimicrobianos promoveu o desenvolvimento de metodologias para a sua detecção e caracterização. Entre estas técnicas contam-se a determinação da concentração mínima inibitória (CMI) de substratos de bombas de efluxo, na ausência ou presença de inibidores e ensaios de fluorometria em tempo real (58,80,81). Muitas destas técnicas utilizam compostos como o brometo de etídio (EtBr), um substrato da maioria das bombas de efluxo MDR (58), como marcador de efluxo.

A determinação de CMI de EtBr é efetuada através do método da microdiluição na ausência e presença de inibidores de efluxo (IE), com o objetivo de diferenciar estirpes com atividade de efluxo aumentada de estirpes com efluxo basal (58,82). De um modo geral, considera-se que uma diminuição de $\geq 4x$ da CMI de EtBr na presença de IE relativamente ao valor de CMI inicial, indicativa de atividade de efluxo aumentada (56,83). Para algumas espécies de estafilococos, como *S. aureus* (58,84,85) e *S. epidermidis* (86), conhecem-se alguns IEs, com a atividade inibitória de efluxo, como a tioridazina (TZ) e verapamil (VER). O TZ é utilizado como medicamento antipsicótico e o VER como bloqueador dos canais de cálcio no tratamento de doenças cardíacas (87,88). Na inibição da atividade de efluxo, a classe da qual faz parte o TZ (fenotiazinas) bloqueia a ligação de cálcio a proteínas que estão envolvidas na energização das células, sendo também sugerido que possa atuar ao nível da destabilização da membrana, enquanto o VER está envolvido na dissipação do gradiente de prótons (88–90). A determinação de CMI na ausência e presença de IEs é frequentemente utilizada para detecção de atividade de efluxo, visto apresentar elevada sensibilidade, combinada com simplicidade, rapidez na apresentação de resultados e custos reduzidos (58,83).

A atividade de efluxo pode ser também detetada em tempo real, através da monitorização da capacidade das células bacterianas de acumulação e extrusão de EtBr, monitorizada por fluorometria em tempo real. Este método semi-automatizado permite detetar o transporte de EtBr através da parede celular bacteriana, visto que esta molécula apresenta intensidades de fluorescência distintas consoante o meio em que se encontra; menor intensidade em meio hidrofílico (exterior da célula) e maior intensidade em meio hidrofóbico (interior da célula) (80,91). Os ensaios de fluorometria em tempo real permitem também avaliar a ação dos IE na atividade de efluxo, estudar um número de

amostras relativamente elevado, possibilitando ainda o estudo de diferentes condições num mesmo ensaio (92,93).

1.6. Objetivos da Dissertação

S. pseudintermedius é uma espécie colonizadora da pele e mucosas de animais de companhia, particularmente do cão (6–9). No entanto, esta bactéria é também um organismo patogénico oportunista, sendo o principal agente bacteriano de SSTIs no cão (12). O tratamento preconizado destas infeções consiste na combinação de terapêutica sistémica e tópica (antibióticos e biocidas) (32). A emergência de estirpes MRSP, muitas vezes associadas a um fenótipo de multirresistência, tem vindo a tornar-se um problema de saúde pública (94). Apesar disso, o papel desempenhado pelos sistemas de efluxo no desenvolvimento de fenótipos de multirresistência a diversos compostos, comumente utilizados na terapêutica de SSTIs, encontra-se ainda pouco caracterizado, principalmente para *S. pseudintermedius*.

Esta Dissertação teve como principal objetivo caracterizar a atividade de efluxo em *S. pseudintermedius* e avaliar o seu contributo na suscetibilidade reduzida ou resistência a antimicrobianos, nomeadamente biocidas e fluoroquinolonas. Para tal, estudou-se uma coleção de 155 *S. pseudintermedius*, isolados de SSTIs em animais de companhia com os seguintes objetivos específicos: (i) avaliar a suscetibilidade de três substratos de bombas de efluxo, EtBr, TPP e CIP, por determinação de CMIs; (ii) analisar as distribuições de CMIs e estimar valores de *Cut-off* e presença de populações *non wild-type* para os substratos EtBr e TPP; (iii) avaliar a presença de atividade de efluxo aumentada por re-determinação de CMIs na presença de inibidores de efluxo e por fluorometria em tempo real, na ausência/presença de glucose e/ou inibidores de efluxo; (iv) análise do nível de expressão do gene *norA* em estirpes de interesse por RT-qPCR e por fim, (v) pesquisa de mutações nas zonas QRDR associadas à resistência às fluoroquinolonas.

Este trabalho deverá permitir ter um conhecimento mais aprofundado do efluxo em *S. pseudintermedius*, incluindo a sua relação com a expressão do gene *norA*, bem como da sua relevância na resistência a antimicrobianos, particularmente biocidas, em estirpes de *S. pseudintermedius* associadas a SSTI em animais de companhia.

2. Materiais e Métodos

2.1. Materiais

2.1.1. Estirpes bacterianas

Foi estudada uma coleção de 155 estirpes de *S. pseudintermedius* associadas a SSTIs em animais de companhia (cão, gato e coelho), facultada pela Professora Doutora Constança Pomba (Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade de Lisboa), no âmbito do projeto BIOSAFE (Ref. LISBOA-01-0145-FEDER-030713, PTDC/CAL-EST/30713/2017). Estas estirpes clínicas foram recolhidas entre 2014 e 2018, no Laboratório de Resistência aos Antibióticos da Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade de Lisboa e num laboratório de diagnóstico molecular veterinário privado na área de Lisboa. A informação relativa a cada estirpe é apresentada em anexo (Tabela A 1).

Também foi utilizada ao longo desta Dissertação a estirpe de referência *S. pseudintermedius* DSM21284^T, que serviu como controlo nos diferentes ensaios efetuados.

2.1.2. Outro material biológico

Ao longo do trabalho foram utilizados os seguintes marcadores de peso molecular: Gene Ruler 1 kb DNA Ladder (Thermo Fisher Scientific Inc, Waltham, MA, EUA) e 100 bp DNA Ladder (Thermo Fisher Scientific Inc). Estes marcadores foram usados na análise de produtos de PCR por eletroforese em gel de agarose.

2.1.3. Meios de cultura, enzimas e soluções

Os meios de cultura e soluções utilizadas ao longo deste trabalho foram preparados com água desmineralizada e esterilizados por autoclavagem a 121 °C durante 15 minutos. Na Tabela 6 encontram-se descritas a composição e/ou modo de preparação dos meios de cultura.

Tabela 6. Composição dos meios de cultura utilizados.

| Meio de cultura ¹ | Composição (por litro) |
|---------------------------------|--|
| Tryptone Soya Broth (TSB) | 17 g de caseína pancreática digerida; 3 g de soja enzimática digerida (contém papaína); 5 g de NaCl; 2,5 g de hidrogenofosfato dipotássico; 2,5 g de glucose; pH 7,3 ± 0,2 @ 25 °C |
| Tryptone Soya Agar (TSA) | 15 g de caseína pancreática digerida; 5 g de soja enzimática digerida (contém papaína); 5 g de NaCl; 15 g de agar; pH 7,3 ± 0,2 @ 25 °C |
| Mueller- Hinton Broth (MHB) | 300 g de infusão desidratada de carne; 17,5 g de caseína hidrolisada; 1,5 g de amido; pH 7.3 ± 0.1 @ 25°C |
| MHB ajustado a cátions (CA-MHB) | Meio MHB ajustado à concentração final de 25 mg/L (Ca ²⁺) e 12,5 mg/L (Mg ²⁺) |

¹ Oxoid, Fisher Scientific Company, Hampshire, Reino Unido

Na Tabela 7 encontra-se descrita a origem e composição das soluções *stock* e de trabalho de cada enzima usada ao longo do trabalho.

Tabela 7. Enzimas utilizadas.

| Enzima | Composição da solução <i>stock</i> e de trabalho |
|---|---|
| Lisostafina ¹ | 15 mg/mL em água ultrapura tipo I estéril Diluição 1:10 em água ultra-pura tipo I estéril Mantida em alíquotas a -20 °C |
| Lisozima <i>RNase-free</i> ¹ | 100 mg/mL em água <i>RNase-free</i> Mantida em alíquotas a -20 °C |
| NZY Taq II DNA polimerase ² | Solução 5 U/μL Mantida a -20 °C |
| <i>RNase-free</i> DNase I ³ | Solução 1500 Kunitz <i>stock</i> Mantida a -20 °C |

¹ Sigma-Aldrich, Missouri, EUA; ² NZYTech, Lisboa, Portugal; ³QIAGEN, Hilden, Alemanha

Na Tabela 8 estão descritas as soluções usadas ao longo do trabalho, assim como a sua composição e preparação. As soluções e água livres de RNases (*RNase-free*) foram preparadas por tratamento com DEPC (Sigma-Aldrich) a 0,1% (p/v) durante, pelo menos, 12 horas a 37 °C. O DEPC foi posteriormente inativado durante o processo de esterilização por autoclavagem a 121 °C durante 15 minutos.

Tabela 8. Soluções e tampões utilizados, com respectivas composições.

| Solução | Composição |
|--|---|
| TAE 50X | 2 M Tris Base ¹ , 50 mM EDTA ² , pH ajustado 8,0 com ácido acético ³ Solução de trabalho: TAE 1X (diluição em água desmineralizada) |
| TBE 10X ¹ | 1 M Tris Base, 1 M ácido bórico, 20 Mm EDTA, pH 8,3 Solução de trabalho: TBE 0,5X (diluição em água desmineralizada) |
| Tampão fosfato salino (PBS) ² | 0,01 M Tampão fosfato, 0,0027 M Cloreto de potássio, 0,137 M Cloreto de sódio, pH 7,4 Dissolução de uma pastilha em 200 mL de água desmineralizada |
| D- (+) -Glucose ² | 20 % (p/v) em água desmineralizada estéril Mantida a 4 °C |
| NaOH <i>RNase-free</i> ⁴ | 10 M NaOH |
| EDTA <i>RNase-free</i> | 0,5 M EDTA ² , pH 8,0 |
| TE 1X <i>RNase-free</i> | 0,01 M Tris Base ¹ , 1 mM EDTA ² , pH 8,0 |
| Etanol a 75% <i>RNase-free</i> | Diluição de etanol ⁵ a 75% (v/v) em água RNase-free |

¹ NZYTech; ²Sigma-Aldrich; ³ Riedel-de Haën, Seeize, Alemanha; ⁴ Merck, Darmstadt, Alemanha; ⁵ QIAGEN.

No decurso do trabalho foram usadas soluções de vários compostos, as quais se se encontram discriminadas na Tabela 9.

Tabela 9. Soluções de compostos utilizadas.

| Solução | Composição |
|--|--|
| Brometo de etídio (EtBr) ¹ | 10 mg/mL em água bidestilada estéril Mantida a 4 °C |
| Brometo de tetrafenilfosfónio (TPP) ¹ | 20 mg/mL em água bidestilada estéril Mantida a -20 °C |
| Ciprofloxacina (CIP) ² | 15 mg/mL em água bidestilada estéril Mantida a -20 °C |
| Verapamil (VER) ¹ | 60 mg/mL em água bidestilada estéril Mantida a -20 °C |
| Cloridrato de tioridazina (TZ) ¹ | 25 mg/mL em água bidestilada estéril Mantida a -20 °C |

¹ Sigma-Aldrich; ² Fischer scientific, New Hampshire, EUA.

2.2. Métodos

2.2.1. Determinação de concentração mínima inibitória (CMI) pelo método de microdiluição

A determinação da CMI é habitualmente determinada para avaliar a suscetibilidade de microrganismos a compostos antimicrobianos (95).

A determinação da CMI foi efetuada para três compostos: brometo de etídio (EtBr), brometo de tetrafenilfosfónio (TPP) e ciprofloxacina (CIP), segundo o método da microdiluição (96). Foram usadas gamas de concentração distintas para cada composto em estudo: 32 mg/L a 0,0625 mg/L (EtBr), 256 mg/L a 0,5 mg/L (TPP) e duas gamas distintas para a CIP, de 128 mg/L a 0,25 mg/L e de 4 mg/L a 0,007 mg/L. As estirpes em estudo foram inoculadas em 5 mL de meio MHB, e incubadas durante a noite, sob agitação, a 37 °C (Thermo scientific MAXQ 4000). A partir destas culturas, foram preparadas suspensões celulares, numa diluição 1:1000, em meio CA-MHB.

Foram preparadas placas de 96 poços, distribuindo 100 µL de meio CA-MHB em cada poço, da coluna 2 até à coluna 12, excetuando a coluna 1, onde foi distribuído 200 µL de meio (controlo de esterilidade) (Figura 3). A cada poço da coluna 2, foi adicionado 100 µL das soluções EtBr, TPP e CIP, contendo cada solução uma concentração 4 vezes superior à máxima testada. Posteriormente, foram efetuadas diluições seriadas (1:2), transferindo-se 100 µL dos poços da coluna 2 até à coluna 11, de forma sucessiva, sendo os últimos 100 µL descartados. De seguida, a cada poço da placa, excetuando os poços da coluna 1, foram adicionados 100 µL da suspensão celular previamente preparada.

Em todas as placas efetuou-se um controlo de esterilidade e um controlo de crescimento para cada estirpe em estudo, como mencionado na Figura 3. As placas foram incubadas a 37 °C durante 18-20h. Após a incubação, os valores de CMI foram registados, correspondendo à concentração mais baixa de composto capaz de inibir crescimento bacteriano visível. Os ensaios foram realizados em duplicado, e em caso de dúvida, em triplicado.

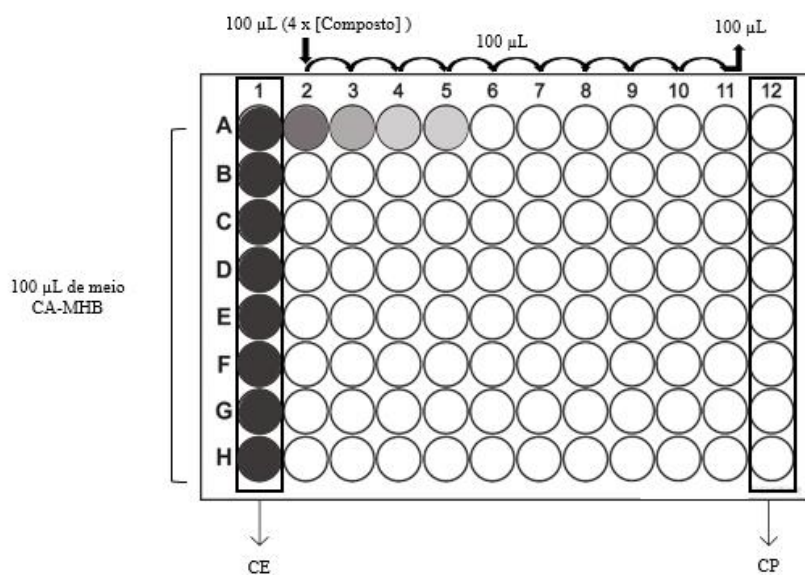


Figura 3. Esquema de preparação de placa de 96 poços para determinação de CMI pelo método de microdiluição. CE: controle de esterilidade; CP: controle positivo

O efeito da presença de IEs foi avaliado na determinação de CMI nos três compostos (EtBr, TPP e CIP), utilizando dois inibidores: tioridazina (TZ) e verapamil (VER), a 12,5 mg/L e 400 mg/L, respectivamente. Estas concentrações correspondem a concentrações sub-inibitórias, nomeadamente a $1/2$ da CMI de cada inibidor, previamente determinadas (97,98).

A determinação de CMI na presença de IEs, foi preparada de modo semelhante ao esquema apresentado na Figura 3, exceto na adição de 90 µL de CA-MHB nos poços 2 até 11. Posteriormente, após a distribuição seriada das soluções dos compostos a analisar, adicionou-se 10 µL do inibidor. Por fim, adicionou-se a suspensão celular, tal como descrito acima.

Estes ensaios incluíram também a (re)determinação da CMI dos compostos em estudo, na ausência de inibidores (Figura 4).

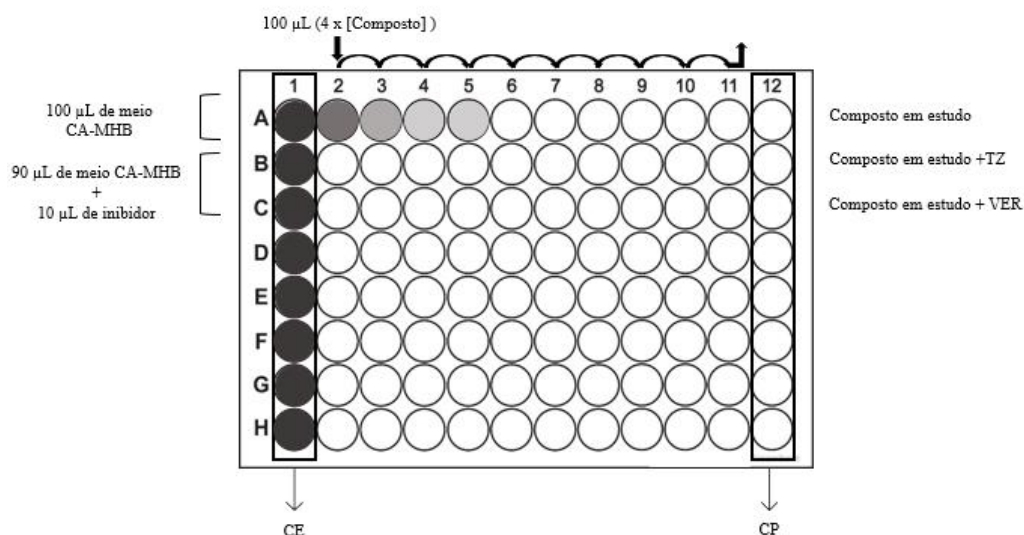


Figura 4. Esquema de preparação de placa de 96 poços para determinação de CMI, na presença de inibidores, pelo método de microdiluição.

CE: controlo de esterilidade; CP: controlo positivo.

2.2.2. Determinação de valores de *Cut-off* de biocidas

O termo ECOFF refere-se ao valor epidemiológico de *cut-off* (do inglês, *epidemiological cut-off values*), que permite distinguir os microrganismos entre si, consoante a expressão fenotípica detetável de mecanismos de resistência adquiridos para um determinado composto. Segundo esta premissa, o valor de ECOFF diferencia os microrganismos *wild type* (WT) (sem mecanismos de resistência adquiridos) de microrganismos *non-wild type* (NWT) (apresentam expressão fenotípica de mecanismos de resistência adquiridos) (99). O valor de ECOFF permite assim detetar a emergência de estirpes com suscetibilidade reduzida para determinado antimicrobiano (100).

Os valores de ECOFF podem ser determinados a partir dos valores de CMI, através do Método Estatístico Iterativo, disponibilizado pela EUCAST, utilizando o programa ECOFFinder (101). O Método Estatístico Iterativo consiste num ajuste da distribuição log-normal de valores de CMI cumulativos, utilizando uma regressão não linear. O valor de ECOFF é determinado após a estimativa da distribuição de CMIs da população WT, que corresponde ao valor mais elevado de CMI apresentado por esta (101). Estes valores são estabelecidos por entidades como a EUCAST e a *Clinical Laboratory Standards Institute* (CLSI) através da agregação e validação de dados provenientes de grupos de trabalho independentes (pelo menos cinco grupos

independentes, contendo um mínimo de 15 isolados *wild type* em cada coleção, para um total de pelo menos 100 isolados *wild type* (102).

Nesta Dissertação, dado que se analisou apenas uma coleção de estirpes, os valores calculados foram designados por valores de *cut-off* (CO_{WT}) (102). Estes foram determinados utilizando o programa ECOFFinder através da análise da distribuição dos valores de CMI_{EiBr} e CMI_{TPP}, e validados quando associados a distribuições normalizadas com um desvio padrão $\leq 1 \log_2$ CMI. Para este trabalho apenas foi considerado o valor de CO_{WT} a 99%. A utilização desta percentagem é preconizada pela EUCAST, e pressupõe que idealmente, 99% da população é *wild type* para um dado antimicrobiano (102).

2.2.3. Detecção da atividade de efluxo por fluorometria em tempo real

O método de fluorometria em tempo real permite detetar a atividade de efluxo, através da monitorização da acumulação e extrusão do EtBr, dado que o EtBr apresenta diferentes intensidades de fluorescência consoante o meio em que se encontra: menor fluorescência em meio aquoso (exterior da célula) (80,93) e maior fluorescência em meio hidrofóbico (interior da célula) .

De forma a detetar a atividade de efluxo, realizaram-se ensaios de acumulação de EtBr, na presença de concentrações crescentes deste composto, na ausência e presença de glucose a 0,4 %, utilizada como fonte de energia dos sistemas de efluxo, que ao ser metabolizada gera protões que contribuem para a força motriz protónica utilizada para efetuar a extrusão de compostos antimicrobianos.

Para o ensaio de acumulação inoculou-se a estirpe em estudo em 5 mL de TSB, com agitação 180 rpm e 37 °C durante a noite. Posteriormente, transferiram-se 50 µL da cultura para 10 mL de meio TSB (diluição 1:200), e incubou-se a 37 °C e 180 rpm até uma densidade ótica a 600 nm (DO₆₀₀) de 0,6 (Ultrospec 10 Cell Density Meter, Biochrom). Neste ponto de crescimento, transferiu-se o volume total da cultura para um tubo estéril de 15 mL, e recolheram-se as células por centrifugação a 8.000 rpm (6797 x g, SIGMA P-16K) durante 5 minutos. O sedimento bacteriano foi lavado duas vezes com 10 mL de PBS, e ressuspenso em PBS até se obter uma DO₆₀₀= 0,6. De seguida, prepararam-se tubos de 0,2 mL com: (i) 50 µL de PBS, (ii) 50 µL de PBS + glucose a

0,8%; (iii) 50 µL de soluções de EtBr 2X concentradas (concentrações finais: 0; 0,125; 0,25; 0,5; 1; 2 e 3 mg/L) a partir de soluções na ausência e na presença de glucose a 0,8%. Posteriormente, adicionou-se 50 µL da suspensão celular ($DO_{600}=0,6$) a cada tubo de 0,2 mL, perfazendo um volume final de 100 µL (DO_{600} final de 0,3). Por fim, os tubos foram colocados num aparelho Rotor-gene 3000TM (Corbett Research), sendo a fluorescência emitida pelo EtBr lida, nos canais 530/580 nm, no final de cada ciclo de 60 segundos, durante 60 ciclos, a 37 °C.

Os ensaios de acumulação na presença de IEs foram realizados à concentração de equilíbrio de EtBr (influxo=efluxo), a qual é arbitrariamente definida por um sinal de fluorescência máximo próximo de 10% (na ausência de acumulação significativa). Os inibidores utilizados foram o TZ e VER, em concentrações sub-inibitórias 12,5 mg/L e 400 mg/L, respetivamente, equivalentes a $1/2$ da CMI (97,98). O ensaio de acumulação de EtBr com IE foi realizado de forma similar ao descrito acima, tendo-se preparado as seguintes reações nos tubos de 0,2 mL: (i) 50 µL de PBS, (ii) 50 µL de PBS + glucose a 0,8%; (iii) 50 µL de soluções de EtBr 2X (concentrações de EtBr de equilíbrio 0,25 e 0,5 mg/L), na ausência e presença de glucose a 0,8% e com e sem os IEs 2X concentrados. Nestes ensaios também se avaliou o parâmetro de *Relative final fluorescence* (RFF), que avalia a capacidade inibitória de efluxo de um determinado composto. Este parâmetro é calculado através da fluorescência adquirida no minuto 60, associada à curva de acumulação de EtBr, na ausência e presença de inibidores de efluxo (103) (Equação 1).

$$RFF = \frac{\text{Fluorescência (EtBr presença de inibidor)} - \text{Fluorescência (EtBr ausência de inibidor)}}{\text{Fluorescência (EtBr ausência de inibidor)}}$$

Equação 1. Cálculo do valor de RFF para um determinado composto (103).

2.2.4. Pesquisa de mutações que conferem resistência a fluoroquinolonas

Em estafilococos, um dos principais mecanismos de resistência a fluoroquinolonas está associado a mutações pontuais na *Quinolone Resistance Determining Region* (QRDR) dos genes *grlA* e *gyrA*, que codificam para os alvos destes antibióticos (40,104).

De forma a identificar estas mutações, as zonas QRDR dos genes *grlA* e *gyrA* foram amplificadas por PCR (Uno II, Biometra), utilizando DNAs totais (1:10) previamente extraídos (105,106). Os *primers* utilizados e respetivos amplicões encontram-se descritos na Tabela 10.

Tabela 10. Sequências de *primers* utilizados na amplificação da zona QRDR dos genes *grlA* e *gyrA* de *S. pseudintermedius* e respetivos amplicões.

| <i>Primer</i> | Sequência (5'-3') ¹ | Amplicão (pb) |
|----------------|--------------------------------|---------------|
| <i>grlA_fw</i> | CAAGAGCGTGCTTTRCCT | 292 |
| <i>grlA_rv</i> | CTGACTYAATTTCGCTTCAG | |
| <i>gyrA_fw</i> | ATGAGTGTTATYGTRTCTCGT | 261 |
| <i>gyrA_rv</i> | CATMGAACCRAAGTTACCTTG | |

¹(97,98)

As reações de PCR para ambos os genes, foram realizadas num volume final de 25 µL, contendo 1X Buffer NZY Tech, 1,75 mM MgCl₂, 0,2 mM dNTPs, 0,4 µM de cada *primer* e 0,75 U de NZY Taq II. Adicionou-se 2,5 µL de DNA total diluído (diluição 1:10). Utilizou-se como controlo positivo DNA total da estirpe DSM21284^T e como controlo da reação de PCR, água ultra-pura tipo I estéril. O programa utilizado para a amplificação dos dois genes consistiu na desnaturação a 94 °C durante 3 minutos, seguida de 35 ciclos com desnaturação a 94 °C, *annealing* a 50 °C e extensão a 72 °C durante 45 segundos, e um passo final de extensão a 72 °C durante 5 minutos.

Os produtos de amplificação foram verificados numa corrida de eletroforese em gel de agarose 1 %, com duração de 40 min, sendo visualizados num aparelho Gel-doc XR (BioRad). Os produtos de amplificação foram posteriormente purificados com o *kit* NZYGelpure, sequenciados (STAB-Vida, Caparica, Portugal) e as sequências analisadas com o programa MEGA v. 11 (107), por comparação com as sequências de *grlA* (número de acesso GenBank: AM262971.1) e *gyrA* (número de acesso GenBank: AM262968.1) da estirpe DSM21284^T, suscetível às fluoroquinolonas.

2.2.5. Análise da expressão do gene *norA*

2.2.5.1. Extração de RNA total

O RNA total extraído pelo método de tiocianato de guanidínio-fenol-clorofórmio (108).

Inoculou-se cada estirpe em estudo em 5 mL de TSB durante a noite, a 37 °C e 180 rpm. Efetuou-se uma passagem de 50 µL da cultura crescida para 10 mL de TSB (diluição 1:200). Incubou-se a cultura a 37 °C e 180 rpm, até atingir uma DO₆₀₀= 0,6. Após este ponto, transferiu-se o volume total da cultura para um tubo RNase-free e recolheram-se as células com uma centrifugação a 9.000 rpm durante 5 min (8603 x g, SIGMA P-16K). Posteriormente, adicionaram-se 2 mL de RNAprotect bacteria (QIAGEN), transferiu-se para um tubo *ependorff* de 2 mL *RNase-free* e incubou-se durante 5 min à temperatura ambiente, seguindo-se uma nova centrifugação a 13.000 rpm durante 5 minutos. Ressuspenderam-se os *pellets* em 0,25 mL de TE 1X + 10 mg/mL lisozima + 0,2 mg/mL lisostafina e incubou-se a 37 °C, durante 30 min. Após a incubação, adicionou-se 1 mL de NZYol (NZYTech), e incubou-se novamente durante 5 min à temperatura ambiente.

Posteriormente, de forma a promover a separação do RNA de outros conteúdos celulares, adicionou-se 0,2 mL de clorofórmio (Merck), agitou-se o tubo de forma vigorosa por 15 segundos e incubou-se por 2-3 min à temperatura ambiente. A separação das fases (fenol-clorofórmio, interfase e aquosa) foi realizada por centrifugação a 13.000 rpm, durante 15 min a 4 °C (SIGMA 3K18), sendo de seguida recolhida a fase aquosa, para um novo tubo RNase-free.

Com o objetivo de precipitar o RNA, adicionou-se 0,5 mL de isopropanol a 100% (*ice-cold*) (QIAGEN), e incubou-se 10 min a -20 °C. Após a incubação, centrifugou-se de novo, a 13.000 rpm durante 10 min a 4 °C, e o *pellet* foi lavado com 1 mL de etanol a 75% (RNase-free). As amostras foram submetidas a um vórtex breve e centrifugadas a 10.000 rpm durante 5 min, a 4 °C. Após centrifugação, removeram-se os sobrenadantes e deixou-se secar o *pellet* ao ar por 5-10 min.

De seguida ressuspendeu-se o *pellet* em 87,5 µL de H₂O RNase-free e adicionaram-se 10 µL de tampão RDD (QIAGEN) e 2,5 µL de RNase-free DNase I, deixando-se incubar à temperatura ambiente por 20 min.

A remoção de contaminantes da amostra de RNA total foi feita seguindo o protocolo “RNA Clean-Up” do *kit* “RNeasy Mini Kit” (QIAGEN). Brevemente, adicionaram-se 350 µL do tampão RLT, seguido da adição de 250 µL de etanol (96-100%) (J.T. Baker Chemical Company, Pensilvânia, EUA). Transferiu-se a amostra para uma coluna RNeasy Mini spin, e centrifugou-se a 13.000 rpm (Heraus Biofuge Pico) durante 30 s. De seguida, lavou-se o RNA duas vezes com 500 µL de tampão RPE e centrifugação a 13.000 rpm durante 30 s e, na segunda lavagem, durante 2 min. Colocou-se a coluna num novo tubo coletor e centrifugou-se durante 1 min para remoção do excesso de etanol. Transferiu-se a coluna para um novo tubo de 1,5 mL e eluiu-se o RNA com 50 µL de H₂O RNase-free, após a centrifugação durante 1 min a 13.000 rpm. Cada RNA total foi quantificado num aparelho NanoDrop 1000 (ThermoFisher) e mantido a -80 °C.

2.2.5.2. Quantificação relativa da expressão do gene *norA* por RT-qPCR

A expressão do gene *norA* foi avaliada utilizando o método de PCR de transcrição reversa quantitativa em tempo real (RT-qPCR) (56), recorrendo-se ao método comparativo de Ct para quantificar a expressão génica relativa de *norA* (57,69,109–111). O gene *gyrB* foi usado como gene endógeno e RNA total da estirpe DSM21284^T, como referência (Equação 2).

$$\text{Nível expressão} = 2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$$

$$\text{em que, } \Delta\Delta\text{Ct} = [(\text{Ct}_{norA} - \text{Ct}_{gyrB})_{\text{Estirpe}} - (\text{Ct}_{norA} - \text{Ct}_{gyrB})_{\text{DSM21284}^T}]$$

Equação 2. Cálculo da expressão génica relativa, segundo o método comparativo Ct (69,109).

Estes ensaios foram realizados em duplicado, recorrendo a amostras de RNA total extraídas de forma independente. Cada reação de RT-qPCR foi realizada num volume final de 20 µL, contendo 1X One-step NZY qPCR Green master mix, 400 nM de cada *primer*, NZYRT mix (0,8 µL, de acordo com o descrito pelo fabricante) e 20 ng de RNA molde. Incluiu-se, em cada corrida, o controlo da reação de RT-qPCR (H₂O) e controlos de contaminação de DNA genómico (sem NZYRT mix). O programa de amplificação

consistiu no passo de transcrição reversa a 50 °C durante 20 minutos, seguido de ativação da polimerização a 95 °C durante 10 minutos. Posteriormente, efetuou-se 35 ciclos com desnaturação a 95 °C durante 20 segundos, *annealing* a 52 °C e extensão a 72 °C, ambos com duração de 30 segundos, sendo seguido por uma extensão final a 72 °C durante 5 minutos. A cada ciclo, foi efetuada a leitura da fluorescência no canal FAM (492/517 nm), num aparelho Rotor-gene 3000TM. De forma a analisar a especificidade dos produtos amplificados, efetuou-se uma análise de *melting*, cujo programa consiste em incrementos de 1° C, de 50 a 99 °C, a cada 5 segundos, excetuando no primeiro incremento (30 segundos). Considerou-se uma sobreexpressão significativa do gene *norA* quando o nível de expressão determinado foi superior a 2 (86,111).

Na Tabela 11 encontram-se descritas as sequências de *primers* utilizadas e respetivos amplicões, na análise da expressão relativas dos genes *norA* e *gyrB* no RT-qPCR.

Tabela 11. Sequências de *primers* utilizados na análise da expressão relativa dos genes *norA* e *gyrB* de *S. pseudintermedius* por RT-qPCR e respetivos amplicões.

| <i>Primer</i> | Sequência (5'-3') | Amplicão (pb) |
|----------------|----------------------|---------------|
| <i>norA_fw</i> | GCTTTGCTGGTGGACTTAAT | 142 |
| <i>norA_rv</i> | AGGAGCCGACATAACACTA | |
| <i>gyrB_fw</i> | CGGGTTACGTGTATATTGCA | 130 |
| <i>gyrB_rv</i> | GGATGCGGTTTTACCAGATA | |

2.2.6. Análise Estatística

As possíveis relações estatísticas entre as gamas de CMI_{EtBr} ou CMI_{TPP} e o fenótipo de resistência à metilina (estirpes MRSP e MSSP) foram analisadas com o programa SPSS versão 26 para o Windows (SPSS, Inc.), usando o teste não paramétrico Mann-Whitney-Wilcoxon para amostras independentes. As diferenças foram consideradas estatisticamente significativas quando $p < 0,05$.

3. Resultados

Nesta Dissertação, estudou-se uma coleção de *S. pseudintermedius* associados a SSTIs provenientes de animais de companhia (cão, gato e coelho) com o objetivo de estudar o contributo do efluxo para a resistência a biocidas e fluoroquinolonas. A abordagem experimental seguida encontra-se esquematizada na Figura 5. Resumidamente, iniciou-se o trabalho com a análise da distribuição de valores de CMI do EtBr e TPP, os quais foram determinados para 57 estirpes que ainda não tinham estes valores determinados. Estes valores foram posteriormente agregados aos valores já existentes no laboratório onde esta Dissertação foi realizada. As diferentes etapas do trabalho foram depois efetuadas em subgrupos de estirpes representativas, conforme indicado na Figura 5.

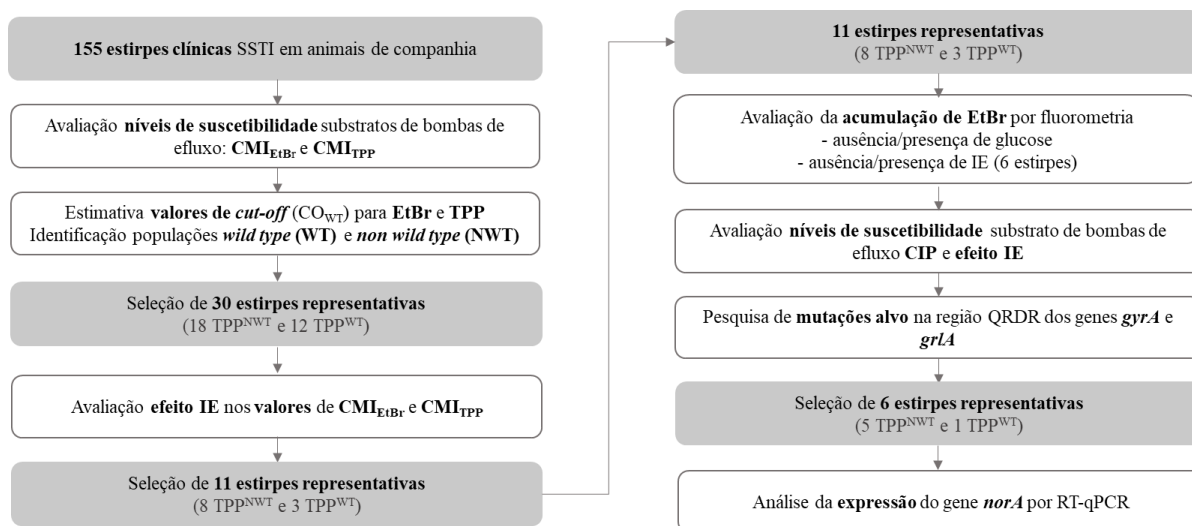


Figura 5. Esquema representativo da abordagem experimental seguida nesta Dissertação para a caracterização da atividade de efluxo em *S. pseudintermedius*.

3.1. Identificação de populações *Non wild type* de *S. pseudintermedius* para EtBr e TPP

3.1.1. Avaliação da suscetibilidade ao EtBr e TPP por determinação da concentração mínima inibitória

A suscetibilidade ao EtBr e TPP foi avaliada para uma subcoleção de 57 estirpes, que ainda não se encontrava caracterizada quanto aos valores de CMI de EtBr e TPP. A determinação destes valores foi efetuada por microdiluição (Tabela 12). A estirpe *S. pseudintermedius* DMS21284^T foi incluída como controlo.

Tabela 12. Concentrações mínimas inibitórias (CMI) de EtBr e TPP para a subcoleção de 57 de estirpes de *S. pseudintermedius* e respetivo perfil de resistência à meticilina.

| Estirpe | CMI (mg/L) | | MRSP MSSP ¹ | Estirpe | CMI (mg/L) | | MRSP MSSP ¹ |
|-----------|------------|-----|---------------------------|-----------------------|------------|-----|---------------------------|
| | EtBr | TPP | | | EtBr | TPP | |
| BIOS-V16 | 1 | 8 | MRSP | BIOS-V170 | 2 | 8 | MSSP |
| BIOS-V18 | 2 | 8 | MSSP | BIOS-V176 | 2 | 8 | MSSP |
| BIOS-V25 | 2 | 4 | MRSP | BIOS-V182 | 2 | 4 | MSSP |
| BIOS-V27 | 2 | 8 | MSSP | BIOS-V188 | 1 | 8 | MSSP |
| BIOS-V28 | 1 | 4 | MSSP | BIOS-V189 | 2 | 8 | MSSP |
| BIOS-V32 | 1 | 8 | MSSP | BIOS-V195 | 1 | 4 | MSSP |
| BIOS-V33 | 2 | 4 | MSSP | BIOS-V196 | 1 | 4 | MSSP |
| BIOS-V34 | 1 | 4 | MSSP | BIOS-V214 | 2 | 8 | MSSP |
| BIOS-V37 | 2 | 4 | MSSP | BIOS-V219 | 1 | 8 | MSSP |
| BIOS-V38 | 2 | 8 | MSSP | BIOS-V221 | 1 | 8 | MSSP |
| BIOS-V49 | 2 | 4 | MSSP | BIOS-V234 | 2 | 64 | MSSP |
| BIOS-V50 | 2 | 8 | MSSP | BIOS-V235 | 1 | 8 | MSSP |
| BIOS-V54 | 2 | 8 | MSSP | BIOS-V238 | 1 | 4 | MSSP |
| BIOS-V55 | 1 | 8 | MSSP | BIOS-V241 | 4 | 4 | MRSP |
| BIOS-V57 | 2 | 8 | MSSP | BIOS-V244 | 1 | 8 | MSSP |
| BIOS-V58 | 1 | 4 | MSSP | BIOS-V247 | 1 | 8 | MSSP |
| BIOS-V59 | 1 | 4 | MSSP | BIOS-V249 | 2 | 4 | MSSP |
| BIOS-V66 | 2 | 8 | MSSP | BIOS-V251 | 2 | 8 | MSSP |
| BIOS-V67 | 2 | 4 | MSSP | BIOS-V259 | 2 | 8 | MSSP |
| BIOS-V71 | 1 | 8 | MSSP | BIOS-V260 | 1 | 16 | MSSP |
| BIOS-V72 | 1 | 8 | MSSP | BIOS-V263 | 1 | 8 | MSSP |
| BIOS-V73 | 2 | 4 | MSSP | BIOS-V268 | 2 | 4 | MSSP |
| BIOS-V82 | 1 | 8 | MSSP | BIOS-V273 | 2 | 8 | MSSP |
| BIOS-V87 | 1 | 8 | MSSP | BIOS-V281 | 2 | 8 | MSSP |
| BIOS-V88 | 1 | 4 | MSSP | BIOS-V287 | 0,5 | 4 | MSSP |
| BIOS-V92 | 2 | 4 | MSSP | BIOS-V290 | 1 | 8 | MSSP |
| BIOS-V123 | 1 | 8 | MSSP | BIOS-V297 | 2 | 8 | MSSP |
| BIOS-V141 | 1 | 8 | MRSP | BIOS-V298 | 1 | 4 | MSSP |
| BIOS-V167 | 2 | 4 | MSSP | DSM21284 ^T | 2 | 8 | MSSP |

¹MRSP: *S. pseudintermedius* resistente à meticilina; MSSP: *S. pseudintermedius* suscetível à meticilina (105,106).

Os valores de CMI_{EtBr} e CMI_{TPP} determinados foram posteriormente agregados aos valores já existentes para as restantes estirpes da coleção de *S. pseudintermedius* (n=155) (97,98,105,106) (Figura 6).

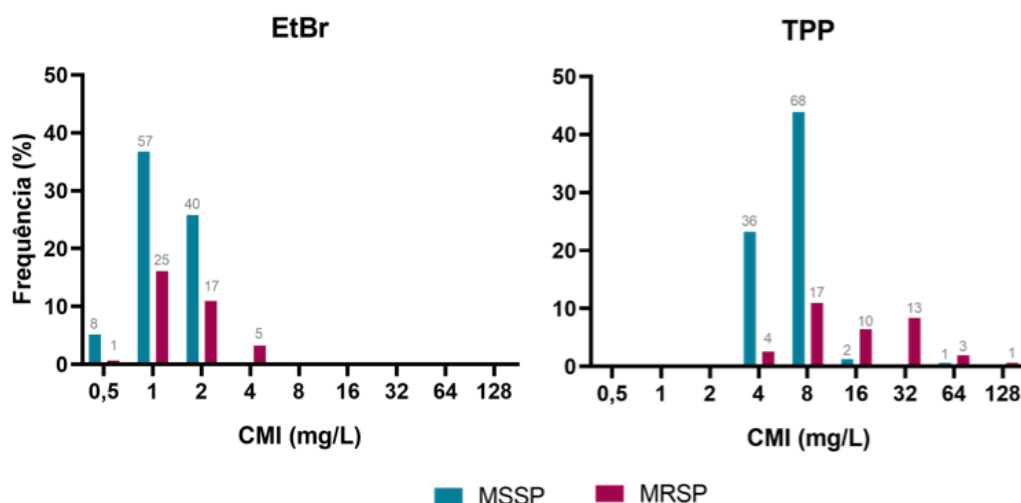


Figura 6. Distribuição das CMIs de EtBr e TPP para a coleção de *S. pseudintermedius* (n = 155) e respetivo perfil de resistência à meticilina. Os valores a cinzento correspondem ao número de estirpes. MSSP: *S. pseudintermedius* suscetível à meticilina; MRSP: *S. pseudintermedius* resistente à meticilina.

Pelos resultados apresentados na Figura 6 verifica-se que a coleção de *S. pseudintermedius* apresenta diferentes gamas de CMI para cada composto.

Para o EtBr, a gama de CMI_{EtBr} é de 0,5-4 mg/L. Considerando o perfil de resistência à meticilina, as estirpes MSSP apresentaram valores de CMI_{EtBr} entre 0,5-2 mg/L, enquanto as estirpes MRSP apresentaram uma gama mais ampla, entre 0,5-4 mg/L. No entanto, as diferenças de CMI_{EtBr} entre estirpes MRSP e MSSP não são estatisticamente significativas ($p = 0,11$).

A gama de CMI_{TPP} variou entre 4 a 128 mg/L. Analisando estes dados relativamente ao fenótipo de resistência à meticilina, verifica-se novamente que as estirpes MSSP apresentam variações de CMI menos amplas (4-64 mg/L) do que as estirpes MRSP (4-128 mg/L), sendo esta diferença estatisticamente significativa ($p < 0,01$), indicando que as estirpes MRSP estão associadas a valores de CMI_{TPP} tendencialmente mais elevados.

3.1.2. Determinação de valores de *Cut-off* e identificação de populações NWT para o EtBr e TPP

A determinação do valor *cut-off* (CO_{WT}) permite diferenciar estirpes que apresentem mecanismos de resistência adquiridos com expressão fenotípica detetável para um dado antimicrobiano, designadas estirpes *non-wild type* (NWT). Esta abordagem foi aplicada para avaliar a presença de estirpes de *S. pseudintermedius* com mecanismos de resistência ao EtBr e/ou TPP com expressão fenotípica, potencialmente associados a efluxo.

Assim, estimaram-se os valores de CO_{WT} para o EtBr e o TPP, a partir das distribuições das respectivas CMIs para os 155 *S. pseudintermedius*. Este cálculo foi realizado segundo as diretrizes da EUCAST, utilizando o programa ECOFFinder, o qual se baseia no Método Estatístico Iterativo (101). O valor de CO_{WT} corresponde ao valor mais alto de CMI apresentado pela população WT e neste caso, corresponde a 4 mg/L para o EtBr e a 16 mg/L para o TPP (Figura 7).

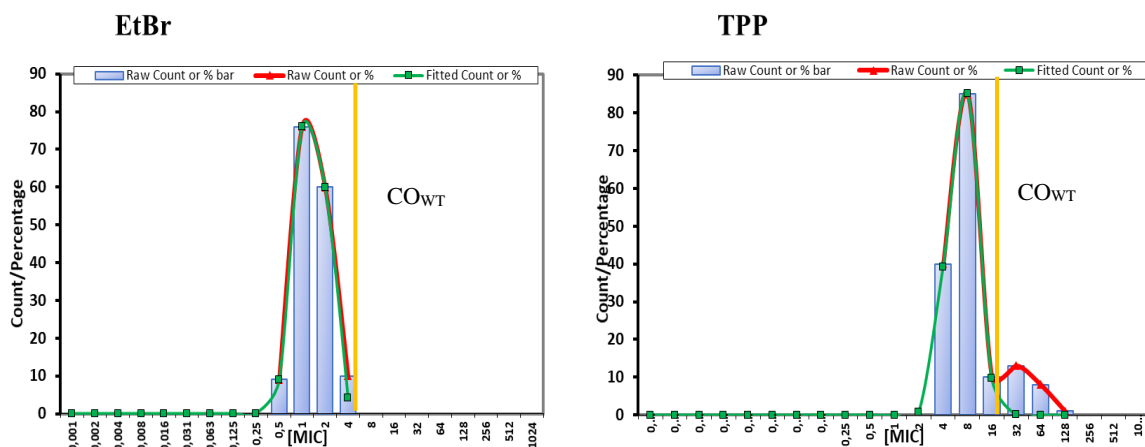


Figura 7. Distribuição de valores de CMI_{EtBr} e CMI_{TPP} e estimativa do respetivo valor de CO_{WT} . A linha amarela identifica o valor de CO_{WT} determinado neste trabalho para cada composto. A linha vermelha representa a distribuição dos valores de CMI na população total, enquanto a linha verde identifica a população WT estimada pelo método estatístico iterativo.

Considerando os valores de CO_{WT} determinados para o EtBr e o TPP identificou-se uma população NWT apenas para o TPP (com valor de CMI > CO_{WT}), como se resume na Tabela 13.

Tabela 13. Valores de CO_{WT} , desvio padrão e estirpes NWT para EtBr e TPP para *S. pseudintermedius*.

| Composto | Valor <i>Cut-off</i> (99%) (mg/L) | Desvio padrão (SD < 1 log ₂ CMI) | Estirpes NWT |
|----------|--------------------------------------|--|---|
| EtBr | 4 | 0,56 | - |
| TPP | 16 | 0,52 | V40, V52, V53, V64, V83, V99, V104, V108, V125, V131, V143, V144, V146, V207, V223, V234, V262, V299. |

De acordo com estes dados, foi possível diferenciar uma população NWT para o TPP (TPP^{NWT}, CMI > 16 mg/L), constituída por 18 estirpes, das quais 94,4% (17/18) com fenótipo MRSP, sendo ainda MDR. Estes resultados indicam assim, a potencial presença de mecanismos de resistência ao TPP, como o efluxo, nestas 18 estirpes.

3.2. Detecção e caracterização da atividade de efluxo

3.2.1. Efeito dos inibidores de efluxo nas CMI_{EtBr} e CMI_{TPP}

O efeito dos IES, TZ e VER, na CMI de EtBr e TPP foi avaliado num conjunto de 30 estirpes, para além da estirpe de referência DSM21284^T (Tabela 14). Este conjunto de 30 estirpes inclui as 18 estirpes TPP^{NWT} identificadas bem como 12 estirpes pertencentes à população TPP^{WT} (CMI_{TPP} ≤ 16 mg/L). A presença de atividade de efluxo aumentada numa dada estirpe é indicada quando um IE promove uma redução na CMI de um composto para, pelo menos, um quarto do valor da CMI original (83,86).

Resultados

Tabela 14. Efeito dos inibidores de efluxo TZ e VER nos valores de CMI de TPP e EtBr.

Os valores a negrito indicam uma redução de CMI na presença de IE para, pelo menos, um quarto do valor original.

| Estirpes | Características ¹ | CMI (mg/L) | | | CMI (mg/L) | | |
|--------------------------|------------------------------|------------|-----|------|------------|--------|--------|
| | | TPP | +TZ | +VER | EtBr | +TZ | +VER |
| Referência | | | | | | | |
| DSM21284 ^T | MSSP-MDR | 8 | 4 | 2 | 1 | < 0,06 | < 0,06 |
| TPP^{WT} | | | | | | | |
| BIOS-V15 | MSSP-MDR | 8 | 4 | 2 | 1 | < 0,06 | < 0,06 |
| BIOS-V37 | MSSP | 8 | 1 | 1 | 2 | < 0,06 | < 0,06 |
| BIOS-V68 | MSSP-MDR | 8 | 1 | 1 | 1 | < 0,06 | < 0,06 |
| BIOS-V120 | MSSP | 4 | 2 | 1 | 1 | < 0,06 | < 0,06 |
| BIOS-V136 | MSSP-MDR | 4 | 2 | 1 | 1 | 0,125 | < 0,06 |
| BIOS-V221 | MSSP | 4 | 2 | 1 | 1 | < 0,06 | < 0,06 |
| BIOS-V239 | MSSP | 8 | 4 | 4 | 1 | < 0,06 | < 0,06 |
| BIOS-V264 | MRSP-MDR | 16 | 4 | 2 | 2 | 0,5 | 0,125 |
| BIOS-V268 | MSSP-MDR | 4 | 1 | 2 | 1 | < 0,06 | < 0,06 |
| BIOS-V276 | MRSP-MDR | 16 | 4 | 1 | 2 | 0,125 | < 0,06 |
| BIOS-V280 | MRSP-MDR | 16 | 8 | 4 | 2 | 0,25 | < 0,06 |
| BIOS-V302 | MRSP-MDR | 16 | 8 | 2 | 4 | 0,5 | 0,125 |
| TPP^{NWT} | | | | | | | |
| BIOS-V40 | MRSP-MDR | 32 | 16 | 4 | 2 | 0,5 | 0,125 |
| BIOS-V52 | MRSP-MDR | 32 | 8 | 4 | 2 | 0,5 | 0,125 |
| BIOS-V53 | MRSP-MDR | 32 | 8 | 4 | 1 | 0,5 | < 0,06 |
| BIOS-V64 | MRSP-MDR | 32 | 8 | 4 | 1 | 0,5 | < 0,06 |
| BIOS-V83 | MRSP-MDR | 64 | 16 | 4 | 1 | 0,5 | < 0,06 |
| BIOS-V99 | MRSP-MDR | 32 | 8 | 4 | 1 | 0,25 | < 0,06 |
| BIOS-V104 | MRSP-MDR | 32 | 4 | 1 | 1 | 0,125 | < 0,06 |
| BIOS-V108 | MRSP-MDR | 32 | 4 | 4 | 2 | 0,5 | < 0,06 |
| BIOS-V125 | MRSP-MDR | 32 | 8 | 4 | 2 | 1 | < 0,06 |
| BIOS-V131 | MRSP-MDR | 32 | 8 | 4 | 2 | 0,125 | < 0,06 |
| BIOS-V143 | MRSP-MDR | 64 | 8 | 8 | 2 | 0,5 | 0,125 |
| BIOS-V144 | MRSP-MDR | 32 | 8 | 8 | 2 | 0,25 | 0,125 |
| BIOS-V146 | MRSP-MDR | 64 | 8 | 4 | 1 | 0,5 | 0,125 |
| BIOS-V207 | MRSP-MDR | 32 | 8 | 4 | 2 | 0,125 | 0,125 |
| BIOS-V223 | MRSP-MDR | 32 | 8 | 4 | 2 | 0,25 | < 0,06 |
| BIOS-V234 | MSSP | 64 | 16 | 8 | 2 | 0,5 | 0,125 |
| BIOS-V262 | MRSP-MDR | 128 | 16 | 8 | 4 | 0,5 | 0,125 |
| BIOS-V299 | MRSP-MDR | 32 | 8 | 4 | 1 | 0,5 | 0,125 |

Os IEs foram usados a uma concentração sub-inibitória, 12,5 e 400 mg/L, respetivamente.

¹(105,106);TZ: Tioridazina; VER: Verapamil; WT: *Wild type*; NWT: *Non wild type*.

Verifica-se que os dois inibidores TZ e VER diminuem as CMI, quer do TPP quer do EtBr, promovendo reduções na ordem de 2 até 32 vezes dos valores das CMI originais. No entanto, o verapamil apresenta um efeito superior ao da TZ, particularmente nas CMI_{EtBr} e CMI_{TPP} da população TPP^{NWT} (Figura 8). Para o EtBr, verificou-se que todas as estirpes TPP^{WT} (n=12) apresentavam diminuições significativas ($\geq 4x$) na presença dos IEs. Na população TPP^{NWT} , o VER promoveu uma redução significativa da CMI_{EtBr} para todas as estirpes (n=18), enquanto o TZ apenas promoveu esse efeito em 12 estirpes. Para o TPP, o efeito inibitório significativo foi observado para 5/12 e 11/12 estirpes TPP^{WT} na presença do TZ e VER, respetivamente. Já para estirpes TPP^{NWT} , verificou-se um efeito significativo para todas as estirpes, exceto uma, na presença de TZ. Para além disso, ambos os IEs reduziram as CMI_{TPP} da população NWT para valores apresentados pela população WT (Figura 8).

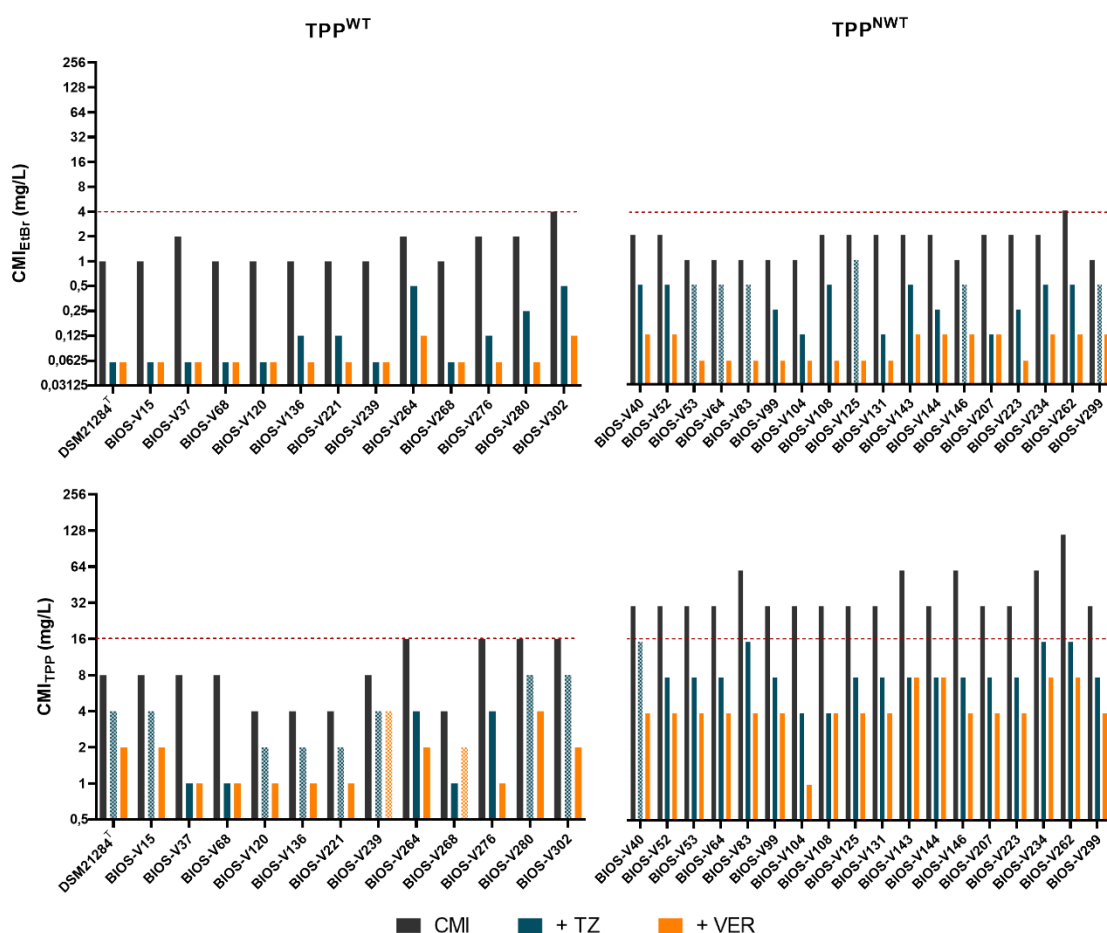


Figura 8. Efeito dos inibidores de efluxo TZ e VER na CMI_{EtBr} e CMI_{TPP} na população TPP^{WT} e TPP^{NWT} .

As barras preenchidas indicam reduções de CMI significativas, na presença de IEs. A tracejado está indicado o valor de CO_{WT} .

3.2.2. Detecção e análise da atividade de efluxo por fluorometria em tempo real

A deteção da atividade de efluxo por fluorometria em tempo real foi efetuada recorrendo ao ensaio de acumulação de EtBr, na presença de concentrações crescentes deste composto. Estes ensaios foram também conduzidos na ausência e presença de glucose 0,4%, como fonte de energia dos sistemas de efluxo.

Estes ensaios foram realizados para um grupo mais restrito de estirpes clínicas, representativa da coleção (n =11) e para a estirpe referência DSM21284^T (Figura 9). As estirpes clínicas selecionadas correspondem a oito estirpes TPP^{NWT} e três TPP^{WT}, com base no maior valor de CMI inicial, no maior efeito inibitório dos IEs, características genótípicas (linhagem clonal, tipo de *agr*) e fenotípicas (MRSP/MSSP e resistência às fluoroquinolonas) (105,106).

Uma vez que esta abordagem nunca tinha sido aplicada em *S. pseudintermedius*, numa primeira fase do trabalho otimizaram-se as condições experimentais, utilizando a estirpe de referência DSM21284^T. Na ausência de glucose, verifica-se que esta estirpe acumula EtBr (aumento do sinal de fluorescência) de modo proporcional à concentração de EtBr, atingindo cerca de 100% de fluorescência com a concentração de EtBr mais elevada (3 mg/L). Na presença de glucose, verifica-se uma tendência para aumento da acumulação de EtBr, uma vez que a partir de 1 mg/L de EtBr já se verifica maior acumulação de fluorescência, chegando a observar-se saturação de sinal de fluorescência a 3 mg/L (Figura 9). As estirpes TPP^{WT} (BIOS-V37, BIOS-V268 e BIOS-V276) apresentaram um perfil de acumulação de EtBr similar à estirpe DSM21284^T, indicando que não deverão apresentar atividade de efluxo aumentada, quando comparadas com a estirpe de referência.

O comportamento das estirpes TPP^{NWT} foi heterogéneo, subdividindo-se em três subgrupos/padrões. Num primeiro subgrupo, constituído pelas estirpes BIOS-V83, BIOS-V223 e BIOS-V146, na ausência de glucose verifica-se uma acumulação de EtBr ligeiramente inferior face à estirpe DSM21284^T e estirpes TPP^{WT}. O mesmo se verifica com a adição de glucose, com menor acumulação nas concentrações mais elevadas de EtBr, 2 e 3 mg/L (Figura 9). O segundo subgrupo (estirpes BIOS-V104, BIOS-V143 e BIOS-V234) demonstra uma acumulação de EtBr reduzida na ausência de glucose, atingindo níveis de fluorescência que correspondem a cerca de metade dos apresentados

por DSM21284^T. Com a adição de glucose, a fluorescência diminui ligeiramente (Figura 9). Por último, o subgrupo 3, formado pelas estirpes BIOS-V99 e BIOS-V262, apresentou níveis de acumulação semelhantes ao do subgrupo 1 e estirpes TPP^{WT} na ausência de glucose. Contudo, ao adicionar-se glucose, verifica-se uma diminuição acentuada da fluorescência, ou seja, de acumulação de EtBr.

Uma vez que menores níveis de acumulação de EtBr deverão corresponder a maior efluxo desta molécula, verifica-se assim que todas as estirpes TPP^{NWT} apresentam uma atividade de efluxo superior ao das estirpes TPP^{WT} e DSM21284^T, sendo esta maior atividade de efluxo mais notória nos dois últimos dois subgrupos de estirpes TPP^{NWT}. Verifica-se ainda que para estas estirpes TPP^{NWT}, esta atividade de efluxo aumenta na presença de glucose, ao contrário do que se verifica para as estirpes TPP^{WT} e DSM21284^T, em que a presença da fonte de energia promove o aumento da acumulação de EtBr.

Resultados

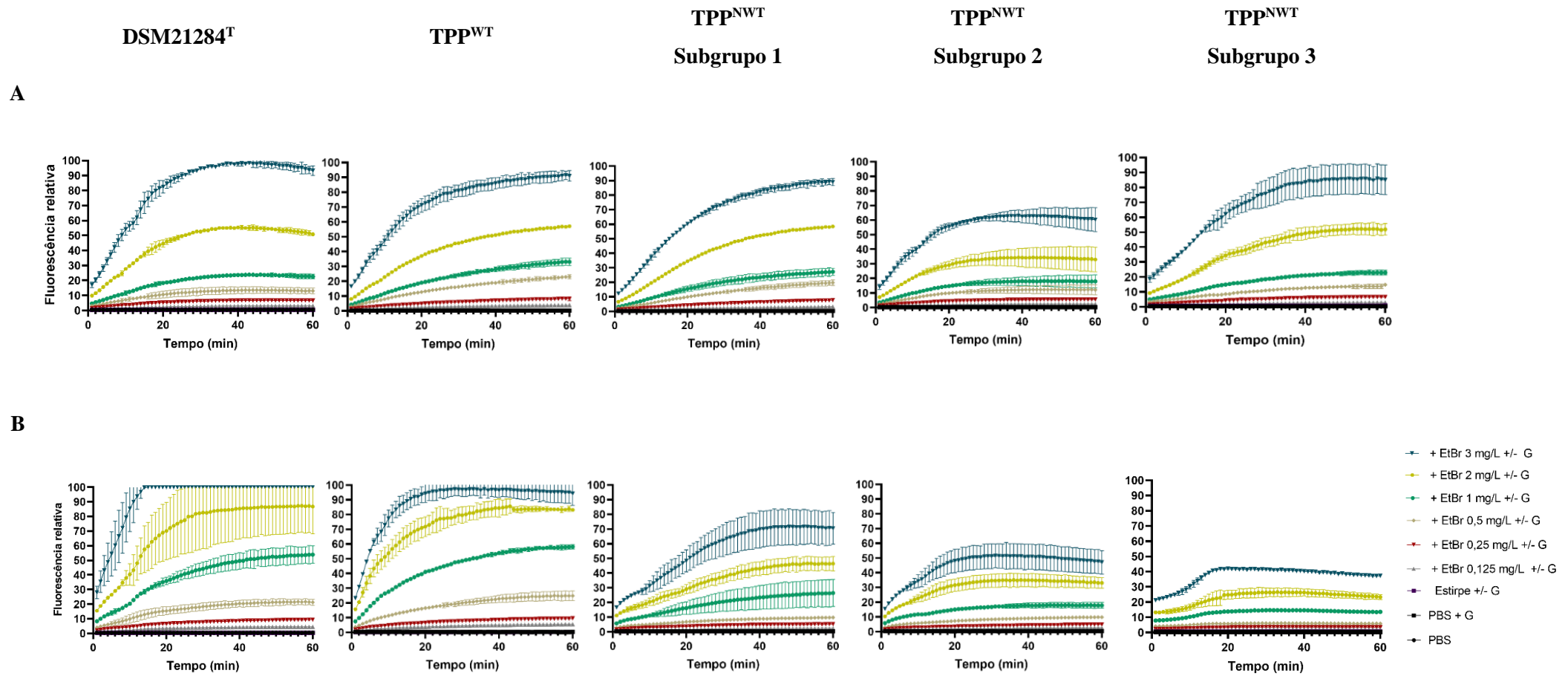


Figura 9. Ensaio fluorométrico de acumulação na presença de concentrações crescentes de EtBr de *S. pseudintermedius*, (A) na ausência e (B) presença de glicose 0,4 % (G).

Para as estirpes TPP^{NWT} e TPP^{WT} são apresentadas estirpes representativas de cada subgrupo (TPP^{WT}: BIOS-V37; TPP^{NWT} Subgrupo 1: BIOS-V83; TPP^{NWT} Subgrupo 2: BIOS-V143; TPP^{NWT} Subgrupo 3: BIOS-V262).

Os ensaios correspondem à média e desvio padrão de 2-3 ensaios.

A detecção de atividade de efluxo por fluorometria em tempo real também foi avaliada na presença/ausência de IEs conjuntamente com a presença/ausência de glicose para um conjunto de seis estirpes clínicas, nomeadamente as cinco estirpes TPP^{NWT} dos subgrupos 2 e 3 e uma estirpe TPP^{WT}, assim como a estirpe DSM21284^T (Figura 10). Estes ensaios foram realizados à concentração de EtBr de equilíbrio, correspondente à concentração à qual se verifica um equilíbrio entre o influxo e efluxo de EtBr. Da análise da Figura 9, verifica-se que esta concentração corresponde a diferentes valores consoante o grupo de estirpes analisadas. Assim, para a estirpe DSM21284^T, estirpe TPP^{WT} e estirpes TPP^{NWT} do subgrupo 3, a concentração de equilíbrio corresponde a 0,25 mg/L, enquanto para as estirpes TPP^{NWT} do subgrupo 2, a concentração de equilíbrio é de 0,5 mg/L.

O efeito dos inibidores TZ e VER foi também analisado recorrendo à determinação do valor de RFF, que avalia a capacidade inibitória de efluxo de um determinado composto, sendo um valor de RFF superior a 1 indicativo de inibição de efluxo (103) (Tabela 15).

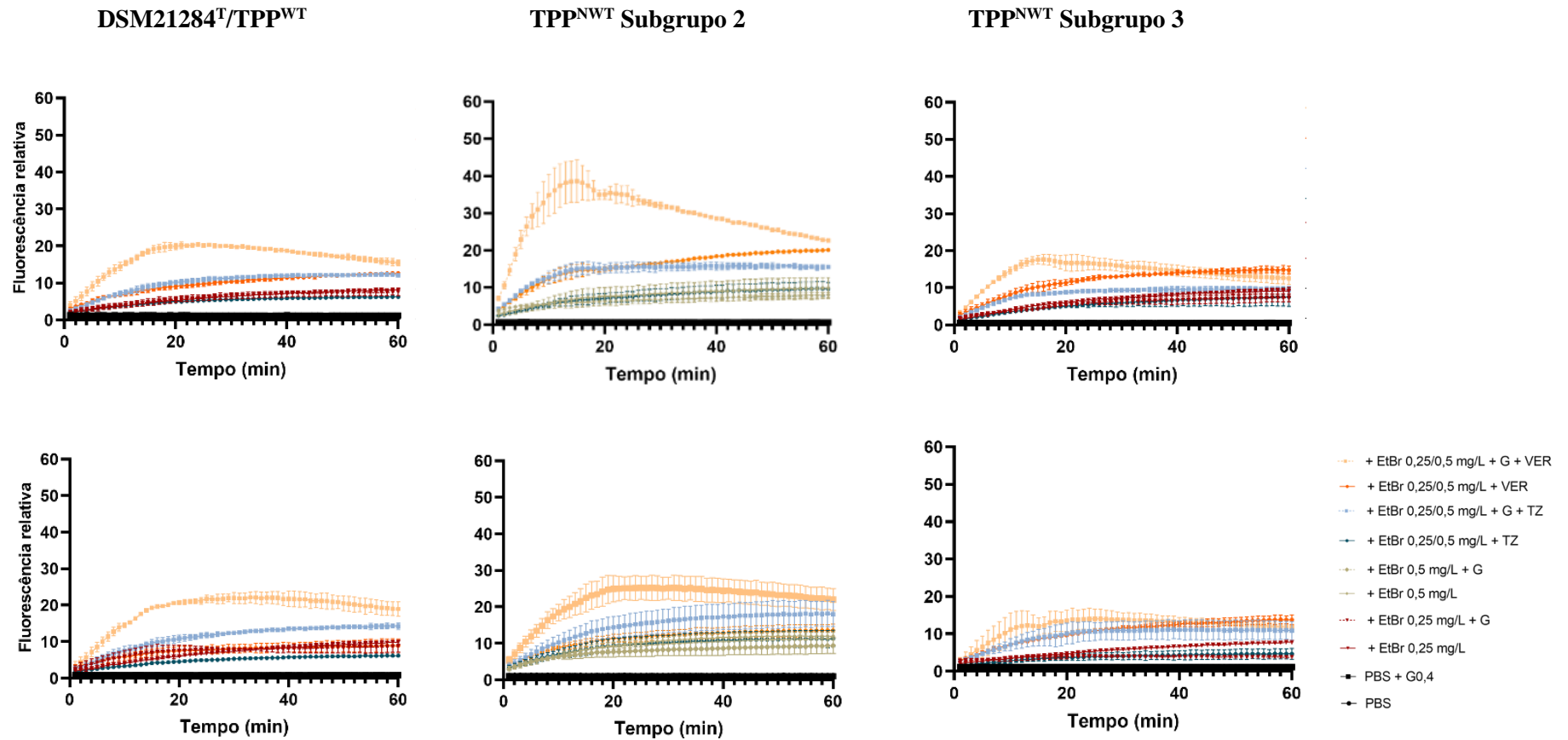


Figura 10. Ensaio de acumulação EtBr na ausência/presença de glicose 0,4 % e na ausência/presença dos inibidores TZ e VER.

Concentrações de equilíbrio de EtBr utilizadas: 0,25 mg/L (BIOS-V99, BIOS-V262, DSM21284^T, BIOS-V37) e 0,5 mg/L (BIOS-V104, BIOS-V143 e BIOS-V234). Os inibidores TZ e VER foram utilizados a concentrações sub-inibitórias (12,5 e 400 mg/L, respectivamente). Para as estirpes TPP^{NWT} e TPP^{WT} são apresentadas estirpes representativas de cada subgrupo (TPP^{WT}: BIOS-V37; TPP^{NWT} Subgrupo 2: BIOS-V104 e BIOS-V143 (respectivamente); TPP^{NWT} Subgrupo 3: BIOS-V99 e BIOS-V262 (respectivamente)). Os ensaios correspondem à média e desvio padrão de 2-3 ensaios.

Resultados

Tabela 15. Valores de RFF das estirpes TPP^{WT} e TPP^{NWT}, determinados a partir dos ensaios de acumulação de EtBr na presença de inibidores de efluxo.

Os valores de RFF são apresentados como a média \pm o desvio padrão associado a dois ou três ensaios independentes. A negrito estão representados os valores de RFF superiores a 1.

| Categoria de estirpe | Estirpe | <i>Relative final fluorescence (RFF)</i> | | | |
|----------------------------------|-----------------------|--|------------------------|------------------------|------------------------|
| | | - Glucose + TZ | + Glucose + TZ | - Glucose + VER | + Glucose + VER |
| Referência | DSM21284 ^T | -0,24 \pm 0,00 | 0,61 \pm 0,11 | 0,54 \pm 0,03 | 1,05 \pm 0,11 |
| TPP ^{WT} | BIOS-V37 | -0,37 \pm 0,02 | 0,65 \pm 0,16 | -0,09 \pm 0,14 | 1,18 \pm 0,14 |
| TPP ^{NWT} Subgrupo 2 | BIOS-V104 | 0,00 \pm 0,08 | 0,93 \pm 0,16 | 1,12 \pm 0,41 | 1,81 \pm 0,17 |
| | BIOS-V143 | -0,13 \pm 0,05 | 0,82 \pm 0,40 | 0,12 \pm 0,05 | 1,36 \pm 0,68 |
| | BIOS-V234 | -0,38 \pm 0,11 | 0,89 \pm 0,14 | -0,23 \pm 0,04 | 1,59 \pm 0,03 |
| TPP ^{NWT} Subgrupo 3 | BIOS-V99 | -0,18 \pm 0,13 | 0,30 \pm 0,09 | 0,63 \pm 0,20 | 0,76 \pm 0,33 |
| | BIOS-V262 | -0,40 \pm 0,11 | 1,80 \pm 0,30 | 0,77 \pm 0,06 | 2,07 \pm 0,04 |

WT: *Wild type*; **NWT:** *Non wild type*; **TZ:** Tioridazina; **VER:** Verapamil.

Os resultados da Figura 10 mostram que na ausência de glucose, os IE não promoveram uma maior acumulação de EtBr, observando-se fluorescência semelhantes ou inferior à da concentração de equilíbrio de EtBr, comportamento evidenciado também pelos valores de RFF < 1 (Tabela 15). Foi apenas observado um valor de RFF > 1 para a estirpe BIOS-V104 (subgrupo 2) nestas condições de ensaio. Por outro lado, na presença de glucose, os IEs promoveram o aumento da acumulação de EtBr, em concordância com o aumento generalizado dos valores de RFF, superiores a 1 (Tabela 15).

Os dois IEs apresentaram efeitos diferentes, tendo VER apresentado uma maior atividade inibitória (promovendo maior acumulação EtBr, valores de RFF mais altos), para todas as estirpes à exceção de uma. Já o TZ teve um efeito inibitório significativo apenas numa das estirpes. Este efeito foi verificado para a estirpe BIOS-V37 (TPP^{WT}) e a estirpe de referência, com valores de RFF próximos de 1 e em quatro estirpes TPP^{NWT} (BIOS-V104, BIOS-V143, BIOS-V234 e BIOS-V262), com valores de RFF superiores a 1. Estes resultados demonstram, em particular para as estirpes TPP^{NWT}, que a presença do VER inibe a atividade de efluxo aumentada.

3.2.3. Efeito da presença de inibidores de efluxo nos valores de CMI_{CIP}

Os resultados obtidos nos vários ensaios de fluorometria suportam a presença de atividade de efluxo em *S. pseudintermedius*, particularmente nas estirpes clínicas TPP^{NWT} . O conhecimento até à data sobre os sistemas de efluxo em *S. aureus* demonstra que grande parte dos sistemas de efluxo MDR cromossômicos, apresenta no seu perfil de substratos o EtBr e o TPP, assim como outros compostos antimicrobianos como antibióticos da classe das fluoroquinolonas (48,69). Assim, avaliou-se também o efeito dos IEs nos valores de CMI da ciprofloxacina para o conjunto de estirpes testadas nos ensaios de fluorometria (Tabela 16).

Dos resultados apresentados na Tabela 16 constata-se que as populações TPP^{WT} e TPP^{NWT} apresentam gamas de concentrações de CMI_{CIP} iniciais distintas. As estirpes pertencentes à população TPP^{NWT} apresentaram CMI_{CIP} iniciais de 64 mg/L (exceto a estirpe BIOS-V234), um valor bastante superior ao valor de *breakpoint* ($CMI > 1$ mg/L) (112), confirmando o fenótipo de resistência à ciprofloxacina. Por outro lado, as estirpes TPP^{WT} apresentaram gamas de CMI_{CIP} inferiores, na gama de 0,25-1 mg/L, verificando-se os fenótipos de suscetibilidade previamente estabelecidos.

Na presença dos IE, apenas algumas estirpes apresentaram uma diminuição da CMI, num fator de 2x. Isto demonstra que a redução de CMI_{CIP} inicial não é significativa, em particular, para as estirpes TPP^{NWT} . Estes resultados sugerem que o nível de resistência às fluoroquinolonas apresentado por este conjunto de estirpes deve estar associado a um mecanismo de resistência mais estável, como a presença de mutações nos genes alvo destes antibióticos.

Resultados

Tabela 16. Efeito dos IEs nas CMI_{EtBr}, CMI_{TPP} e CMI_{CIP} e mutações nos genes alvo das fluoroquinolonas no conjunto de estirpes representativas de *S. pseudintermedius* selecionadas para os ensaios de fluorimetria, assim como as respectivas características genotípicas e fenotípicas.

Os valores a negrito indicam uma redução de CMI na presença de IE para, pelo menos, um quarto do valor original.

| Categoria de estirpe | Estirpe | Características ¹⁻³ | | | | | CMI (mg/L) | | | | | Mutações | | | | |
|----------------------|---------------------------|--------------------------------|-----|-----------------|---------------------------------|-----|------------|----------|------|------------------|------------------|----------|-------|-------|------|------|
| | | MRSP/ MSSP | MDR | FQ | ST- <i>agr</i> | TPP | +TZ | +VER | EtBr | +TZ | +VER | CIP | +TZ | +VER | GrlA | GyrA |
| Referência | DSM21284 ^{T 4,5} | MSSP | MDR | FQ ^S | ST63- <i>agrIV</i> ⁶ | 8 | 4 | 2 | 1 | < 0,06 | < 0,06 | 0,125 | 0,125 | 0,125 | WT | WT |
| TPP ^{WT} | BIOS-V37 | MSSP | Não | FQ ^S | <i>agrIV</i> | 8 | 1 | 1 | 2 | < 0,06 | < 0,06 | 0,25 | 0,125 | 0,125 | WT | WT |
| | BIOS-V268 | MSSP | MDR | FQ ^S | <i>agrII</i> | 4 | 1 | 2 | 1 | < 0,06 | < 0,06 | 0,25 | 0,125 | 0,125 | WT | WT |
| | BIOS-V276 ^{4,5} | MRSP | MDR | FQ ^S | ST497- <i>agrIII</i> | 16 | 4 | 1 | 2 | 0,125 | < 0,06 | 1 | 0,5 | 0,5 | D84G | WT |
| TPP ^{NWT} | BIOS-V83 | MRSP | MDR | FQ ^R | ST71- <i>agrIII</i> | 64 | 16 | 4 | 1 | 0,5 | < 0,06 | 64 | 32 | 64 | S80I | S84L |
| | BIOS-V99 | MRSP | MDR | FQ ^R | ST71- <i>agrIII</i> | 32 | 8 | 4 | 1 | 0,25 | < 0,06 | 64 | 32 | 64 | S80I | S84L |
| | BIOS-V104 ⁵ | MRSP | MDR | FQ ^R | ST71- <i>agrIII</i> | 32 | 4 | 1 | 1 | 0,125 | < 0,06 | n.d | n.d | n.d | S80I | S84L |
| | BIOS-V143 ⁴ | MRSP | MDR | FQ ^R | ST71- <i>agrIII</i> | 64 | 8 | 8 | 2 | 0,5 | 0,125 | 64 | 32 | 32 | S80I | S84L |
| | BIOS-V146 | MRSP | MDR | FQ ^R | ST71- <i>agrIII</i> | 64 | 8 | 4 | 1 | 0,5 | 0,125 | 64 | 32 | 64 | S80I | S84L |
| | BIOS-V223 | MRSP | MDR | FQ ^R | ST71- <i>agrIII</i> | 32 | 8 | 4 | 2 | 0,5 | < 0,06 | 64 | 32 | 64 | S80I | S84L |
| | BIOS-V234 | MSSP | Não | FQ ^S | ST2194- <i>agrIII</i> | 64 | 16 | 8 | 2 | 0,5 | 0,125 | 0,25 | 0,125 | 0,125 | WT | WT |
| | BIOS-V262 | MRSP | MDR | FQ ^R | ST118- <i>agrII</i> | 128 | 16 | 8 | 4 | 0,5 | 0,125 | 64 | 32 | 64 | S80I | S84L |

MSSP: *S. pseudintermedius* suscetível à meticilina; **MRSP:** *S. pseudintermedius* resistente à meticilina; **MDR:** multirresistente; **TZ:** Tioridazina; **VER:** Verapamil; **WT:** *Wild type*; **NWT:** *Non wild type*; **FQ^S:** suscetível às fluoroquinolonas; **FQ^R:** Resistente às fluoroquinolonas; **n.d:** não determinado; **D:** Aspartato; **G:** Glicina; **S:** Serina; **I:** Isoleucina; **L:** Leucina.

¹(105,106), ²(113), ³(97,98); ⁴Os valores de CMI_{CIP} apresentados para estas estirpes foram previamente estabelecidos por Ramos, 2021 (97,98); ⁵As mutações apresentadas para estas estirpes foram previamente estabelecidas por Ramos, 2021 (97,98); ⁶(49).

3.2.4. Pesquisa de mutações que conferem resistência a fluoroquinolonas

A pesquisa de mutações nas zonas QRDR dos genes *glrA* e *gyrA* foi realizada para as 11 estirpes anteriormente analisadas, bem como para a estirpe DSM21284^T (Tabela 16).

Foram identificadas mutações na zona QRDR dos genes *glrA* e *gyrA* para as estirpes resistentes à ciprofloxacina, na sua maioria pertencentes à população TPP^{NWT} (exceto BIOS-V234), e na estirpe BIOS-V276, pertencente à população TPP^{WT}. Nas estirpes resistentes à ciprofloxacina (CMI_{CIP} 64 mg/L), identificou-se a presença simultânea das mutações GrlA:S80I e GyrA:S84L. Relativamente à estirpe BIOS-V276, apesar desta apresentar a mutação GrlA:D84G, não apresenta um fenótipo de resistência, (CMI_{CIP} de 1 mg/L) (Tabela 16).

3.3. Análise da expressão do gene *norA*

Apesar de já estarem descritos vários sistemas de efluxo em *S. aureus*, até ao momento apenas a bomba de efluxo NorA foi documentada em *S. pseudintermedius* (41,73). Deste modo, a expressão do gene *norA* foi avaliada num conjunto de seis estirpes de *S. pseudintermedius* em estudo, correspondendo a uma TPP^{WT} (BIOS-V37) e às cinco estirpes TPP^{NWT} anteriormente analisadas (BIOS-V99, BIOS-V104, BIOS-V143, BIOS-V234 e BIOS-V262) (Figura 11). Estas estirpes apresentaram atividade de efluxo aumentada nos ensaios efetuados previamente (determinação de CMI e ensaios de fluorometria em tempo real).

A análise da expressão génica foi efetuada por RT-qPCR em tempo real, recorrendo ao método comparativo de Ct, no qual se utilizou o gene *gyrB*, como gene endógeno. A estirpe DSM21284^T foi utilizada como referência na análise da expressão de *norA*.

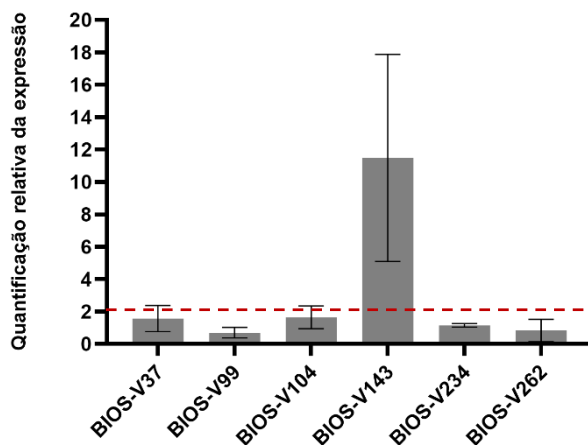


Figura 11. Quantificação relativa da expressão do gene *norA* em seis *S. pseudintermedius* recorrendo a RT-qPCR.

Os ensaios apresentados correspondem à média e desvio padrão de dois ensaios realizados de forma independente com RNA total proveniente de extrações independentes. A expressão do gene *norA* em cada estirpe foi comparada com a estirpe DSM21284^T. A linha a tracejado indica o valor a partir do qual se considera existir sobreexpressão de *norA* (86,111).

Pelos resultados apresentados na Figura 11, verifica-se que das seis estirpes analisadas, apenas a BIOS-V143, pertencente à população TPP^{NWT}, apresentou sobreexpressão relativa do gene *norA* em cerca de $11,48 \pm 4,52$. As restantes estirpes TPP^{NWT} apresentaram níveis de expressão inferiores ou similares aos da estirpe TPP^{WT}, BIOS-V37.

4. Discussão e Conclusões

Neste trabalho pretendeu-se estudar a atividade de efluxo de *S. pseudintermedius* e avaliar a sua contribuição na resistência a biocidas e fluoroquinolonas numa coleção de estirpes associadas a SSTIs em animais de companhia. Para atingir este objetivo, avaliou-se a suscetibilidade a três compostos conhecidos como substratos de bombas de efluxo MDR em estafilococos (EtBr, TPP e CIP), identificando populações *non wild-type* que potencialmente contêm mecanismos de resistência adquiridos para estes compostos com expressão fenotípica. Posteriormente, avaliou-se a presença de atividade de efluxo nessa população, correlacionando ainda os fenótipos observados com a análise da expressão do gene *norA* e a presença de mutações QRDR nos genes alvo das fluoroquinolonas.

A identificação de populações *non wild-type* baseia-se na estimativa do parâmetro CO_{WT} a partir das distribuições de CMIs dos compostos em estudo. Assim, o primeiro passo efetuado foi a determinação das CMIs de EtBr e de TPP para a coleção global de 155 *S. pseudintermedius*. Foi possível observar uma gama de CMI_{EtBr} de 0,5-4 mg/L, não se verificando uma relação estatística entre estes valores e o facto de as estirpes serem MRSP ou MSSP (MRSP: 0,5-4 mg/L; MSSP: 0,5-2 mg/L). Estas gamas de valores são concordantes com o descrito por Couto *et al.* para *S. pseudintermedius* associadas a diferentes infeções em animais de companhia, que reporta valores de CMI_{EtBr} ≤ 4 mg/L, com exceção de uma estirpe com CMI_{EtBr} de 32 mg/L (40).

A gama de CMI_{EtBr} observada neste trabalho para *S. pseudintermedius* é inferior às registadas para outras espécies de estafilococos, como *S. aureus*, para o qual já foram reportadas gamas entre 2-16 mg/L (69) em isolados clínicos humanos ou 2-32 mg/L (114) para isolados clínicos veterinários. Já para *S. epidermidis*, identificou-se uma gama muito superior de CMI_{EtBr}, 1-128 mg/L (78), comparativamente à encontrada por Ribeiro, para isolados clínicos veterinários de *S. aureus*. De referir que nestes casos, em particular para *S. epidermidis*, valores de CMI_{EtBr} superiores a 8 mg/L estavam associados à presença dos genes plasmídicos *qacA* ou *smr* (78), que conferem uma diminuição da suscetibilidade a vários biocidas e corantes, como o EtBr (48,76). Estabeleceu-se nesta Dissertação, o valor de CO_{WT} de EtBr de 4 mg/L para *S. pseudintermedius*, que é inferior ao valor proposto anteriormente (8 mg/L) a partir de um subgrupo de 52 isolados, desta mesma coleção (97,98). O valor estabelecido nesta Dissertação terá maior fiabilidade, uma vez que foi

calculado com base na distribuição de CMI_{EtBr} para uma coleção de maior dimensão. A aplicação do valor CO_{WT} para o EtBr revelou a inexistência de uma população NWT para este composto. Esta observação pode ser justificada pela ausência dos genes plasmídicos *qacA/B* e *smr* nesta coleção (97).

Quanto ao biocida TPP, não existem ainda na literatura dados de CO_{WT} de *S. pseudintermedius* para este composto. Verificou-se que a coleção de *S. pseudintermedius* estudada apresentou uma gama de CMI_{TPP} entre 4-128 mg/L (MRSP: 4-128 mg/L; MSSP: 4-64 mg/L). Para o TPP, foi possível identificar uma relação estatisticamente significativa entre os valores de CMI_{TPP} e o fenótipo de resistência à meticilina, indicando que apesar de as gamas serem similares, as estirpes MRSP apresentam tendencialmente um valor de CMI_{TPP} mais elevado comparativamente às estirpes MSSP, em particular, verifica-se que 16 das 18 estirpes TPP^{NWT} pertencem à linhagem clonal ST71-*agrIII* [Tabela 16 e referências (105,106,113)], correspondente à linhagem predominante em Portugal e outros países Europeus (23,40,44). Neste trabalho propõe-se, pela primeira vez, que seja do nosso conhecimento, um valor de CO_{WT} do TPP para *S. pseudintermedius*, de 16 mg/L. Este valor encontra-se próximo do valor já estabelecido para *S. aureus*, 32 mg/L (114).

Utilizando o valor CO_{WT} estimado neste trabalho para *S. pseudintermedius*, foi possível identificar uma população NWT para o TPP. Em estafilococos, o TPP é um substrato de bombas de efluxo MDR codificadas no cromossoma ou em plasmídeos, sendo este o único mecanismo de resistência conhecido atualmente para este antimicrobiano (48,76). Tal como para o EtBr, as populações NWT de *S. aureus* para o TPP têm sido relacionadas com a presença de genes plasmídicos (*smr*) (114). Para esta coleção de *S. pseudintermedius*, verificou-se anteriormente a ausência destes genes (97), pelo que a população NWT para o TPP deverá estar associada com uma maior atividade de sistemas de efluxo codificados no cromossoma.

Para validar esta hipótese utilizaram-se dois métodos habitualmente usados na deteção de efluxo: determinação de CMIs na presença de inibidores de efluxo e ensaios de fluorometria em tempo real (58).

Para o EtBr, a presença dos IEs promoveu uma diminuição significativa da CMI de todas as estirpes das duas populações (TPP^{WT} e TPP^{NWT}). Para o TPP, a adição de inibidores, particularmente o VER, teve um impacto superior nas estirpes TPP^{NWT}, promovendo uma redução dos valores de CMI_{TPP} desta população para valores inferiores

ao valor de CO_{WT} estimado (16 mg/L), ou seja, para valores correspondentes ao de uma população *wild type*. Estes resultados suportam a hipótese de o mecanismo de resistência ao TPP, detetável na população TPP^{NWT}, se dever a uma atividade de efluxo aumentada.

De forma a complementar os resultados obtidos por este método, recorreu-se a ensaios de fluorometria em tempo real, que permitem avaliar o efluxo do EtBr em tempo real (92). A utilização do EtBr é comumente empregada nestes ensaios por ser uma molécula fluorescente que apresenta intensidades diferentes consoante o meio em que se encontra (deste modo, pode-se acompanhar em tempo real o transporte de EtBr), mas também por ser um substrato conhecido de bombas de efluxo MDR em *S. aureus* e outros estafilococos (48,86,92). A utilização deste método para estudar a atividade de efluxo não estava ainda descrito na literatura para *S. pseudintermedius*, realçando este trabalho como o primeiro a aplicar esta técnica para esta espécie. Estes ensaios foram realizados na ausência e presença de glucose, a qual, em estirpes com atividade de efluxo aumentada, promove a diminuição da acumulação de EtBr (i.e, maior efluxo de EtBr), devido à metabolização de glucose, que energiza os sistemas de efluxo (48,92).

A realização deste ensaio em 11 estirpes representativas (oito estirpes TPP^{NWT} e três estirpes TPP^{WT}) mostrou que na ausência de glucose, a estirpe DSM21284^T e as estirpes da população TPP^{WT} e TPP^{NWT} tendem, na generalidade, a acumular EtBr com o aumento da concentração. Na presença de glucose, verifica-se um aumento de acumulação de EtBr, tanto para a estirpe DSM21284^T como para as estirpes TPP^{WT}. Já as estirpes TPP^{NWT} não evidenciaram um padrão comum de acumulação, sendo necessário agrupá-las em três subgrupos, consoante o padrão de acumulação de EtBr. O subgrupo 2 foi o único que demonstrou, na ausência de glucose, uma acumulação reduzida de EtBr, comparativamente à estirpe DSM21284^T e estirpes TPP^{WT}. Na presença de glucose, os subgrupos 2 e 3 evidenciaram uma menor acumulação de EtBr. Estes ensaios de fluorometria sugerem que em *S. pseudintermedius*, o efluxo é dependente da glucose como fonte de energia, uma vez que o decréscimo de acumulação de EtBr (aumento de efluxo) é mais evidente na presença de glucose. Este tipo de comportamento é verificado em outras espécies do género *Staphylococcus*, como em *S. epidermidis* e *S. aureus* (58,69,78,85,115).

Em suporte destas observações, o efeito dos IEs, TZ e VER no perfil de acumulação de EtBr, avaliado para as cinco estirpes TPP^{NWT} dos subgrupos 2 e 3 e uma

estirpe TPP^{WT}, foi evidente, de forma quase exclusiva, na presença de glucose. Este comportamento suporta então a necessidade de energização das bombas de efluxo para ser possível observar o papel dos inibidores de efluxo. Esta hipótese é também sustentada pelos valores de RFF calculados, que apenas são significativos (>1) na presença de IEs, em particular VER, e de glucose. A utilização do inibidor VER nas duas técnicas utilizadas (determinação de CMI e fluorometria em tempo real) demonstra que este é um inibidor de efluxo eficaz em *S. pseudintermedius*, à semelhança do que já se encontra descrito para *S. aureus* (69) e *S. epidermidis* (86).

A utilização de fluorometria em tempo real para *S. pseudintermedius* complementou alguns resultados obtidos pelo método da microdiluição, ao confirmar a presença de atividade de efluxo aumentada em grande parte das estirpes TPP^{NWT}. A não detecção desta atividade em todas as estirpes TPP^{NWT} selecionadas, pode dever-se ao substrato utilizado nestes ensaios, o EtBr, que apesar de ser também substrato das bombas de efluxo que extrusam o TPP (58,76), pode ser expulso com uma eficácia distinta. Esta possível distinção pode-se dever às ligações estabelecidas com os dois substratos no centro ativo da bomba de efluxo, como já foi postulado para a bomba NorA, em *S. aureus*, para diferentes substratos (116,117). As diferenças envolvidas nos dois métodos, incluindo o tempo de incubação com o substrato (1h vs 18h), pode ser uma explicação adicional para os resultados obtidos.

Em *S. aureus*, o aumento da atividade de efluxo está associado à sobreexpressão de diversas bombas de efluxo codificadas no cromossoma, incluindo NorA (56). Para *S. pseudintermedius* são ainda poucas as bombas de efluxo que estão descritas, em particular as codificadas no cromossoma. No entanto, já foi identificada a bomba NorA, como descrevem Couto *et al.* e Gagetti *et al.* (41,73). Em particular, Couto *et al.* descreve a sobreexpressão desta bomba em estirpes MRSP (41).

A análise dos níveis de expressão de *norA* para seis estirpes representativas indicou que apenas a estirpe BIOS-V143 (TPP^{NWT}) apresentou uma sobreexpressão significativa (≥ 4) (56) do gene *norA*, quando comparado com a estirpe DSM21824^T. Esta sobreexpressão de *norA*, corrobora o comportamento desta estirpe nos ensaios anteriores; nomeadamente reduções significativas ($\geq 4x$) dos valores de CMI_{EtBr} e CMI_{TPP} na presença de IEs e maior efluxo de EtBr nos ensaios de fluorometria, que é inibido pelos IEs. Contudo, as outras estirpes TPP^{NWT} testadas, como BIOS-V262, BIOS-V234 e

BIOS-V104, que também demonstraram efluxo aumentado nestes ensaios, não apresentaram sobreexpressão de *norA* nas condições testadas. Nestes casos, pode-se verificar o que reporta DeMarco *et al.* para *S. aureus*, nomeadamente o envolvimento/atividade de outras bombas de efluxo codificadas no cromossoma, como a NorB, MepA, MdeA, LmrS em *S. aureus*, que extrusam o EtBr e o TPP (48,56). No entanto, numa análise preliminar dos genomas de *S. pseudintermedius* não se detetou a presença de homólogos dos genes *norB*, *mepA*, *mdeA* ou *lmrS* (Costa *et al.*, dados não publicados), sugerindo que nesta espécie, outros sistemas estarão envolvidos no efluxo de EtBr ou TPP. Uma outra possível interpretação da ausência de sobreexpressão de *norA* nestas estirpes será a necessidade de uma exposição prévia ao substrato (EtBr/TPP), de forma a induzir a expressão do gene, como reportado por vários autores para *S. aureus* (57,63,85,111,118).

O aumento da atividade de efluxo pode levar à emergência de resistência cruzada a compostos quimicamente diversos, desde que sejam substratos das mesmas bombas de efluxo (119). Em *S. aureus*, as diferentes bombas de efluxo MDR apresentam vários compostos químicos como substratos, nos quais se incluem as fluoroquinolonas (48,76).

Em *S. pseudintermedius*, a utilização de fluoroquinolonas deverá ter uma aplicação limitada, conforme indicado nas diretrizes (terapêutica de 2ª linha para SSTIs, quando comprovada a resistência para os antimicrobianos de 1ª linha) (31,32). No entanto, em Portugal, esta é uma das classes de antibióticos mais prescrita, só ultrapassada pelos β -lactâmicos no tratamento de SSTIs em animais de companhia (120). Estes resultados são concordantes com o relatório de 2020 da *European Medicines Agency* (EMA), que evidencia Portugal como o terceiro país, de um conjunto de 31 países estudados, que mais utiliza fluoroquinolonas na medicina veterinária (121). Associado ao uso regular das fluoroquinolonas, tem-se observado elevados níveis de resistência para esta classe de antibióticos, tanto em Portugal (44,45) como globalmente (122,123). Os mecanismos de resistência associadas às fluoroquinolonas incluem o aumento da atividade de efluxo e/ou presença de mutações na região QRDR dos genes *gla* e *gyrA* (40,104).

Deste modo, avaliou-se a suscetibilidade à CIP para 11 estirpes representativas. Constatou-se que as estirpes TPP^{WT} eram suscetíveis a este antibiótico (gammas de CMI_{CIP}:

0,25-1 mg/L), e as estirpes TPP^{NWT} eram resistentes à CIP (CMI_{CIP}: 64 mg/L), à exceção de uma.

Na presença de inibidores de efluxo, não se verificou um decréscimo significativo ($\geq 4x$) da CMI_{CIP} na população TPP^{NWT}, indicando que a resistência observada para a CIP será majoritariamente mediada por um mecanismo que não o efluxo. Assim, avaliou-se a presença de mutações QRDR nos genes *grlA* e *gyrA*. Como esperado, as estirpes suscetíveis à ciprofloxacina, não apresentaram mutações nestas regiões, com exceção de uma estirpe (BIOS-V276) que apresentou a mutação GrlA:Asp84Gly. Este dado indica que esta mutação não afeta a suscetibilidade à CIP. Esta hipótese é parcialmente suportada pelo estudo de Onuma *et al.*, o qual relata a presença desta mutação em associação a uma diminuição da suscetibilidade para a ofloxacina e enrofloxacina e resistência para a levofloxacina (124). Por outro lado, as estirpes resistentes à ciprofloxacina apresentaram simultaneamente as mutações GrlA:Ser80Ile e GyrA:Ser84Leu. Este padrão de mutações QRDR já tinha sido anteriormente descrito para *S. pseudintermedius* e está associado a resistência a fluoroquinolonas (47,50,124). Os dados obtidos neste trabalho evidenciam que a resistência apresentada às fluoroquinolonas para o conjunto de estirpes estudadas, é predominantemente mediada por mutações na região QRDR de genes *grlA/gyrA*, tal como foi descrito por Loiacono *et al.* (125) e por Ramos (97,98). É de salientar que a utilização intensiva e indiscriminada desta classe de antibióticos pode ter um papel na crescente resistência a esta classe em *S. pseudintermedius* e em outras espécies de estafilococos (111,120).

Apesar destes dados preliminares mostrarem uma suscetibilidade reduzida do TPP, mediada por bombas de efluxo, a utilização dos biocidas é alternativa ao tratamento e prevenção de infeções por *S. pseudintermedius*, dado o número crescente de infeções causadas por estirpes resistentes aos antibióticos. Na prática clínica veterinária, os biocidas são utilizados numa terapêutica combinada, e para casos de lesões de pele superficiais, podem-se aplicar de forma exclusiva (12,30).

O TPP é um biocida catiónico aplicado no campo da biomedicina, na desinfecção de superfícies, na qual previne a fixação bacteriana (126,127). Este composto é um sal polimérico de fosfónio, estruturalmente semelhante aos compostos de amónio quaternários, apresentando ainda um mecanismo de ação similar a estes que consiste na disrupção da membrana celular (127,128). Este sal foi introduzido na década de 90,

apresentando uma maior atividade antibacteriana contra *S. aureus*. Porém, tem sido identificado como substrato de diversas bombas de efluxo em estafilococos (48,56,71,129). Na saúde veterinária, a diminuição da suscetibilidade ao TPP apresentada por *S. pseudintermedius* pode estar associada a uma limpeza ineficaz e/ou baixa frequência de desinfecção de espaços e objetos que contatam com os animais de companhia, expondo *S. pseudintermedius* a concentrações sub-letais deste biocida. Esta exposição pode promover a seleção de estirpes com suscetibilidade reduzida, que podem ser transferidas das superfícies de contato para os animais, proporcionando a sua disseminação (33,130,131). Esta mesma exposição ou exposição a outros biocidas, como os que são habitualmente utilizados na prática veterinária (clorexidina, cloreto de benzalcônio, entre outros) pode promover, pela ativação de sistemas de efluxo MDR, a suscetibilidade reduzida em simultâneo ao TPP e outros biocidas, assim como resistência cruzada às fluoroquinolonas (119). Embora a suscetibilidade diminuída aos biocidas usados na prática veterinária possa não ser considerada clinicamente relevante, dado que as concentrações aplicadas são muito superiores (40,42,74), os dados obtidos indicam o potencial para diminuição da suscetibilidade e a necessidade de utilizar estes compostos de forma prudente, de forma a evitar a disseminação de estirpes de *S. pseudintermedius* com suscetibilidade reduzida a esta classe de antimicrobianos, como já se verifica em *S. aureus* (132–134).

Conclusões Gerais

Os resultados obtidos nesta Dissertação contribuíram para uma melhor caracterização e compreensão da atividade de efluxo em *S. pseudintermedius* associados a SSTIs em animais de companhia. Verificou-se que 11,6% da coleção estudada apresentava suscetibilidade reduzida ao biocida TPP, comumente utilizado na desinfecção de superfícies e substrato conhecido de bombas de efluxo MDR em estafilococos. Sendo o efluxo o único mecanismo de resistência conhecido atualmente para este composto, utilizaram-se duas abordagens experimentais para detetar e caracterizar atividade de efluxo nestas estirpes; a determinação de CMI na ausência e presença de IE e a fluorometria em tempo real. A aplicação desta última metodologia,

realizada pela primeira vez neste trabalho para *S. pseudintermedius*, demonstrou a aplicabilidade da fluorimetria na caracterização do efluxo nesta espécie.

As duas abordagens experimentais referidas acima permitiram correlacionar a população TPP^{NWT} com uma atividade de efluxo aumentada, a qual foi ainda possível relacionar com a sobreexpressão do gene *norA* numa das estirpes NWT analisadas. A avaliação da expressão de *norA* nas restantes estirpes NWT poderá ser explorada no futuro, por análise da expressão génica após exposição das estirpes de interesse ao TPP e/ou expansão desta análise para outros sistemas de efluxo putativos codificados por genes cromossómicos. Estes resultados evidenciam a necessidade de aprofundar os estudos *in silico* para sistemas de efluxo cromossómicos, atualmente desconhecidos em *S. pseudintermedius*. Constatou-se também que a resistência às fluoroquinolonas para as estirpes selecionadas, não estava diretamente relacionada com a atividade de efluxo e que o principal mecanismo de resistência estava associado à presença de mutações QRDR nos genes *griA/gyrA*, tendo sido apenas identificado o padrão GriA:Ser80Ile/GyrA:Ser84Leu, associado a elevados níveis de resistência.

A população de *S. pseudintermedius* TPP^{NWT} identificada nesta Dissertação e associada a uma atividade de efluxo aumentada, também apresenta resistência à meticilina e fenótipos de multiresistência, estando maioritariamente associada à linhagem clonal ST71-*agrIII*. Estes padrões realçam as atuais dificuldades no tratamento destas infeções em animais de companhia. A potencial transmissão zoonótica destas estirpes para humanos alarga o potencial risco que estas acarretam, a nível de saúde global.

Esta Dissertação evidencia a importância e a necessidade da caracterização dos sistemas de efluxo em *S. pseudintermedius*, como mecanismo de resistência a antimicrobianos, em particular a biocidas. A utilização destes antimicrobianos, alternativa proposta na terapêutica veterinária, é colocada em risco pela diminuição da suscetibilidade a estes compostos, conforme os resultados aqui apresentados, que demonstram que é necessária prudência na sua utilização. A vigilância da emergência de estirpes com atividade de efluxo, utilizando abordagens metodológicas como as desenvolvidas e aplicadas neste estudo serão cruciais para o controle das infeções causadas por este importante agente patogénico de animais de companhia.

5. Referências Bibliográficas

1. Parte AC, Sardà Carbasse J, Meier-Kolthoff JP, Reimer LC, Göker M. List of Prokaryotic names with Standing in Nomenclature (LPSN) moves to the DSMZ. *Int J Syst Evol Microbiol.* 2020 Nov;70(11):5607–12.
2. Schleifer K, Bell J. *Staphylococcus*. In: Whitman WB, DeVos P, Dedysh S, Hedlund B, Kampfer P, Rainey F, *et al.*, editors. *Bergey's Manual of Systematics of Archaea and Bacteria*. Online. Baltimore: John Wiley & Sons, Inc, Bergey's Manual Trust; 2015. p. 1–43.
3. Becker K, von Eiff C. *Staphylococcus*, *Micrococcus*, and Other Catalase-Positive Cocci*. In: Jorgensen JH, Carroll KC, Funke G, Pfaller M, Landry M, Richter S, *et al.*, editors. *Manual of Clinical Microbiology*, 11th Edition. Washington: American Society for Microbiology; 2015. p. 308–30.
4. Devriese LA. *Staphylococcus pseudintermedius* sp. nov., a coagulase-positive species from animals. *Int J Syst Evol Microbiol.* 2005;55(4):1569–73.
5. Perreten V, Kania SA, Bemis D. *Staphylococcus ursi* sp. nov., a new member of the “*Staphylococcus intermedius* group” isolated from healthy black bears. *Int J Syst Evol Microbiol.* 2020 Aug;70(8):4637–45.
6. Gronthal T, Eklund M, Thomson K, Piiparinen H, Sironen T. Antimicrobial resistance in *Staphylococcus pseudintermedius* and the molecular epidemiology of methicillin-resistant *S. pseudintermedius* in small animals in Finland. *J Antimicrob Chemother.* 2017;72:1021–30.
7. Bhooshan S, Negi V, Khatri P. *Staphylococcus pseudintermedius*: an undocumented, emerging pathogen in humans. *GMS Hyg Infect Control.* 2020;15:1–11.
8. Ripa L, Simón C, Ceballos S, Ortega C. *S. pseudintermedius* and *S. aureus* lineages with transmission ability circulate as causative agents of infections in pets for years. *BMC Vet Res.* 2021;17(42):1–10.
9. Bannoehr J, Guardabassi L. *Staphylococcus pseudintermedius* in the dog:

- taxonomy, diagnostics, ecology, epidemiology and pathogenicity. *Vet Dermatol.* 2012;23(4):253-e52.
10. Maali Y, Badiou C, Martins-Simões P, Hodille E, Bes M, Vandenesch F, *et al.* Understanding the Virulence of *Staphylococcus pseudintermedius*: A Major Role of Pore-Forming Toxins. *Front Cell Infect Microbiol.* 2018;8:1–10.
 11. Van Duijkeren E, Catry B, Greko C, Moreno MA, Pomba MC. Review on methicillin-resistant *Staphylococcus pseudintermedius*. *J Antimicrob Chemother.* 2011;66(12):2705–14.
 12. Lynch SA, Helbig KJ. The Complex Diseases of *Staphylococcus pseudintermedius* in Canines: Where to Next? *Vet Sci.* 2021;8(1):1–19.
 13. González-Martín M, Corbera JA, Suárez-Bonnet A, Tejedor-Junco MT. Virulence factors in coagulase-positive staphylococci of veterinary interest other than *Staphylococcus aureus*. *Vet Q.* 2020 Dec;40(1):118–31.
 14. Bierowiec K, Mischczak M, Korzeniowska-Kowal A, Wzorek A, Płókarz D, Gamian A. Epidemiology of *Staphylococcus pseudintermedius* in cats in Poland. *Sci Rep.* 2021 Sep;11(1):18898.
 15. Van Duijkeren E, Kamphuis M, van der Mije IC, Laarhoven LM. Transmission of methicillin-resistant *Staphylococcus pseudintermedius* between infected dogs and cats and contact pets, humans and the environment in households and veterinary clinics. *Vet Microbiol.* 2011;150(3–4):338–43.
 16. Somayajin R, Rubin JE, Priyantha M, Church D. Exploring *Staphylococcus pseudintermedius*: an emerging zoonotic pathogen? *Future Microbiol.* 2016;11(11):1371–4.
 17. Ference E, Danielian A, Kim H, Yoo F, Kuan E, Suh J. Zoonotic *Staphylococcus pseudintermedius* sinonasal infections: risk factors and resistance patterns. *Int Forum Allergy Rhinol.* 2019;9(7):724–9.
 18. Carroll KC, Burnham C-AD, Westblade LF. From canines to humans: Clinical importance of *Staphylococcus pseudintermedius*. *PLoS Pathog.* 2021 Dec;17(12):e1009961.

19. Hanselman B, Kruth S, Rousseau J, Weese J. Coagulase positive staphylococcal colonization of humans and their household pets. *Can Vet J*. 2009;50(9):954–8.
20. Borjesson S, Gómez-Sanz E, Ekstrom K, Torres C, Gronlund U. *Staphylococcus pseudintermedius* can be misdiagnosed as *Staphylococcus aureus* in humans with dog bite wounds. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 2014;34:839–44.
21. Duim B, Verstappen K, Broens EM, Laarhoven LM. Changes in the Population of Methicillin-Resistant *Staphylococcus pseudintermedius* and Dissemination of Antimicrobial-Resistant Phenotypes in the Netherlands. *J Clin Microbiol*. 2015;54(2):283–8.
22. Couto N, Pomba C, Moodley A, Guardabassi L. Prevalence of methicillin resistant staphylococci among dogs and cats at a veterinary teaching hospital in Portugal. *Vet Rec*. 2011;169(3):72–72.
23. McCarthy A, Harrison EM, Stanczak-Mrozek K, Leggett B, Waller A, Holmes M, *et al*. Genomic insights into the rapid emergence and evolution of MDR in *Staphylococcus pseudintermedius*. *J Antimicrob Chemother*. 2015;70:997–1007.
24. Williamson D, Carter G, Howden B. Current and Emerging Topical Antibacterials and Antiseptics: Agents, Action, and Resistance Patterns. *Clin Microbiol Rev*. 2017;30(3):827–60.
25. Maillard JY. Bacterial target sites for biocide action. *J Appl Microbiol Symp Suppl*. 2002;92:16–27.
26. Gilbert P, McBain AJ. Potential impact of increased use of biocides in consumer products on prevalence of antibiotic resistance. *Clin Microbiol Rev*. 2003 Apr;16(2):189–208.
27. Taheri N, Ardebili A, Amouzandeh-Nobaveh A, Ghaznavi-Rad E. Frequency of Antiseptic Resistance Among *Staphylococcus aureus* and Coagulase-Negative Staphylococci Isolated From a University Hospital in Central Iran. *Oman Med J*. 2016 Nov;31(6):426–32.
28. Hardy K, Sunnucks K, Gil H, Shabir S, Trampani E, Hawkey P, *et al*. Increased Usage of Antiseptics Is Associated with Reduced Susceptibility in Clinical

- Isolates of *Staphylococcus aureus*. MBio. 2018 May;9(3).
29. Finberg R, Moellering R, Tally F, Craig W, Pankey G, Dellinger E, *et al*. The Importance of Bactericidal Drugs: Future Directions in Infectious Disease. Clin Infect Dis. 2004;39(9):1314–20.
 30. Frank L, Loeffler A. Meticillin-resistant *Staphylococcus pseudintermedius*: clinical challenge and treatment options. Vet Dermatol. 2012;23(4):283–91.
 31. Beco L, Guaguère E, Lorente Méndez C, Noli C, Nuttall T, Vroom M. Suggested guidelines for using systemic antimicrobials in bacterial skin infections: part 2-- antimicrobial choice, treatment regimens and compliance. Vet Rec. 2013 Feb;172(6):156–60.
 32. Hillier A, Lloyd DH, Weese J, Blondeau J, Boothe D. 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). Vet Dermatol. 2014;25:163-e43.
 33. Morris DO, Loeffler A, Davis MF, Guardabassi L, Weese JS. Recommendations for approaches to meticillin-resistant staphylococcal infections of small animals: diagnosis, therapeutic considerations and preventative measures.: Clinical Consensus Guidelines of the World Association for Veterinary Dermatology. Vet Dermatol. 2017 Jun;28(3):304-e69.
 34. Petinaki E, Papagiannitsis C. Resistance of Staphylococci to Macrolides-Lincosamides-Streptogramins B (MLSB): Epidemiology and Mechanisms of Resistance. IntechOpen; 2018. p. 117–33.
 35. Papadogiannakis E, Velonakis E, Vatopoulos A. Ever-increasing emergence of multi-drug resistant *Staphylococcus pseudintermedius* in the dog and its zoonotic potentials. J Hell Vet Med Soc. 2018;67(2):109–16.
 36. European Medicines Agency (EMA). Categorisation of antibiotics in the European Union. Amesterdão; 2019.
 37. McDonnell G, Russell A. Antiseptics and Disinfectants: Activity, Action, and Resistance. Clin Microbiol Rev. 1999;12(1):147–79.

38. Worthing KA, Marcus A, Abraham S, Trott DJ, Norris JM. *Qac* genes and biocide tolerance in clinical veterinary methicillin-resistant and methicillin-susceptible *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus pseudintermedius*. *Vet Microbiol.* 2018 Mar;216:153–8.
39. Geraldés C, Verdial C, Cunha E, Almeida V, Tavares L, Oliveira M, *et al.* Evaluation of a Biocide Used in the Biological Isolation and Containment Unit of a Veterinary Teaching Hospital. *Antibiot (Basel, Switzerland)*. 2021 May;10(6).
40. Couto N, Belas A, Couto I, Perreten V, Pomba C. Genetic relatedness, antimicrobial and biocide susceptibility comparative analysis of methicillin-resistant and -susceptible *Staphylococcus pseudintermedius* from Portugal. *Microb Drug Resist.* 2013;20(4):364–71.
41. Couto N, Belas A, Oliveira M, Almeida P, Clemente C, Pomba C. Comparative RNA-seq-Based Transcriptome Analysis of the Virulence Characteristics of Methicillin-Resistant and -Susceptible *Staphylococcus pseudintermedius* Strains Isolated from Small Animals. *Antimicrob Agents Chemother.* 2016 Feb;60(2):962–7.
42. Walker MA, Singh A, Gibson TW, Rousseau J, Weese JS. Presence of *Qac* genes in clinical isolates of methicillin-resistant and methicillin-susceptible *Staphylococcus pseudintermedius* and their impact on chlorhexidine digluconate susceptibility. *Vet Surg.* 2020 Jul;49(5):971–6.
43. Schwarz S, Fessler A, Loncaric I, Wu C. Antimicrobial Resistance among Staphylococci of Animal Origin. *Microbiol. Spectr.* 2018;6(4):129–56.
44. Silva V, Oliveira A, Manageiro V, Caniça M, Contente D, Capita R, *et al.* Clonal Diversity and Antimicrobial Resistance of Methicillin-Resistant *Staphylococcus pseudintermedius* Isolated from Canine Pyoderma. *Microorganisms.* 2021 Feb;9(3).
45. Couto N, Monchique C, Belas A, Marques C, Gama LT, Pomba C. Trends and molecular mechanisms of antimicrobial resistance in clinical staphylococci isolated from companion animals over a 16 year period. *J Antimicrob Chemother.* 2016 Jun;71(6):1479–87.

46. Emaneini M, Bigverdi R, Kalantar D, Soroush S, Jabalameli F, Noorazar Khoshgnab B, et al. Distribution of genes encoding tetracycline resistance and aminoglycoside modifying enzymes in *Staphylococcus aureus* strains isolated from a burn center. *Ann Burns Fire Disasters*. 2013;26(2):76–80.
47. Kadlec K, Schwarz S. Antimicrobial resistance of *Staphylococcus pseudintermedius*. *Vet Dermatol*. 2012;23:276-e55.
48. Costa SS, Viveiros M, Amaral L, Couto I. Multidrug Efflux Pumps in *Staphylococcus aureus*: an Update. *Open Microbiol J*. 2013;7:59–71.
49. Descloux S, Rossano A, Perreten V. Characterization of New Staphylococcal Cassette Chromosome *mec* (SCCmec) and Topoisomerase Genes in Fluoroquinolone- and Methicillin-Resistant *Staphylococcus pseudintermedius*. *J Clin Microbiol*. 2008;46(5):1818–23.
50. Kizerwetter-Świda M, Chrobak-Chmiel D, Rzewuska M, Binek M. Resistance of canine methicillin-resistant *Staphylococcus pseudintermedius* strains to pradofloxacin. *J Vet Diagnostic Investig*. 2016;28(5):514–8.
51. Perreten V, Kadlec K, Schwarz S, Andersson U. Clonal spread of methicillin-resistant *Staphylococcus pseudintermedius* in Europe and North America: an international multicentre study. *J Antimicrob Chemother*. 2010;65:1145–54.
52. Godbeer SM, Gold RM, Lawhon SD. Prevalence of mupirocin resistance in *Staphylococcus pseudintermedius*. *J Clin Microbiol*. 2014 Apr;52(4):1250–2.
53. Park J-H, Kang J-H, Hyun J-E, Hwang C-Y. Low prevalence of mupirocin resistance in *Staphylococcus pseudintermedius* isolates from canine pyoderma in Korea. *Vet Dermatol*. 2018 Apr;29(2):95-e37.
54. Webber MA, Piddock LJ V. The importance of efflux pumps in bacterial antibiotic resistance. *J Antimicrob Chemother*. 2003;51:9–11.
55. Blanco P, Hernando-Amado S, Reales-Calderon J, Corona F. Bacterial Multidrug Efflux Pumps: Much More Than Antibiotic Resistance Determinants. *Microorganisms*. 2016;4(14):1–19.

56. DeMarco CE, Cushing LA, Frempong-Manso E, Seo SM, Jaravaza TAA, Kaatz GW. Efflux-related resistance to norfloxacin, dyes, and biocides in bloodstream isolates of *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob Agents Chemother*. 2007 Sep;51(9):3235–9.
57. Huet AA, Raygada JL, Mendiratta K, Seo SM, Kaatz GW. Multidrug efflux pump overexpression in *Staphylococcus aureus* after single and multiple in vitro exposures to biocides and dyes. *Microbiology*. 2008 Oct;154(Pt 10):3144–53.
58. Costa SS, Junqueira E, Palma C, Viveiros M, Melo-Cristino J, Amaral L, *et al*. Resistance to Antimicrobials Mediated by Efflux Pumps in *Staphylococcus aureus*. *Antibiotics*. 2013;2:83–99.
59. Piddock LJ V. Clinically Relevant Chromosomally Encoded Multidrug Resistance Efflux Pumps in Bacteria. *Clin Microbiol Rev*. 2006;19(2):382–402.
60. Poole K. Efflux pumps as antimicrobial resistance mechanisms. *Ann Med*. 2007;39(3):162–76.
61. Sun J, Deng Z, Yan A. Bacterial multidrug efflux pumps: Mechanisms, physiology and pharmacological exploitations. *Biochem Biophys Res Commun*. 2014;453(2):254–67.
62. Blair JMA, Richmond GE, Piddock LJ V. Multidrug efflux pumps in Gram-negative bacteria and their role in antibiotic resistance. *Future Microbiol*. 2014;9(10):1165–77.
63. Kaatz GW, Seo SM. Effect of substrate exposure and other growth condition manipulations on *norA* expression. *J Antimicrob Chemother*. 2004 Aug;54(2):364–9.
64. Furi L, Ciusa ML, Knight D, Di Lorenzo V, Tocci N, Cirasola D, *et al*. Evaluation of reduced susceptibility to quaternary ammonium compounds and bisbiguanides in clinical isolates and laboratory-generated mutants of *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob Agents Chemother*. 2013 Aug;57(8):3488–97.
65. Jang S. Multidrug efflux pumps in *Staphylococcus aureus* and their clinical implications. *J Microbiol*. 2016;54(1):1–8.

66. Hassanzadeh S, Ganjloo S, Pourmand MR, Mashhadi R, Ghazvini K. Epidemiology of Efflux Pumps genes mediating Resistance among *Staphylococcus aureus*; A systematic review. *Microb Pathog*. 2019;1–20:1–20.
67. Reygaert W. An overview of the antimicrobial resistance mechanisms of bacteria. *AIMS Microbiol*. 2018;4(3):482–501.
68. Yoshida H, Bogaki M, Nakamura S, Ubukata K, Konno M. Nucleotide Sequence and Characterization of the *Staphylococcus aureus norA* Gene, Which Confers Resistance to Quinolones. *J Bacteriol*. 1990;172(12):6942–9.
69. Costa SS, Falcão C, Viveiros M, Machado D, Martins M, Melo-Cristino J, *et al*. Exploring the contribution of efflux on the resistance to fluoroquinolones in clinical isolates of *Staphylococcus aureus*. *BMC Microbiol*. 2011;11(241):1–12.
70. Zimmermann S, Klinger-Strobel M, Bohnert JA, Wendler S, Rodel J. Clinically Approved Drugs Inhibit the *Staphylococcus aureus* Multidrug NorA Efflux Pump and Reduce Biofilm Formation. *Front Microbiol*. 2019;10(2762):1–13.
71. Kaatz G, Seo S, O'Brien L, Wahiduzzaman M, Foster TJ. Evidence for the Existence of a Multidrug Efflux Transporter Distinct from NorA in *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob Agents Chemother*. 2000;44(5):1404–6.
72. Ligozzi M, Galia L, Bertoncetti A, Mazzariol A. Intrinsic role of coagulase negative staphylococci *norA*-like efflux system in fluoroquinolones resistance. *AIMS Microbiol*. 2017;3(4):908–14.
73. Gagetti P, Rosato RR, Rosato AE. *Staphylococcus pseudintermedius*'s PBP4 Is Directly Associated with the Dissociated Oxacillin and Cefoxitin Phenotype. *Antibiot (Basel, Switzerland)*. 2021 Oct;10(11).
74. Frosini S-M, Bond R, Rantala M, Grönthal T, Rankin SC, O'Shea K, *et al*. Genetic resistance determinants to fusidic acid and chlorhexidine in variably susceptible staphylococci from dogs. *BMC Microbiol*. 2019 Apr;19(1):81.
75. Schindler BD, Kaatz GW. Multidrug efflux pumps of Gram-positive bacteria. *Drug Resist Updat*. 2016 Jul;27:1–13.

76. Lekshmi M, Ammini P, Adjei J, Sanford L. Modulation of antimicrobial efflux pumps of the major facilitator superfamily in *Staphylococcus aureus*. AIMS Microbiol. 2018;4(1):1–18.
77. Juárez-Verdayes MA, Parra-Ortega B, Hernández-Rodríguez C, Betanzos-Cabrera G, Rodríguez-Martínez S, Cancino-Díaz ME, *et al.* Identification and expression of *nor* efflux family genes in *Staphylococcus epidermidis* that act against gatifloxacin. Microb Pathog. 2012 Jun;52(6):318–25.
78. Rosa M. Contribuição do efluxo para a resistência a compostos antimicrobianos em *Staphylococcus epidermidis*. Dissertação de Mestrado em Ciências Biomédicas. Instituto de Higiene e Medicina Tropical; 2017.
79. Hassan KA, Skurray RA, Brown MH. Active export proteins mediating drug resistance in staphylococci. J Mol Microbiol Biotechnol. 2007;12(3–4):180–96.
80. Viveiros M, Rodrigues L, Martins M, Couto I, Spengler G, Martins A, *et al.* Evaluation of Efflux Activity of Bacteria by a Semi-automated Fluorometric System. In: Gillespie S, McHugh T, editors. Antibiotic Resistance Protocols. 2nd ed. Londres; 2010. p. 159–72.
81. Blair JMA, Piddock LJ V. How to Measure Export via Bacterial Multidrug Resistance Efflux Pumps. Am Soc Microbiol. 2016;7(4):1–6.
82. Patel D, Kosmidis C, Seo SM, Kaatz G. Ethidium Bromide MIC Screening for Enhanced Efflux Pump Gene Expression or Efflux Activity in *Staphylococcus aureus*. Antimicrob Agents Chemother. 2010;54(12):5070–3.
83. Martins M, McCusker M, Viveiros M, Couto I, Fanning S, Pagès JM. A Simple Method for Assessment of MDR Bacteria for Over-Expressed Efflux Pumps. Open Microbiol J. 2013;7(1):72–82.
84. Kristiansen MM, Leandro C, Ordway D, Martins M, Viveiros M, Pacheco T, *et al.* Thioridazine reduces resistance of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* by inhibiting a reserpine-sensitive efflux pump. In Vivo. 2006;20(3):361–6.
85. Couto I, Costa SS, Viveiros M, Martins M, Amaral L. Efflux-mediated response of *Staphylococcus aureus* exposed to ethidium bromide. J Antimicrob Chemother.

- 2008 Sep;62(3):504–13.
86. Costa SS, Viveiros M, Pomba C, Couto I. Active antimicrobial efflux in *Staphylococcus epidermidis*: building up of resistance to fluoroquinolones and biocides in a major opportunistic pathogen. *J Antimicrob Chemother.* 2018;73(2):1–5.
87. Kaatz GW, Moudgal V V, Seo SM, Kristiansen JE. Phenothiazines and thioxanthenes inhibit multidrug efflux pump activity in *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob Agents Chemother.* 2003 Feb;47(2):719–26.
88. Chen C, Gardete S, Jansen RS, Shetty A, Dick T, Rhee KY, *et al.* Verapamil Targets Membrane Energetics in *Mycobacterium tuberculosis*. *Antimicrob Agents Chemother.* 2018 May;62(5).
89. Aeschlimann JR, Dresser LD, Kaatz GW, Rybak MJ. Effects of NorA inhibitors on in vitro antibacterial activities and postantibiotic effects of levofloxacin, ciprofloxacin, and norfloxacin in genetically related strains of *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob Agents Chemother.* 1999 Feb;43(2):335–40.
90. Amaral L, Martins A, Molnar J, Kristiansen JE, Martins M, Viveiros M, *et al.* Phenothiazines, bacterial efflux pumps and targeting the macrophage for enhanced killing of intracellular XDRTB. *In Vivo.* 2010;24(4):409–24.
91. Viveiros M, Martins A, Paixão L, Rodrigues L, Martins M, Couto I. Demonstration of intrinsic efflux activity of *Escherichia coli* K-12 AG100 by an automated ethidium bromide method. *Int J Antimicrob Agents.* 2008;31(5):458–62.
92. Viveiros M, Martins M, Couto I, Rodrigues L, Spengler G, Martins A. New Methods for the Identification of Efflux Mediated MDR Bacteria, Genetic Assessment of Regulators and Efflux Pump Constituents, Characterization of Efflux Systems and Screening for Inhibitors of Efflux Pumps. *Curr Drugs Targets.* 2008;9(9):760–78.
93. Paixão L, Rodrigues L, Couto I, Martins M, Fernandes P, de Carvalho CC, *et al.* Fluorometric determination of ethidium bromide efflux kinetics in *Escherichia coli*. *J Biol Eng.* 2009;3(1):1–13.

94. Pomba C, Rantala M, Greko C, Baptiste KE, Catry B, van Duijkeren E, *et al.* Public health risk of antimicrobial resistance transfer from companion animals. *J Antimicrob Chemother.* 2017 Apr;72(4):957–68.
95. Andrews J. Determination of minimum inhibitory concentrations. *J Antimicrob Chemother.* 2001;48:5–16.
96. European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST). EUCAST reading guide for broth microdilution. Växjö; 2021.
97. Ramos B. Estudo do efluxo e de outros mecanismos na resistência a fluoroquinolonas em *Staphylococcus pseudintermedius*. Dissertação de Mestrado em Ciências Biomédicas. Instituto de Higiene e Medicina Tropical; 2021.
98. Ramos B, Costa SS, Leal M, Morais C, Pomba C, Couto I. Fluoroquinolone resistance and associated mechanisms in *Staphylococcus pseudintermedius*. ID416. Congress of Microbiology and Biotechnology (MicroBiotec) 2021. *Webconference.*
99. European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST). Standard Operating Procedure. MIC distributions and the setting of epidemiological cut-off (ECOFF) values. Växjö; 2017.
100. Espinel-Ingroff A, Turnidge J. The role of epidemiological cutoff values (ECVs/ECOFFs) in antifungal susceptibility testing and interpretation for uncommon yeasts and moulds. *Rev Iberoam Micol.* 2016;33(2):63–75.
101. Turnidge J, Kahlmeter G, Kronvall G. Statistical characterisation of bacterial wild-type MIC value distributions and the determination of epidemiological cut-off values. *Clin Microbiol Infect.* 2006;12(5):418–25.
102. European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST). Standard Operating Procedure. MIC distributions and the setting of epidemiological cutoff (ECOFF) values. Växjö; 2019.
103. Costa SS, Lopes E, Azzali E, Machado D, Coelho T. An Experimental Model for the Rapid Screening of Compounds with Potential Use Against Mycobacteria. *Assay Drug Dev Technol.* 2016;14(9):524–34.

104. Kang M, Chae M, Yoon J, Lee S, Yoo J, Park H. Resistance to fluoroquinolones and methicillin in ophthalmic isolates of *Staphylococcus pseudintermedius* from companion animals. *Can Vet J.* 2014;55(7):678–82.
105. Morais C, Costa SS, Andrade M, Ramos B, Leal M, Abrantes P, *et al.* Molecular characterization of *Staphylococcus pseudintermedius* associated with skin and soft tissue infections in pets, Portugal. ID145. Congress of Microbiology and Biotechnology 2021 (MicroBiotec). *Webconference*
106. Morais C, Costa SS, Andrade M, Ramos B, Leal M, Abrantes P, *et al.* Clonal lineages of *Staphylococcus pseudintermedius* associated with skin and soft tissue infections in pets, Portugal. ID3395. European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases (ECCMID) 2021. *Webconference*
107. Tamura K, Stecher G, Kumar S. MEGA11: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 11. *Mol Biol Evol.* 2021;38(7):3022–7.
108. Chomczynski P, Sacchi N. The single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction: twenty-something years on. *Nat Protoc.* 2006;1(2):581–5.
109. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2^{(-Delta Delta C(T))} Method. *Methods.* 2001 Dec;25(4):402–8.
110. Schmittgen TD, Livak KJ. Analyzing real-time PCR data by the comparative CT method. *Nat Protoc.* 2008;3(6):1101–8.
111. Costa SS, Viveiros M, Rosato A, Melo-Cristino J, Couto I. Impact of efflux in the development of multidrug resistance phenotypes in *Staphylococcus aureus*. *BMC Microbiol.* 2015;15(232):1–16.
112. European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST). The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. Breakpoint tables for interpretation of MICs and zone diameters. Växjö; 2021.
113. Andrade M, Morais C, Abrantes P, Pomba C, Couto I, Costa SS. Biofilm production by *Staphylococcus pseudintermedius* associated with animal

- pyoderma. ID147. Congress of Microbiology and Biotechnology (MicroBiotec) 2021. *Webconference*
114. Ribeiro R. Resistência a antimicrobianos em *Staphylococcus aureus* isolados de animais de companhia. Dissertação de Mestrado em Ciências Biomédicas. Instituto de Higiene e Medicina Tropical; 2019.
 115. Tambat R, Jangra M, Mahey N, Chandal N, Kaur M, Chaudhary S. Microbe-Derived Indole Metabolite Demonstrates Potent Multidrug Efflux Pump Inhibition in *Staphylococcus aureus*. *Front Microbiol.* 2019;10.
 116. Bhaskar BV, Babu TMC, Reddy NV, Rajendra W. Homology modeling, molecular dynamics, and virtual screening of NorA efflux pump inhibitors of *Staphylococcus aureus*. *Drug Des Devel Ther.* 2016;10:3237–52.
 117. Zárate SG, Morales P, Świderek K, Bolanos-Garcia VM, Bastida A. A Molecular Modeling Approach to Identify Novel Inhibitors of the Major Facilitator Superfamily of Efflux Pump Transporters. *Antibiot (Basel, Switzerland).* 2019 Mar;8(1).
 118. Li X-Z, Nikaido H. Efflux-mediated drug resistance in bacteria. *Drugs.* 2004;64(2):159–204.
 119. Buffet-Bataillon S, Tattevin P, Maillard J-Y, Bonnaure-Mallet M, Jolivet-Gougeon A. Efflux pump induction by quaternary ammonium compounds and fluoroquinolone resistance in bacteria. *Future Microbiol.* 2016;11(1):81–92.
 120. Oliveira A, Devesa JSP, Hill PB, Silva V, Poeta P. Treatment of Selected Canine Dermatological Conditions in Portugal - A Research Survey. *J Vet Res.* 2018 Dec;62(4):563–70.
 121. European Medicines Agency (EMA). Sales of veterinary antimicrobial agents in 31 European countries in 2019 and 2020. Amesterdão; 2021.
 122. Yoo J-H, Yoon JW, Lee S-Y, Park H-M. High prevalence of Fluoroquinolone- and Methicillin-resistant *Staphylococcus pseudintermedius* isolates from canine pyoderma and otitis externa in veterinary teaching hospital. *J Microbiol Biotechnol.* 2010 Apr;20(4):798–802.

123. Qekwana DN, Oguttu JW, Sithole F, Odoi A. Patterns and predictors of antimicrobial resistance among *Staphylococcus* spp. from canine clinical cases presented at a veterinary academic hospital in South Africa. BMC Vet Res. 2017 Apr;13(1):116.
124. Onuma K, Tanabe T, Sato H. Antimicrobial resistance of *Staphylococcus pseudintermedius* isolates from healthy dogs and dogs affected with pyoderma in Japan. Vet Dermatol. 2011;23:17-e5.
125. Loiacono M, Martino PA, Albonico F, Dell'Orco F, Ferretti M, Zanzani S, *et al.* High-resolution melting analysis of *gyrA* codon 84 and *glaA* codon 80 mutations conferring resistance to fluoroquinolones in *Staphylococcus pseudintermedius* isolates from canine clinical samples. J Vet Diagn Invest. 2017 Sep;29(5):711–5.
126. Martín-Rodríguez AJ, Babarro JMF, Lahoz F, Sansón M, Martín VS, Norte M, *et al.* From broad-spectrum biocides to quorum sensing disruptors and mussel repellents: antifouling profile of alkyl triphenylphosphonium salts. PLoS One. 2015;10(4):e0123652.
127. McDonnell G. Antisepsis, Disinfection, and Sterilization: Types, Action, and Resistance. 2nd ed. ASM Press, editor. Washington; 2017. 432 p.
128. Lei Q, Lai X, Zhang Y, Li Z, Li R, Zhang W, *et al.* PEGylated Bis-Quaternary Triphenyl-Phosphonium Tosylate Allows for Balanced Antibacterial Activity and Cytotoxicity. Appl Bio Mater. 2020;3(9):6400–7.
129. Kanazawa A, Ikeda T, Endo T. A novel approach to mode of action of cationic biocides: morphological effect on antibacterial activity. J Appl Bacteriol. 1995 Jan;78(1):55–60.
130. Perkins A, Sellon D, Gay J, Lofgren E, Moore D, Jones L, *et al.* Prevalence of methicillin-resistant *Staphylococcus pseudintermedius* on hand-contact and animal-contact surfaces in companion animal community hospitals. Can Vet J La Rev vétérinaire Can. 2020;61(6):613–20.
131. Murphy C, Reid-Smith R, Boerlin P, Weese JS, Prescott J, Janecko N, *et al.* *Escherichia coli* and selected veterinary and zoonotic pathogens isolated from

- environmental sites in companion animal veterinary hospitals in southern Ontario. *Can Vet J.* 2010;51(9):963–72.
132. Vali L, Davies SE, Lai LLG, Dave J, Amyes SGB. Frequency of biocide resistance genes, antibiotic resistance and the effect of chlorhexidine exposure on clinical methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates. *J Antimicrob Chemother.* 2008 Mar;61(3):524–32.
133. Valentine BK, Dew W, Yu A, Weese JS. In vitro evaluation of topical biocide and antimicrobial susceptibility of *Staphylococcus pseudintermedius* from dogs. *Vet Dermatol.* 2012 Dec;23(6):493-e95.
134. Clark SM, Loeffler A, Bond R. Susceptibility in vitro of canine methicillin-resistant and -susceptible staphylococcal isolates to fusidic acid, chlorhexidine and miconazole: opportunities for topical therapy of canine superficial pyoderma. *J Antimicrob Chemother.* 2015 Jul;70(7):2048–52.

6. Anexos

Tabela A 1. Caracterização das estirpes de *S. pseudintermedius* recolhidos em SSTIs de animais de companhia proveniente do Laboratório de Resistência aos Antibióticos (FMV/UL) e de um laboratório de diagnóstico veterinário (Lisboa).

| Estirpe | Material Biológico | Ano de colheita | Animal de origem |
|---|------------------------|-----------------|------------------|
| Laboratório de Resistência aos Antibióticos (FMV/UL) | | | |
| BIOS-V7 | Zaragatoa cutânea | 2015 | Cão |
| BIOS-V10 | Zaragatoa de pele | 2018 | Cão |
| BIOS-V11 | Zaragatoa de pele | 2018 | Cão |
| BIOS-V12 | Zaragatoa cutânea | 2018 | Cão |
| BIOS-V13 | Zaragatoa da pata | 2018 | Cão |
| BIOS-V14 | Zaragatoa cutânea | 2018 | Cão |
| BIOS-V15 | Zaragatoa cutânea | 2018 | Cão |
| BIOS-V16 | Zaragatoa interdigital | 2018 | Cão |
| BIOS-V18 | Zaragatoa de pele | 2018 | Cão |
| BIOS-V25 | Zaragatoa cutânea | 2016 | Cão |
| BIOS-V26 | Biópsia | 2017 | Cão |
| BIOS-V27 | Zaragatoa de pele | 2018 | Cão |
| BIOS-V28 | Zaragatoa de pele | 2018 | Cão |
| BIOS-V29 | Zaragatoa interdigital | 2018 | Cão |
| BIOS-32 | Zaragatoa cutânea | 2018 | Cão |
| BIOS-V34 | Zaragatoa de pele | 2018 | Cão |
| BIOS-V36 | Biópsia de pele | 2017 | Cão |
| BIOS-V37 | Zaragatoa de pele | 2018 | Cão |
| BIOS-V38 | Zaragatoa de pele | 2018 | Cão |
| BIOS-V39 | Biópsia de pele | 2016 | Cão |
| BIOS-V40 | Zaragatoa cutânea | 2016 | Cão |
| BIOS-V48 | Secreção | 2014 | Cão |
| BIOS-V49 | Zaragatoa cutânea | 2015 | Cão |
| BIOS-V50 | Pústula | 2015 | Cão |
| BIOS-V52 | Biópsia de pele | 2017 | Cão |
| BIOS-V53 | Zaragatoa de pele | 2015 | Cão |
| BIOS-V54 | Zaragatoa cutânea | 2018 | Cão |
| BIOS-V55 | Zaragatoa de pele | 2014 | Cão |
| BIOS-V56 | Zaragatoa de pele | 2014 | Cão |
| BIOS-V57 | Zaragatoa de pele | 2015 | Cão |

Tabela A 1. (Continuação).

| Estirpe | Material Biológico | Ano de colheita | Animal de origem |
|---|----------------------------------|-----------------|------------------|
| Laboratório de Resistência aos Antibióticos (FMV/UL) | | | |
| BIOS-V58 | Zaragatoa de pele | 2014 | Cão |
| BIOS-V59 | Zaragatoa de pele | 2017 | Cão |
| BIOS-V64 | Zaragatoa interdigital | 2018 | Cão |
| BIOS-V65 | Zaragatoa cutânea | 2018 | Cão |
| BIOS-V66 | Zaragatoa pregas labias | 2015 | Cão |
| BIOS-V67 | Zaragatoa cutânea | 2018 | Cão |
| BIOS-V68 | Zaragatoa de pele de axila | 2015 | Cão |
| BIOS-V71 | Zaragatoa de três pústulas | 2015 | Cão |
| BIOS-V72 | Zaragatoa de pele | 2018 | Cão |
| BIOS-V73 | Zaragatoa cutânea | 2017 | Cão |
| BIOS-V77 | Zaragatoa | 2015 | Cão |
| BIOS-V78 | Zaragatoa escrotal | 2015 | Cão |
| BIOS-V79 | Zaragatoa cutânea | 2015 | Cão |
| BIOS-V82 | Zaragatoa crostas epidérmicas | 2015 | Cão |
| BIOS-V83 | Zaragatoa pústula zona abdominal | 2015 | Cão |
| BIOS-V84 | Zaragatoa de pústula | 2015 | Cão |
| BIOS-V87 | Zaragatoa | 2014 | Cão |
| BIOS-V88 | Zaragatoa de crostas | 2015 | Cão |
| BIOS-V89 | Pele-granuloma | 2015 | Cão |
| BIOS-V90 | Zaragatoa de pele | 2015 | Cão |
| BIOS-V92 | Zaragatoa de pele | 2005 | Cão |
| BIOS-V96 | Zaragatoa | 2015 | Cão |
| BIOS-V97 | Zaragatoa de sutura | 2015 | Cão |
| BIOS-V99 | Zaragatoa de ferida crônica | 2015 | Cão |
| BIOS-V101 | Zaragatoa de pele | 2017 | Cão |
| BIOS-V102 | Zaragatoa de pele | 2015 | Cão |
| BIOS-V103 | Zaragatoa interdigital | 2015 | Cão |
| BIOS-V104 | Zaragatoa de fístula | 2014 | Cão |
| BIOS-V105 | Zaragatoa cutânea | 2017 | Cão |
| BIOS-V106 | Biópsia profunda | 2017 | Cão |
| BIOS-V108 | Pele-granuloma | 2015 | Cão |
| BIOS-V110 | Zaragatoa de pele | 2015 | Cão |
| BIOS-V112 | Zaragatoa interdigital | 2016 | Cão |

Tabela A 1. (Continuação).

| Estirpe | Material Biológico | Ano de colheita | Animal de origem |
|---|--|-----------------|------------------|
| Laboratório de Resistência aos Antibióticos (FMV/UL) | | | |
| BIOS-V113 | Pústula zona abdominal | 2018 | Cão |
| BIOS-V114 | Fístula de dermatite no membro posterior | 2015 | Cão |
| BIOS-V116 | Pústulas cutâneas | 2015 | Cão |
| BIOS-V117 | Zaragatoa de pele | 2018 | Cão |
| BIOS-V119 | Zaragatoa de pele | 2018 | Cão |
| BIOS-V120 | Zaragatoa de pele | 2017 | Cão |
| BIOS-V121 | Zaragatoa de pele | 2018 | Cão |
| BIOS-V122 | Zaragatoa de pata | 2018 | Cão |
| BIOS-V123 | Exsudado cutâneo | 2015 | Cão |
| BIOS-V124 | Zaragatoa perilabial | 2015 | Cão |
| BIOS-V125 | Punção aspirativa por agulha fina exterior | 2015 | Cão |
| BIOS-V127 | Zaragatoa cutânea | 2016 | Cão |
| BIOS-V130 | Abcesso paracostal | 2003 | Coelho |
| BIOS-V131 | Zaragatoa de dedo (base da unha) | 2014 | Cão |
| BIOS-V132 | Zaragatoa de ferida crônica | 2015 | Cão |
| BIOS-V133 | Zaragatoa cutânea | 2014 | Cão |
| BIOS-V134 | Zaragatoa interdigital | 2014 | Cão |
| BIOS-V135 | Zaragatoa de pústula | 2015 | Cão |
| BIOS-V136 | Zaragatoa perilabial | 2015 | Cão |
| BIOS-V137 | Zaragatoa de pele | 2014 | Cão |
| BIOS-V138 | Zaragatoa de pata | 2018 | Cão |
| BIOS-V140 | Zaragatoa cutânea | 2015 | Cão |
| BIOS-V142 | Zaragatoa de pele após desinfecção | 2014 | Cão |
| BIOS-V143 | Zaragatoa de lesões de membros posteriores | 2014 | Cão |
| BIOS-V144 | Zaragatoa de pústula | 2014 | Cão |
| BIOS-V145 | Pústula ventral | 2018 | Cão |
| BIOS-V146 | Zaragatoa cutânea | 2015 | Cão |
| Laboratório de Diagnóstico Veterinário | | | |
| BIOS-V162 | Zaragatoa de lesão nodular | 2018 | Cão |
| BIOS-V164 | Zaragatoa de ferida cirúrgica | 2018 | Cão |
| BIOS-V167 | Zaragatoa de abscesso submandibular | 2018 | Cão |
| BIOS-V170 | Zaragatoa de abscesso no braço | 2018 | Cão |
| BIOS-V175 | Zaragatoa de pele | 2018 | Cão |

Tabela A 1. (Continuação).

| Estirpe | Material Biológico | Ano de colheita | Animal de origem |
|---|---|-----------------|------------------|
| Laboratório de Diagnóstico Veterinário | | | |
| BIOS-V176 | Zaragatoa cutânea | 2018 | Cão |
| BIOS-V179 | Zaragatoa cutânea | 2018 | Cão |
| BIOS-V182 | Zaragatoa subcutânea | 2018 | Cão |
| BIOS-V188 | Zaragatoa de abcesso no membro posterior | 2018 | Cão |
| BIOS-V189 | Zaragatoa pioderma | 2018 | Cão |
| BIOS-V190 | Placa-pápula na axila | 2018 | Cão |
| BIOS-V194 | Zaragatoa de pele (dermatite atópica) | 2018 | Cão |
| BIOS-V195 | Zaragatoa cutânea | 2018 | Cão |
| BIOS-V196 | Zaragatoa de pele | 2018 | Cão |
| BIOS-V207 | Zaragatoa de ferida na coxa | 2018 | Gato |
| BIOS-V211 | Zaragatoa cutânea | 2018 | Cão |
| BIOS-V212 | Zaragatoa interdigital | 2018 | Cão |
| BIOS-V213 | Zaragatoa material cx de amputação | 2018 | Cão |
| BIOS-V214 | Zaragatoa de pele | 2018 | Cão |
| BIOS-V217 | Zaragatoa de pele | 2018 | Cão |
| BIOS-V218 | Zaragatoa de pele | 2018 | Cão |
| BIOS-V219 | Zaragatoa de pele- axila direita | 2018 | Cão |
| BIOS-V221 | Zaragatoa de pele | 2018 | Cão |
| BIOS-V223 | Zaragatoa de local de cirurgia | 2018 | Cão |
| BIOS-V224 | Zaragatoa de massa na face | 2018 | Cão |
| BIOS-V225 | Zaragatoa interdigital | 2018 | Cão |
| BIOS-V226 | Zaragatoa fleximão do membro pélvico esquerdo | 2018 | Cão |
| BIOS-V227 | Zaragatoa de pústulas na face | 2018 | Cão |
| BIOS-V228 | Zaragatoa de pele (membro pélvico esquerdo e comedão) | 2018 | Cão |
| BIOS-V230 | Biópsia membro pélvico esquerdo proximal e distal | 2018 | Cão |
| BIOS-V231 | Zaragatoa de pele | 2018 | Cão |
| BIOS-V233 | Zaragatoa de pápula | 2018 | Cão |
| BIOS-V234 | Zaragatoa de pele | 2018 | Cão |
| BIOS-V235 | Zaragatoa de pústulas cutâneas | 2018 | Cão |
| BIOS-V236 | Zaragatoa de pele | 2018 | Cão |
| BIOS-V237 | Zaragatoa de torso | 2018 | Cão |
| BIOS-V238 | Zaragatoa de pele da axila | 2018 | Cão |

Tabela A 1. (Continuação).

| Estirpe | Material Biológico | Ano de colheita | Animal de origem |
|---|---|-----------------|------------------|
| Laboratório de Diagnóstico Veterinário | | | |
| BIOS-V239 | Zaragatoa de membro | 2018 | Cão |
| BIOS-V240 | Zaragatoa de ferida de fratura | 2018 | Gato |
| BIOS-V241 | Zaragatoa de granuloma | 2018 | Cão |
| BIOS-V242 | Zaragatoa de biópsia | 2018 | Cão |
| BIOS-V244 | Zaragatoa de pele | 2018 | Cão |
| BIOS-V247 | Zaragatoa de calo no cotovelo | 2018 | Cão |
| BIOS-V249 | Zaragatoa cutânea | 2018 | Cão |
| BIOS-V251 | Zaragatoa de exsudado | 2018 | Cão |
| BIOS-V259 | Zaragatoa de pele | 2018 | Cão |
| BIOS-V260 | Zaragatoa de prepúcio | 2018 | Cão |
| BIOS-V262 | Punch dérmico | 2018 | Cão |
| BIOS-V263 | Placa-piodermite e pápula | 2018 | Cão |
| BIOS-V264 | Zaragatoa interdigital (III e IV) do membro anterior esquerdo | 2018 | Cão |
| BIOS-V268 | Zaragatoa de exsudado cutâneo | 2018 | Cão |
| BIOS-V270 | Zaragatoa de ferida cutânea | 2018 | Cão |
| BIOS-V273 | Zaragatoa de ferida | 2018 | Cão |
| BIOS-V276 | Zaragatoa de coxa | 2018 | Cão |
| BIOS-V280 | Material cirúrgico | 2018 | Cão |
| BIOS-V281 | Zaragatoa de pele | 2018 | Cão |
| BIOS-V285 | Zaragatoa de pele | 2018 | Cão |
| BIOS-V286 | Zaragatoa de pústula | 2018 | Cão |
| BIOS-V287 | Zaragatoa de pele | 2018 | Cão |
| BIOS-V290 | Zaragatoa do queixo | 2018 | Cão |
| BIOS-V292 | Zaragatoa de discência de sutura | 2018 | Gato |
| BIOS-V297 | Zaragatoa de pele | 2018 | Cão |
| BIOS-V298 | Zaragatoa cutânea | 2018 | Cão |
| BIOS-V299 | Zaragatoa de furunculose interdigital | 2018 | Cão |
| BIOS-V302 | Zaragatoa de pele | 2018 | Cão |