

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE VETERINÁRIA
DEPARTAMENTO DE PATOLOGIA CLÍNICA VETERINÁRIA
LABORATÓRIO DE BACTERIOLOGIA VETERINÁRIA**

Caracterização do perfil de virulência de isolados de *Staphylococcus pseudintermedius*

Autora: Bianca Fagundes Saggin

PORTO ALEGRE

2019/2

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE VETERINÁRIA
DEPARTAMENTO DE PATOLOGIA CLÍNICA VETERINÁRIA
LABORATÓRIO DE BACTERIOLOGIA VETERINÁRIA**

Caracterização do perfil de virulência de isolados de *Staphylococcus pseudintermedius*

Autora: Bianca Fagundes Saggin

Trabalho apresentado à Faculdade de Veterinária como requisito parcial para a obtenção da graduação em Medicina Veterinária

Orientadora: Prof^ª. Dr^ª. Franciele Maboni Siqueira

PORTO ALEGRE

2019/2

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a minha família, meus pais Vanice e Roger, meu irmão Giovani e avô Aluísio por me darem todo suporte que precisei, tanto emocional quanto financeiro, e por sempre estarem ao meu lado. Vocês fazem parte disso tudo e são, com certeza, o que eu tenho de mais valioso no mundo! Agradeço também ao meu namorado pela paciência nos momentos de crise durante a graduação e por sempre me lembrar de fazer tudo que está ao meu alcance, mas ao mesmo tempo nunca subestimar o meu alcance.

Agradeço as minhas amigas do colégio Karina e Bruna por compartilharem comigo uma amizade tão linda, e por se fazerem presentes sempre que possível durante o período da graduação, mostrando que mesmo não se vendo todos os dias, nosso sentimento nunca muda.

Quero agradecer também as grandes amizades que eu fiz durante a faculdade, em especial Alice, Ana Paula, Ana Vallim, Binha, Brenda, Cassi, Duda, Isa, Kirian, Pati, Pri, Nina, Mari, Robi, Thati e Veri. O nosso grupo era imenso, assim como meu amor e admiração por vocês! Obrigada por compartilharem todas as sensações que a faculdade nos proporcionou, pelas risadas falando bobagem, por sempre servirem de apoio e pelos lanches coletivos que vão deixar saudade!

E também agradeço imensamente aos meus amigos que fiz durante o intercâmbio por todos os bons momentos, aos queridos brasileiros Mariana, Letícia e Marcelo, obrigada por compartilharem comigo todas as sensações doidas que o intercâmbio nos trouxe!

Também sou grata a todos os professores que contribuíram para minha formação, e gostaria de agradecer em especial aos colegas e professores do Laboratório de Imunologia Veterinária, do Setor de Grandes Ruminantes e Laboratório de Virologia Veterinária, tudo que aprendi com vocês foi indispensável pra eu ser quem sou hoje, muito obrigada por tudo! Não menos importante, gostaria de agradecer minhas queridas colegas do LaBacVet, o lugar que nesse último ano se tornou minha segunda casa, e que tenho o imenso prazer de compartilhar com pessoas incríveis que me inspiram todos os dias! Também gostaria de agradecer minha querida professora e orientadora Franciele, que sempre esteve a disposição, sempre me incentivou e é exemplo de profissional e de pessoa, tem minha total admiração!

Por fim gostaria de deixar um agradecimento especial à minha querida avó Maria de Lurdes, que não está mais presente entre nós, mas que desde sempre comemorou e vibrou comigo a cada passo dado e a cada conquista minha. Hoje estou perto de mais uma conquista e saibas que quando eu comemorar, feliz, eu vou estar pensando em ti!

RESUMO

O agente bacteriano *Staphylococcus pseudintermedius* é um patógeno oportunista, responsável por uma ampla gama de infecções, principalmente em cães, incluindo piodermatite, otite externa, bacteremia, infecções do trato urinário e infecções pós-cirúrgicas. Esta espécie é capaz de sintetizar uma série de toxinas. Essas, porém, ainda não foram caracterizadas detalhadamente e há divergência entre o perfil de toxinas presentes nos isolados. Para trazer mais informações a respeito do potencial patogênico dessa espécie, 33 isolados de *S. pseudintermedius* provindos de diferentes sítios de infecção foram investigados através de identificação molecular quanto à presença do gene de resistência à antimicrobianos *mecA*, e para 11 genes codificadores de toxinas: citotoxinas (*lukS*, *lukF*), toxina esfoliativa (*siet*), enterotoxinas (*sea*, *seb*, *sec*, *seccanine*, *sel*, *sem* e *seq*) e toxina da síndrome do choque tóxico (*tst-1*). Os mesmos isolados foram submetidos ao teste de formação de biofilme *in vitro*, e ao teste de susceptibilidade aos antimicrobianos. Os resultados mostraram que 81 % dos isolados foram positivos para *lukS*, 90 % foram positivos para *lukF* e 87 % positivos para *siet*. Já outros genes foram de detecção menos frequente, como *seq* (12 %), *sel* (9 %) e *sem* (3 %). Os genes, *sea*, *seb*, *sec*, *seccanine* e *tst-1*, não foram detectados em nenhum dos isolados do presente estudo. Os isolados fenotipicamente resistentes à oxacilina foram previamente descritos como positivos para *mecA*, e dentre os 14 isolados fenotipicamente suscetíveis à oxacilina, somente um deles foi positivo para o mesmo gene. Referente a resistência aos antimicrobianos, 57,5 % apresentaram o padrão fenotípico de cepas oxacilina resistentes, enquanto que 42,4 % foram descritas como sensíveis. Já o percentual de isolados multirresistentes foi de 84,8 %. Com exceção de um isolado, todos os demais foram classificados como fortes formadores de biofilme. Em conclusão, a alta prevalência de genes codificadores de toxinas, a forte capacidade de formação de biofilme e os diversos perfis de multirresistência aos antimicrobianos sugerem o grande potencial patogênico e virulento desta espécie, e também pôde-se observar que existe uma variação da presença de alguns desses fatores conforme o sítio de infecção do isolado.

Palavras-chave: *Staphylococcus pseudintermedius*, biofilme, MRSP, MSSP, toxinas

ABSTRACT

The bacterial agent Staphylococcus pseudintermedius is a timely pathogen, responsible for a range of infections, mainly in dogs, including pyodermatitis, external otitis, bacteremia, urinary tract infections and post-surgery infections. This species is capable of synthesizing a series of toxins and, besides these not being described in detail so far, there are divergences between the data published, where the presence of these toxins varies, bringing a greater need for studies on this topic. To provide more information about the pathogenic potential of this species, 33 isolates of S. pseudintermedius from different infection sites were screened by molecular identification for the mecA antimicrobial resistance gene, and for 11 toxin coding genes: cytotoxins (lukS), lukF), exfoliative toxin (siet), enterotoxins (sea, seb, sec, seccanine, sel, sem and seq) and toxic shock syndrome toxin (tst-1). The same isolates were submitted to the in vitro biofilm formation test and the antimicrobial susceptibility test. Results showed that 81 % of isolates were positive for lukS, 90 % were positive for lukF and 87 % positive for siet. Other genes were less frequent detection, such as seq (12 %), sel (9 %) and sem (3 %). The genes, sea, seb, sec, seccanine and tst-1 were not detected in any of the isolates of the present study. Phenotypically oxacycline-resistant isolates were previously described as positive for mecA, and of the 14 phenotypically oxacycline-susceptible isolates, only one was positive for the same gene. Regarding antimicrobial resistance, 57.5 % presented the phenotypic pattern of resistant oxacillin strains, while 42.4 % were described as sensitive. The percentage of Multidrug resistant isolates was 84.8 %. With the exception of one isolate, all others were classified as strong biofilm forming. In conclusion, the high prevalence of toxin-coding genes, the strong biofilm formation capacity and the diverse antimicrobial multidrug resistance profiles suggest the great pathogenic and virulent potential of this species, and it was also observed that there is a variation in the presence of some of these factors depending on the site of infection of the isolate.

Key-words: *Staphylococcus pseudintermedius, biofilm, MRSP, MSSP, toxins*

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- Figura 1** – Diagrama esquemático simplificado ilustrativo dos fatores de virulência secretados e associados à parede celular de *Staphylococcus pseudintermedius*..... 13
- Figura 2** – Microscopia eletrônica de varredura da formação do biofilme de cepa *Staphylococcus pseudintermedius* resistente à meticilina em parafusos ortopédicos em aço inoxidável 316L..... 19
- Figura 3** – Perfil de resistência dos isolados de *Staphylococcus pseudintermedius* aos antimicrobianos..... 31
- Figura 4** – Diagrama de Venn correlacionando a identificação de genes codificadores de toxinas entre as cepas MRSP e MSSP..... 31

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Sequências de <i>primers</i> e condições térmicas de amplificação para realização de PCR para cada gene de virulência.....	27
Tabela 2 – Perfil de virulência em <i>Staphylococcus pseudintermedius</i> Identificação dos genes de toxinas, gene <i>mecA</i> , detecção de resistência à oxacilina e intensidade de formação de biofilme <i>in vitro</i>	29

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	8
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	9
2.1	<i>Staphylococcus pseudintermedius</i>.....	9
2.2	Fatores de virulência de <i>Staphylococcus pseudintermedius</i>.....	11
2.2.1	Citotoxinas.....	13
2.2.2	Toxinas esfoliativas.....	14
2.2.3	Toxinas pirogênicas com propriedades de superantígeno.....	16
2.2.4	Outros fatores de virulência descritos em <i>Staphylococcus pseudintermedius</i>	18
2.3	Formação de biofilme por <i>Staphylococcus pseudintermedius</i>.....	18
3	ARTIGO CIENTÍFICO.....	22
4	CONCLUSÕES.....	36
	REFERÊNCIAS.....	37

1 INTRODUÇÃO

Staphylococcus pseudintermedius é um agente comensal presente na pele e mucosas de cães e gatos, que está associado principalmente às dermatites e otites, mas também à bacteremia, infecções do trato urinário e infecções pós-cirúrgicas (BANNOEHR *et al.*, 2012). Nos últimos anos, cepas de *S. pseudintermedius* resistentes à meticilina (MRSP) emergiram de maneira global, chamando atenção por sua resistência antimicrobiana e perfil de virulência (MENANDRO *et al.*, 2019) trazendo preocupação acerca do tratamento das doenças causadas por esta espécie.

Além de sua capacidade de formação de biofilme, *S. pseudintermedius* é capaz de produzir uma variedade de fatores de virulência incluindo enzimas como coagulase, termonuclease e proteases; proteínas de superfície como o fator aglutinante e proteína A; e toxinas como citotoxinas, toxina esfoliativa e enterotoxinas (BANNOEHR; GUARDABASSI, 2012). No entanto, a maioria dos fatores de virulência do *S. pseudintermedius*, principalmente no que diz respeito a síntese de toxinas, ainda não foi caracterizada em detalhes, trazendo a necessidade de se buscar uma maior elucidação sobre a patogênese deste agente.

Portanto, devido à importância deste agente e a carência de informações sobre a virulência da espécie, o objetivo deste trabalho de conclusão de curso foi promover uma revisão bibliográfica acerca dos fatores de patogenicidade de *S. pseudintermedius*, incluindo síntese de toxinas e produção de biofilme, bem como trazer um panorama a respeito da existência de cepas de *S. pseudintermedius* resistentes à meticilina. Também, foi realizado um trabalho de pesquisa onde buscou-se determinar o potencial patogênico de isolados de *S. pseudintermedius* através da identificação molecular de genes codificadores de toxinas, investigação do potencial de formação de biofilme e perfil de resistência aos antimicrobianos, para, por fim, correlacionar as características encontradas e trazer mais informações sobre o tema.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 *Staphylococcus pseudintermedius*

Por mais de 30 anos, os isolados de *Staphylococcus pseudintermedius* foram nomeados como *Staphylococcus intermedius*, sendo este considerado o agente comumente isolado de afecções de pele e tecidos moles em cães (BANNOEHR *et al.*, 2012). No entanto, foi constatada diversidade genotípica e fenotípica nessa espécie, sugerindo que a mesma poderia sofrer nova classificação (HAJEK, 1976; DEVRIESE *et al.*, 2005). Atualmente já se sabe que isolados fenotipicamente identificados como *S. intermedius* são diferenciados em quatro espécies distintas, *S. intermedius*, *S. pseudintermedius*, *Staphylococcus delphini* e, recentemente descrito, *Staphylococcus cornubiensis*, onde, juntos, são inseridos no grupo *Staphylococcus intermedius* (SIG, do inglês *Staphylococcus intermedius group*) (BANNOEHR *et al.*, 2007; SASAKI *et al.*, 2007; MURRAY *et al.*, 2018). Desde a reclassificação, quando algum membro do SIG é isolado, é considerada essencial a realização de confirmação molecular, ou por espectrometria de massas, para a identificação da espécie.

Em cães saudáveis, *S. pseudintermedius* constitui a microbiota da pele e regiões mucocutâneas e, como agente oportunista, é o patógeno bacteriano isolado mais frequentemente em amostras clínicas caninas (BANNOEHR; GUARDABASSI, 2012). Esta espécie está, principalmente, associada à piodermatite, otite externa, bacteremia, infecções do trato urinário e infecções pós-cirúrgicas.

O diagnóstico de infecções por *S. pseudintermedius* é realizado a partir de variadas espécimes clínicas, como suabes de lesões de pele, amostra de urina, suabe de ouvido, boca ou junções muco cutâneas. Esse agente é tradicionalmente identificado no laboratório pela observação da morfologia das colônias, testes de padrões fenotípicos, seguidos de confirmação molecular. As colônias são de tamanho médio, elevadas, não pigmentadas e exibem grande e incompleta área de β -hemólise e pequena e completa área de α -hemólise, isoladamente ou em combinação (dupla hemólise), em ágar sangue bovino ou ovino (BANNOEHR; GUARDABASSI, 2012). Os resultados dos testes fenotípicos para identificar *S. pseudintermedius* e diferenciá-lo de outras espécies estafilocócicas isoladas de cães incluem coagulase positiva, produção de acetoina negativa, reação negativa para o teste de pirrolidonil arilamidase, positividade para o teste de β -galactosidase, suscetibilidade à polimixina B, e resultado positivo quando submetido ao teste de produção de ácido a partir de D-manitol (CHUANG *et al.*, 2010; BANNOEHR; GUARDABASSI, 2012;). Ainda, ensaios

moleculares são hoje amplamente empregados para a confirmação da identidade de *S. pseudintermedius*, trazendo como vantagem a alta especificidade e rapidez ao diagnóstico. Mais recentemente, o emprego da espectrometria de massas (MALDI-TOF) tem permitido a identificação rápida e precisa de micro-organismos, incluindo *S. pseudintermedius*.

O padrão de susceptibilidade aos antimicrobianos de cepas patogênicas de *S. pseudintermedius* varia com o histórico clínico do paciente. E, nos últimos anos, têm sido observada a seleção de cepas com um alto perfil de resistência a drogas que são tidas como de eleição para o tratamento desta bactéria, como amoxicilina/ácido clavulânico, cefalexina, clindamicina, doxiciclina, fluoroquinolonas, cloranfenicol, aminoglicosídeos e rifampicina (HILLIER *et al.*, 2014). Além disso, a disseminação mundial de cepas resistentes à meticilina (MRSP, do inglês *Meticillin-resistant Staphylococcus pseudintermedius*) complica o tratamento dessas infecções, tornando-as causas mais comuns de infecção de sítio cirúrgico em ambiente veterinário (SINGH *et al.*, 2013).

Semelhante ao que ocorre em *Staphylococcus aureus* resistente à meticilina (MRSA), a resistência de MRSP é influenciada por vários fatores, mas o principal determinante é o gene *mecA* que codifica uma proteína de ligação à penicilina modificada (PBP). A PBP modificada de MRSP tem uma baixa afinidade por betalactâmicos e, como antibióticos betalactâmicos se ligam à PBP de *S. pseudintermedius* para prevenir a síntese da membrana celular pela bactéria, a baixa afinidade não permite uma forte ligação e, portanto, a síntese da membrana celular não é impedida por estes antimicrobianos (BROWN; REYNOLDS, 1980). O gene *mecA* é localizado no cromossomo de *S. pseudintermedius* em uma estrutura genética denominada "cassete cromossômico estafilocócico" (SCCmec). O elemento SCCmec pode ser transferido entre diferentes espécies de *Staphylococcus* (KATAYAMA; ITO; HIRAMATSU, 2000).

No passado, de maneira geral, os isolados de *S. pseudintermedius* eram suscetíveis à antibióticos betalactâmicos (PELLERIN *et al.*, 1997; VAN DUIJKEREN *et al.*, 2004), porém, com o passar do tempo tornaram-se mais frequentes os relatos de cepas resistentes à essas drogas. A emergência de cepas MRSP tem sido relatada desde 2006 (WEESE; VAN DUIJKEREN, 2010), ainda que seja difícil definir o início desse surgimento com absoluta exatidão.

A prevalência da colonização de cepas MRSP tem sido estudada em várias populações de cães, chegando a taxas de 1,5 – 31,6 % em cães na comunidade ou atendidos em hospitais veterinários, 0 – 21 % em cães com infecções de pele (WEESE; VAN DUIJKEREN, 2010; MENANDRO *et al.*, 2019) e 30 – 38 % em cães atendidos em clínicas veterinárias (SASAKI

et al., 2007; NISA *et al.*, 2019). Já em gatos, a prevalência de cepas MRSP foi de 4 % em animais saudáveis enquanto que nenhum isolado foi encontrado nos animais com infecções de pele (ABRAHAM *et al.*, 2007).

Atualmente, a colonização e infecção por MRSP em humanos já não é considerada tão rara (PAUL *et al.*, 2011; VAN DUIJKEREN *et al.*, 2011; WALTHER *et al.*, 2012; LOZANO *et al.*, 2017), e a potencial transferência de novos elementos SCCmec de MRSP para outras espécies estafilocócicas, como *S. aureus*, e a subsequente disseminação clonal de um novo clone de MRSA podem trazer riscos para a saúde humana (VAN DUIJKEREN *et al.*, 2004).

A patogenia de *S. pseudintermedius* está associada a sua capacidade de adesão às células epiteliais do hospedeiro, invasão do tecido, evasão do sistema imune e disseminação (HILL; IMAI, 2016). Geneticamente, esta bactéria pode apresentar diferentes perfis gênicos, com potenciais virulentos variáveis, sendo que a expressão destes fatores dependerá da interação com o hospedeiro, bem como da capacidade de resposta imunológica do mesmo. A patogenia de *S. pseudintermedius* tem grande semelhança com *S. aureus*, no entanto, alguns genes envolvidos nos processos parecem ser distintos, além de que, mesmo os genes ortólogos compartilham um baixo grau de similaridade genética.

2.2 Fatores de virulência de *Staphylococcus pseudintermedius*

S. pseudintermedius é capaz de sintetizar uma série de fatores de virulência para garantir sua adesão, invasão, evasão do sistema imune e disseminação (Quadro 1).

Quadro 1 – Fatores de virulência de *Staphylococcus pseudintermedius* e sua ação sobre os tecidos do hospedeiro

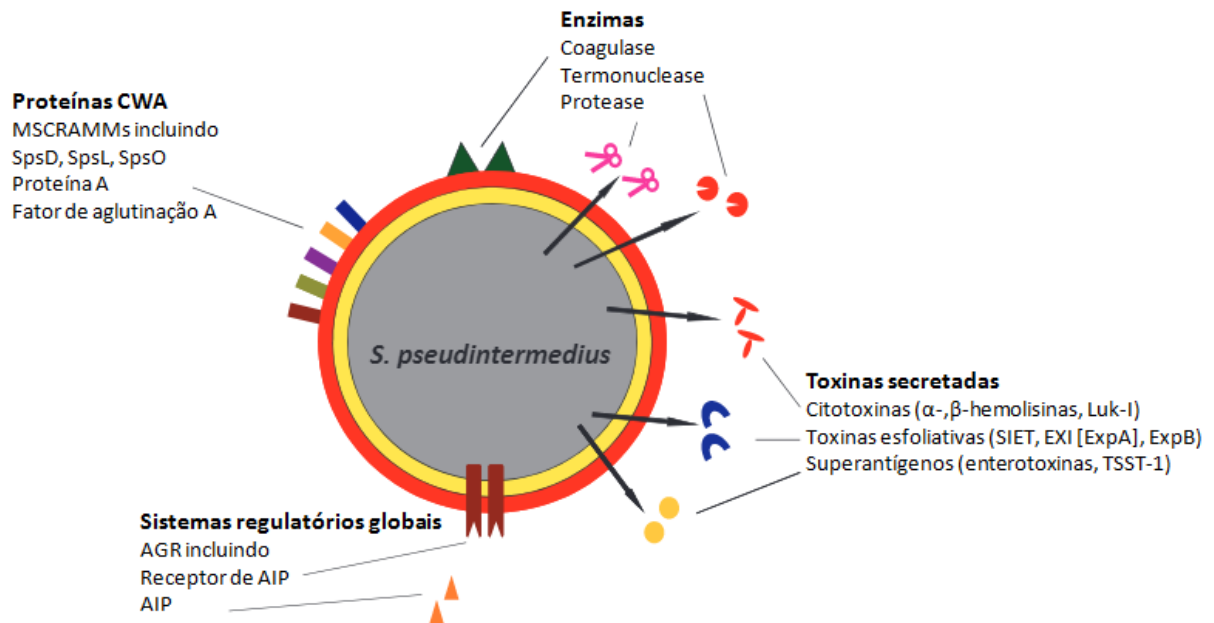
Determinantes da virulência	Ação sobre os tecidos do hospedeiro
1. Polissacarídeo capsular	Antifagocítica
2. Composição da superfície celular Peptidoglicano Ácido teicóico	Piogênico, quimioatrativo Induzem liberação de citocinas
3. Proteínas da superfície celular Proteína A Proteína de ligação ao fibrinogênio Proteína de ligação à fibrinectina Proteína de ligação à laminina	Interage com a região Fc da IgG Liga-se ao fibrinogênio Liga-se à fibrinectina Liga-se à laminina

Proteína de ligação ao colágeno	Liga-se ao colágeno
Proteína de ligação à vitronectina	Liga-se à vitronectina
4. Toxinas extracelulares	
α , β , γ , δ toxinas	Citotóxica para tecidos e leucócitos
Leucocidina I	Destrói leucócitos (leucocida)
Tox. Sínd. Choque Tóx.(TST-1)	Liga-se às moléculas do MHC da classe II Induz síntese de citocinas: múltiplas disfunções orgânicas
Enterotoxinas	Emética e diarreica ou somente diarreica
Toxina Esfoliativa	Lisa a ligação da célula com estrato granuloso
5. Enzimas	
Coagulase	Catalisa a conversão de fibrinogênio em fibrina
Catalase	Transformação de peróxido de hidrogênio em oxigênio e água
Lipase	Degrada os lipídios
Proteases	Degrada proteínas, incluindo proteínas de defesa do hospedeiro
Fosfolipase	Degrada fosfolipídios
Estafiloquinase	Converte plasminogênio em plasmina fibrinolítica
Hialuronidase	Degrada o ácido hialurônico
Nuclease	Cliva DNA ou RNA

Fonte: próprio autor.

Os componentes da superfície microbiana que reconhecem as moléculas de adesão da matriz do hospedeiro (MSCRAMM) estão diretamente envolvidos no processo de patogênese do gênero *Staphylococcus* (BANNOEHR; GUARDABASSI, 2012). A Figura 1 ilustra estes componentes na superfície de *S. pseudintermedius*.

Figura 1 – Diagrama esquemático simplificado ilustrativo dos fatores de virulência secretados e associados à parede celular de *Staphylococcus pseudintermedius*



Abreviações: Proteínas CWA, proteínas ancoradas na parede celular; MSCRAMMs, componentes da superfície microbiana que reconhecem moléculas de matriz adesiva; Sps, proteínas de superfície de *S. pseudintermedius*; Agr, gene regulador acessório; AIP, peptídeo autoindutor; Luk-I, leucotoxina bicomponente; SIET, toxina esfoliativa; EXI, toxina esfoliativa de *S. pseudintermedius*; ExpA e ExpB, toxina esfoliativa A e B de *S. pseudintermedius* e TSST-1, toxina da síndrome do choque tóxico 1. Adaptado de BANNOEHR; GUARDABASSI (2012).

A produção de exotoxinas é considerada um dos mais importantes fatores de virulência de *S. pseudintermedius*, sendo por isso, as principais e melhor reconhecidas toxinas desta espécie bacteriana, descritas detalhadamente a seguir.

2.2.1 Citotoxinas

Importantes citotoxinas produzidas por *S. pseudintermedius* são as α -hemolisinas e as β -hemolisinas. Tipicamente, pela ação de ambas toxinas, ocorre a denominada hemólise de zona dupla em ágar sangue ovino, onde observa-se uma hemólise completa (alfa-hemólise) mais próxima à colônia bacteriana, enquanto é observada uma hemólise mais externa incompleta (beta-hemólise), embora a mesma se torne completa a 4 °C (hemólise quente-frio) (DEVRIESE *et al.*, 2005). A ação citolítica da toxina β é atribuída à sua capacidade de degradar a esfingomiéline, que é um folheto externo de muitas membranas celulares eucarióticas.

S. pseudintermedius também é capaz de produzir uma leucotoxina denominada Luk-I, semelhante à leucocidina *Panton-Valentine* produzida por *S. aureus*. As leucocidinas são uma família de toxinas potentes secretadas por estafilococos e consistem em componentes S (lento) e F (rápido) (ABOUELKHAIR *et al.*, 2018). O componente S reconhece um receptor na célula hospedeira, conferindo uma ligação de alta afinidade à superfície celular, onde, após, o componente F é recrutado para formar poros octaméricos que penetram na bicamada lipídica na membrana plasmática da célula, levando ao influxo e efluxo de íons, apoptose e, finalmente, morte celular (YOONG; TORRES, 2015).

A leucotoxina Luk-I, codificada por dois genes, *lukS* e *lukF*, causa destruição de leucócitos e necrose tecidual. Estes genes podem ser encontrados em isolados provindos tanto de cães saudáveis quanto infectados, como demonstrou um estudo realizado por Garbacz *et al.* (2013). A ocorrência dos genes codificadores de Luk-I parece ser comum em isolados de *S. pseudintermedius* (FUTAGAWA-SAITO *et al.*, 2004; RUSCHER, *et al.*, 2010). Abouelkhair *et al.* (2018) observam que o efeito citotóxico em leucócitos polimorfonucleares de caninos não ocorre quando essas células são submetidas às versões heterólogas mutantes de Luk-I, produzidas através da substituição de aminoácidos em pontos selecionados. Os mesmos autores observam, ainda, que o efeito citotóxico acontece apenas quando as duas proteínas recombinantes (LukS/F-I) estão combinadas, e não quando se encontram isoladamente. Por fim, os dados comprovam que os anticorpos anti-Luk-I produzidos em cães contra proteínas atenuadas reduz o efeito citotóxico da leucocidina canina nativa, o que destaca a importância do Luk-I como um componente promissor em uma vacina contra infecções por *S. pseudintermedius* (ABOUELKHAIR *et al.*, 2018).

2.2.2 Toxinas esfoliativas

S. pseudintermedius produz um tipo de toxina esfoliativa que possui papel importante na patogênese de casos clínicos de otite crônica e piodermatites em caninos, denominada toxina esfoliativa de *S. pseudintermedius* (SIET), a qual é codificada pelo gene *siet*. Terauchi *et al.* (2003) ao descreverem a toxina pela primeira vez, comprovam que ao injetá-la em cães, os sinais clínicos como eritema, esfoliação e crostas, semelhantes aos sinais observados na piodermatite canina, passavam a ser desenvolvidos pelos animais. Garbacz *et al.* (2013) identificaram o gene *siet* em 100 % dos isolados caninos, tanto em isolados de cães clinicamente doentes quanto em isolados de cães saudáveis. Esse fato evidencia a provável influência de fatores externos ambientais e do próprio hospedeiro na indução da expressão

desta toxina. De maneira similar, outros pesquisadores confirmaram a presença do gene *siet* em todas as cepas analisadas nos seus respectivos estudos, independente, inclusive, de serem cepas suscetíveis à meticilina (MSSP, do inglês *Meticillin-susceptible Staphylococcus pseudintermedius*) ou cepas MRSP (RUSCHER *et al.*, 2010; YOON *et al.*, 2010; GHARSA *et al.*, 2013).

Por outro lado, a relevância biológica da SIET ainda não está totalmente clara, visto que foi realizado um estudo onde a toxina SIET recombinante de *S. pseudintermedius* foi inoculada em três cães, sem ser observada qualquer alteração clínica ou histopatológica evidente (IYORI *et al.*, 2011). Além disso, não se sabe exatamente se essa toxina possui atividade enzimática semelhante à das toxinas esfoliativas clássicas, pois a SIET de *S. pseudintermedius* não compartilha uma sequência homóloga de aminoácidos como as demais toxinas esfoliativas conhecidas e já analisadas (IYORI *et al.*, 2011).

Sabe-se que *S. aureus*, *Staphylococcus hyicus* e *Staphylococcus chromogenes* causam infecções de pele em humanos ou animais, produzindo com alta frequência toxinas esfoliativas (ETs) (FUTAGAWA-SAITO *et al.*, 2009). O agente *S. pseudintermedius*, sendo causador de pioderma canino, teve uma toxina esfoliativa, denominada EXI (*exfoliative toxin of pseudintermedius*), relatada por Futagawa-Saito *et al.* (2009), onde foi observado entre 43-68 % de identidade de sequência com as toxinas esfoliativas estafilocócicas conhecidas para outras espécies de *Staphylococcus*. No mesmo estudo, pode-se observar que camundongos recém-nascidos inoculados com EXI, tanto nativa quanto recombinante, apresentaram lesões bolhosas extensas e/ou esfoliação cutânea característica. Dos isolados de *S. pseudintermedius* de pioderma canina deste estudo, em 23,3 % foi identificada a toxina EXI por hibridização *dot-blot* (FUTAGAWA-SAITO *et al.*, 2009). Outro estudo realizado por Gharsa *et al.* (2013) identificou o gene *exi* através do método de PCR em 5,5 % de isolados de *S. pseudintermedius* obtidos através de suabes nasais de cães saudáveis.

As toxinas esfoliativas estafilocócicas digerem desmogleína (Dsg) 1, uma molécula desmossômica de adesão célula-célula, causando, assim, a divisão intraepidérmica, característica de quadros como: i) impetigo bolhoso humano; ii) síndrome da pele escaldada estafilocócica e, iii) epidermite exsudativa suína (IYORI *et al.*, 2011). Em um estudo realizado a fim de descobrir se EXI também afetaria as desmogleínas, Iyori *et al.* (2011) comprovaram que essa toxina recombinante de *S. pseudintermedius* afeta especificamente Dsg1, mas não Dsg3, causando uma divisão epidérmica superficial microscópica, levando a quadros similares às demais toxinas esfoliativas estafilocócicas. Por outro lado, o mesmo não

foi observado na toxina esfoliativa SIET recombinante, onde não houve uma influência visível da mesma sobre as desmogleínas (IYORI *et al.*, 2011).

Outra toxina esfoliativa denominada ExpB foi identificada em *S. pseudintermedius*, onde sua forma recombinante causou a divisão intraepidérmica e a degradação de Dsg-1 em três cães da raça *Beagle* (IYORI *et al.*, 2010). No mesmo estudo, o gene *expB* estava presente em 23 % dos isolados clínicos de casos de pioderma superficial canino, exibindo vários fenótipos clínicos, enquanto a ocorrência em isolados de *S. pseudintermedius* de cães saudáveis foi de 6,1 %. Devido à semelhança no processo patogênico os autores propuseram a renomeação de EXI para ExpA, levando em conta a nomenclatura da toxina esfoliativa ExpB (IYORI *et al.*, 2010).

2.2.3 Toxinas pirogênicas com propriedades de superantígenos

As enterotoxinas estafilocócicas (SEs) e toxina da síndrome do choque tóxico (TSST-1) são membros da família de toxinas pirogênicas e que possuem várias variantes antigênicas. Essas toxinas podem se ligar às moléculas de MHC (principal complexo celular de histocompatibilidade) II fora de seu local de ligação ao antígeno, o que causa uma estimulação exacerbada de linfócitos T e imunossupressão. No entanto, diferentemente do TSST-1, as SEs têm atividades biológicas adicionais que induzem êmese e diarreia, estando associadas principalmente à intoxicação alimentar estafilocócicas (YOON *et al.*, 2010).

As SEs foram classificadas em cinco tipos sorológicos (SEA, SEB, SEC, SED e SEE) com base em suas propriedades antigênicas (BERGDOLL, 1989 *apud* TANABE *et al.*, 2013). O Comitê Internacional de Nomenclatura para Nomenclatura Estafilocócica de Superantígenos propôs que apenas toxinas que demonstrem atividades superantigênicas e eméticas visualizadas em macacos, como modelo animal, sejam classificadas como SEs (LINA *et al.*, 2004). O mesmo comitê também recomenda que, se a atividade emética não for avaliada ou se a toxina definitivamente não possuir essa atividade, ela deve ser designada como um superantígeno SE1. Assim, até o momento, 11 SEs, denominadas SEA, SEB, SEC, SED, SEE, SEG, SHE, SEI, SER, SES e SET, e 11 SE1 denominadas SEIJ, SEIK, SEIL, SEIM, SEIN, SEIO, SEIP, SEIQ, SEIV, SEIU e SEIX foram relatadas em espécies de *Staphylococcus* (TANABE *et al.*, 2013).

Para investigar o papel das SEs produzidas por *S. pseudintermedius* na patogênese da piodermatite, Tanabe *et al.* (2013) analisaram isolados de cães comparando animais saudáveis com animais doentes. Dos isolados de cães com piodermatite, 7,6 % produziram SEs (SEA,

SEC ou SED) de acordo com o teste de aglutinação passiva reversa em látex. Já para os isolados de cães saudáveis o percentual foi de 10,3 %. Por outro lado, a análise da presença dos genes que codificam as SEs, através de PCR, demonstrou que 53,7 % dos isolados de cães com piodermatite e 90,8 % dos isolados de cães saudáveis possuíam um ou mais desses genes. Deste modo, os autores indicam que aparentemente as SEs podem não ser um fator de virulência direta na piodermatite canina (TANABE *et al.*, 2013).

S. pseudintermedius também produz uma variante de SEC, denominada SECcanine (EDWARDS *et al.*, 1997). A SECcanine foi identificada por Edwards *et al.* (1997) sendo uma enterotoxina do tipo C canino (SECcanine), isolada de cães com piodermatite. Essa variante é distinta de outras enterotoxinas estafilocócicas, mas compartilha sua capacidade de induzir êmese e ativação da proliferação de células T. Em uma análise comparativa também entre cães saudáveis e com piodermatite, Garbacz *et al.* (2013) identificaram o gene *sec* (que codifica a enterotoxina SEC) em alguns isolados de ambos os grupos, e a análise do sequenciamento desses genes revelou que os mesmos eram pertencentes ao grupo SECcanine. Diferentemente de Tanabe *et al.* (2013), Garbacz *et al.* (2013) não encontraram *sea* ou *sed* em animais saudáveis ou com piodermatite.

Em uma análise feita somente em isolados *S. pseudintermedius* de cães com casos clínicos de piodermatite ou otite crônica, foi identificado que 24,3 % dos isolados possuíam os genes *sec*, enquanto que nenhum dos genes *sea*, *seb*, *sed* ou *see* foram observados (YOON *et al.*, 2010). Curiosamente, uma análise por sequenciamento dos genes *sec* amplificados por Yoon *et al.* (2010), revelou que, assim como os achados de Garbacz *et al.* (2013) citados anteriormente, todos eles pertenciam ao grupo SECcanine.

A comparação do perfil de genes de SEs entre isolados MRSP de cães, de humanos e do meio ambiente ilustra que MRSP de humanos parecem ter maior potencial patogênico do que os de outras fontes, pois dos 16 genes SEs, 11 (*sea*, *sec*, *seg*, *sei*, *sek*, *sel*, *sem*, *sen*, *seo*, *sep* e *seq*), quatro (*sec*, *sel*, *sem* e *seq*) e dois (*sec* e *seq*) foram detectados em isolados de MRSP de humanos, cães e meio ambiente, respectivamente (PHUMTHANAKORN *et al.*, 2018). Destaca-se que os genes *seb*, *sed*, *sej*, *ser* e *sem* não foram detectados (PHUMTHANAKORN *et al.*, 2018).

A síndrome do choque tóxico estafilocócico (TSS) é uma doença potencialmente letal caracterizada por febre, erupção cutânea, descamação, disfunção orgânica e choque. A síndrome é atribuída em particular a TSST-1, codificada pelo gene *tst-1* (SHARMA *et al.*, 2019). Phumthanakorn *et al.* (2018) identificaram o gene *tst-1* em 21,7 % dos MRSP isolados em um total de três sítios distintos (humanos, cães e meio ambiente). Já em outra análise feita

em 74 isolados de *S. pseudintermedius* provindos de casos de otite ou piodermatite em cães, nenhum gene *tst-1* foi encontrado (YOON *et al.*, 2010).

2.2.4 Outros fatores de virulência descritos em *Staphylococcus pseudintermedius*

Existem outros fatores de virulência que permitem a disseminação do micro-organismo no hospedeiro, como coagulase, DNase, proteína A ou lipases (BANNOEHR *et al.*, 2012), assim como muitos outros apontados no Quadro 1. No estudo de Garbacz *et al.* (2013) tanto as cepas de *S. pseudintermedius* isoladas de cães saudáveis quanto as obtidas de cães com piodermatite sintetizaram β -hemolisina, fator de aglutinação (CF, do inglês *clumping factor*), coagulase, DNase, proteína A e lipase.

O papel do fator CF na patogenicidade de *S. pseudintermedius* não é consenso. De acordo com Devriese *et al.* (2005) *S. pseudintermedius* não possui o gene que codifica para CF. Por outro lado, evidências apontam para a presença do referido gene em entre 20 % a 50 % dos isolados (FUTAGAWA-SAITO *et al.*, 2006; GARBACZ *et al.*, 2013).

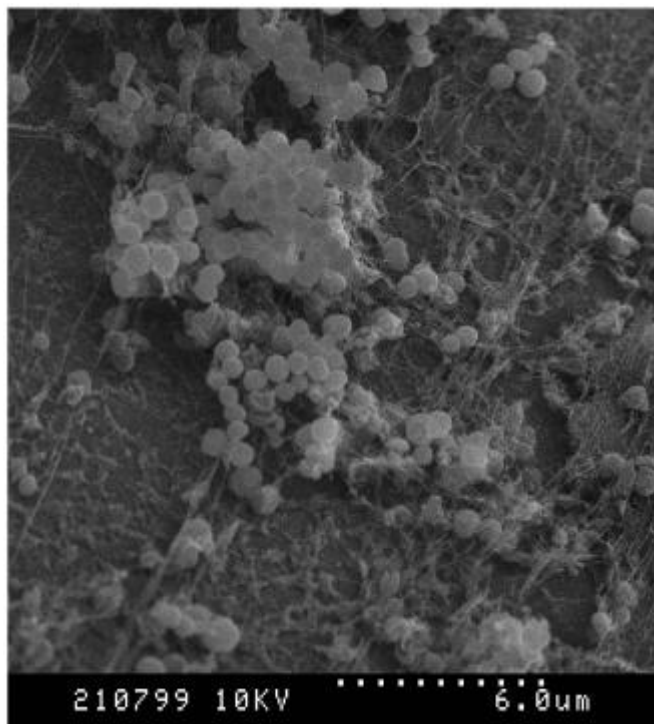
A proteína estafilocócica A (Proteína A) é uma proteína de superfície com quatro ou cinco domínios que podem se ligar à região Fc da Imunoglobulina G (IgG) (GARBACZ *et al.*, 2013). A interação entre a proteína A e IgG faz com que a superfície da célula seja coberta com moléculas de IgG sem função, ou seja, que não podem ser reconhecidas pelo receptor Fc de neutrófilos, logo são impossibilitadas de ativar o sistema complemento pela via clássica e não produzem uma resposta imune efetora (GARBACZ *et al.*, 2013). Isso explica o efeito antifagocítico da Proteína A *in vitro* comprovado, inclusive, em modelos de infecção animal (PALMQVIST *et al.*, 2002). A Proteína A é considerada um dos mais importantes fatores de virulência de *S. pseudintermedius*, pela sua ação antifagocitária.

2.3 Formação de biofilme por *Staphylococcus pseudintermedius*

As bactérias podem se apresentar no ambiente ou em seus hospedeiros de duas formas: célula planctônica (célula livre) ou em biofilme (comunidades celulares). A formação de biofilme é um processo que ocorre onde os micro-organismos se aderem e se multiplicam em superfícies, se aglomeram formando micro-colônias e produzem polímeros extracelulares que definem o biofilme propriamente dito (MADIGAN *et al.*, 2016). Essas substâncias poliméricas extracelulares (EPSs) consistem principalmente de polissacarídeos e fornecerão a matriz ou estrutura para o biofilme. Todo o processo resulta em uma alteração fenotípica dos

organismos em relação à taxa de crescimento e transcrição gênica (DONLAN, 2001), e acaba trazendo algumas vantagens para as bactérias, como: facilidade de comunicação, através de sinalização por *quorum sensing*; maior capacidade de evasão da resposta imune do hospedeiro, bem como resistência à ação de antimicrobianos; e ainda atingem uma melhor proteção física e química pela formação da matriz do biofilme (FLEMMING, 2009).

Figura 2 – Microscopia eletrônica de varredura da formação do biofilme de cepa *Staphylococcus pseudintermedius* resistente à meticilina em parafusos ortopédicos em aço inoxidável 316L



Linha pontilhada = 6 μ m. Aparecem grandes agregados de cocos e substância polimérica extracelular produzida de forma irregular (SINGH *et al.*, 2013).

O modo de crescimento do biofilme confere aos organismos associados um potencial aumento na resistência à antimicrobianos. Esse efeito pode ser intrínseco (ou seja, inerente ao modo de crescimento do biofilme) ou adquirido (causado pela aquisição/troca de genes de resistência) (DONLAN, 2001). Existem pelo menos três razões para a resistência antimicrobiana intrínseca dos biofilmes. Em primeiro lugar, os agentes antimicrobianos necessitam difundir-se através da matriz EPS para entrar em contato e inativar os organismos dentro do biofilme, e, através de reações químicas, as EPS retardam essa difusão, limitando a ação dos antimicrobianos. Segundo, os organismos associados ao biofilme têm taxas de crescimento reduzidas, minimizando a taxa de atividade efetiva de antimicrobianos na célula

e, portanto, afetando a cinética de inativação. E, por último, o próprio ambiente imediatamente ao redor das células dentro de um biofilme pode fornecer condições que protegem ainda mais o organismo (DONLAN, 2001).

Sobre a resistência adquirida, pesquisas mostram que os elementos móveis (plasmídeos ou outros elementos) podem ser trocados em biofilmes sob várias condições, inclusive havendo estudos que mostram uma maior taxa de transferência horizontal de plasmídeos entre organismos pertencentes ao biofilme comparados às culturas líquidas dos mesmos organismos (EHLERS; BOUWER, 1999 *apud* DONLAN, 2001).

A formação de biofilme é reconhecida como um importante fator de virulência em várias espécies de *Staphylococcus* (JAIN; AGARWAL, 2009). Como foi citado anteriormente, um fator chave para o sucesso da formação do biofilme, depois da adesão dos microrganismos à superfície, é a secreção de EPS. Em estafilococos, esse componente extracelular que forma a matriz, também chamado de adesão intracelular de polissacarídeo (PIA), é codificado, pelo menos em parte, por um operon denominado *ica* (GERKE *et al.*, 1998). Por mais que existam estudos demonstrando uma correlação positiva entre a expressão de alguns genes *ica* com o aumento da atividade de PIA (GERKE *et al.*, 1998), também foram reportadas formação de biofilme independente de *ica* (FITZPATRICK; HUMPHREYS; O'GARA, 2005) e um aumento na produção de biofilme nem sempre correlacionada com *ica* (HAN; YANG; PARK, 2015).

O papel do operon *ica* na capacidade de formação de biofilme por *S. pseudintermedius* ainda é desconhecido. *S. pseudintermedius* é considerado um potente produtor de biofilme em condições *in vitro* e *in situ*. No entanto, são observadas variações de intensidade de produção entre diferentes isolados de *S. pseudintermedius* (GARBAZ *et al.*, 2013; SINGH *et al.*, 2013; STEFANETTI *et al.*, 2017; CHAN *et al.*, 2019). No que diz respeito à comparação quanto à formação de biofilme entre cepas MRSP e MSSP, alguns estudos já realizados não observam diferenças significativas na produção de biofilme entre ambas (SINGH *et al.*, 2013; DIRIBE *et al.*, 2015; HAN; YANG; PARK, 2015; STEFANETTI *et al.*, 2017). Além disso, também não são observadas diferenças significativas na capacidade de produção de biofilme entre isolados obtidos de cães infectados e dos obtidos de cães saudáveis (GARBAZ *et al.*, 2013).

As consequências clínicas da produção de biofilme foram analisadas por Arima *et al.* (2018), onde pôde-se observar que os biofilmes produzidos por isolados clínicos de *S. pseudintermedius* de cães e gatos foram capazes de secretar proteínas resistentes ao calor. Estas proteínas induziram reações inflamatórias *in vitro* através da sinalização de receptores

“*Toll-like*”, os quais pertencem a uma via de sinalização que atua regulando a expressão de citocinas inflamatórias em macrófagos (SHINTANI *et al.*, 2013, *apud* ARIMA *et al.*, 2018). A expressão destas proteínas variou dependendo da intensidade de produção de biofilme, sendo que quanto maior foi a intensidade da produção de biofilme, maior foi a síntese de proteínas pró inflamatórias. Agregando a informação de que os isolados fortes produtores de biofilme apresentam uma resistência maior aos antibióticos do que a dos fracos produtores de biofilme (SAHAL; BILKAY, 2014), pode-se concluir que as infecções causadas por *S. pseudintermedius* intensos produtores de biofilme provavelmente serão de difícil tratamento, não só pela resistência aos antibióticos como também pela maior indução de inflamação do tecido hospedeiro.

3. ARTIGO CIENTÍFICO

Neste item é apresentado o manuscrito intitulado “*Staphylococcus pseudintermedius* com grande potencial toxigênico e habilidade em formar biofilme”, o qual apresenta os resultados obtidos no projeto.

***Staphylococcus pseudintermedius* com grande potencial toxigênico e habilidade em formar biofilme**

RESUMO

Staphylococcus pseudintermedius é um patógeno oportunista, responsável por uma ampla gama de infecções principalmente em cães. Acredita-se que esta espécie seja capaz de sintetizar uma série de exotoxinas, mas, até o momento, grande parte dos seus fatores de virulência não foi descrita detalhadamente. Para contribuir com o entendimento do perfil de virulência e potencial patogênico desta espécie, 33 isolados de *S. pseudintermedius* provindos de diferentes sítios de infecção foram investigados através de identificação molecular do gene *mecA*, e de 11 genes codificadores de toxinas, incluindo citotoxinas (*lukS*, *lukF*), toxina esfoliativa (*siet*), enterotoxinas (*sea*, *seb*, *sec*, *seccanine*, *sel*, *sem* e *seq*) e toxina da síndrome do choque tóxico (*tst-1*). Os mesmos isolados foram submetidos ao teste de formação de biofilme *in vitro*, e ao teste de susceptibilidade aos antimicrobianos *in vitro*. A pesquisa de genes codificadores de toxinas demonstrou que *lukF* (90 %), *siet* (87 %) e *lukS* (81 %) foram os mais frequentes. Já outros genes foram de detecção menos frequente, como *seq* (12 %), *sel* (9 %) e *sem* (3 %). Os isolados fenotipicamente resistentes à oxacilina foram previamente descritos como positivos para *mecA*, e dentre os 14 isolados fenotipicamente suscetíveis à oxacilina, somente um foi *mecA* positivo. Referente ao perfil de susceptibilidade aos antimicrobianos, 84,8 % (28/33) dos isolados apresentam perfil um perfil de multirresistência. Com exceção de um isolado, todo o restante foi classificado como fortes formadores de biofilme. Em conclusão, a alta frequência de genes codificadores de toxinas, a forte capacidade de formação de biofilme e os diversos perfis de multirresistência aos antimicrobianos presentes nos isolados de *S. pseudintermedius* deste estudo, sugerem o grande potencial patogênico e virulento desta espécie.

Palavras-chave: *Staphylococcus pseudintermedius*, biofilme, MRSP, MSSP, toxinas

ABSTRACT

Staphylococcus pseudintermedius is an opportunistic pathogen, responsible for a wide range of infections mainly in dogs. It is believed that this species is capable of synthesizing a series of exotoxins, but so far most of its virulence factors have not been described in detail. To contribute to the understanding of the virulence profile and pathogenic potential of this species, 33 isolates of *S. pseudintermedius* from different infection sites were screened by molecular identification of *mecA* gene and 11 toxin coding genes, including cytotoxins (*lukS*, *lukF*), exfoliative toxin (*siet*), enterotoxins (*sea*, *seb*, *sec*, *seccanine*, *sel*, *sem* and *seq*) and toxic shock syndrome toxin (*tst-1*). The same isolates were submitted to the *in vitro* biofilm formation test and the *in vitro* antimicrobial susceptibility test. The results showed that most isolates have *lukS*, *lukF*, and *siet* genes, 81 %, 90 % and 87 %, respectively. Other genes were less frequently detected, such as *seq* (12 %), *sel* (9 %) and *sem* (3 %). Phenotypically oxacycline-resistant isolates were previously described as positive for *mecA*, and among the 14 phenotypically susceptible oxacycline isolates, only one was *mecA* positive. Regarding the antimicrobial susceptibility profile, 84.8 % (28/33) of the isolates illustrated a multidrug resistance profile. All but one isolate was classified as strong biofilm forming. In conclusion, the high frequency of toxin-coding genes, the strong capacity of biofilm formation and the diverse antimicrobial multidrug resistance profiles present in *S. pseudintermedius* isolates of this study, suggest the great pathogenic and virulent potential of this species.

Key-words: *Staphylococcus pseudintermedius*, biofilm, MRSP, MSSP, toxins

Introdução

Staphylococcus pseudintermedius é um agente comensal presente na pele e mucosas de cães e gatos, que está principalmente associado às dermatites e otites, mas também se associa à bacteremia, infecções do trato urinário e infecções pós-cirúrgicas (BANNOEHR *et al.*, 2012).

Inicialmente, essa espécie, e outras semelhantes pertencentes ao gênero *Staphylococcus*, eram nomeadas como *Staphylococcus intermedius* (BANNOEHR *et al.*, 2012), no entanto, por existirem diversidades genotípicas e fenotípicas entre as mesmas (HAJEK, 1976; DEVRIESE *et al.*, 2005), foram reclassificadas em quatro espécies distintas, sendo essas *S. intermedius*, *S. pseudintermedius*, *Staphylococcus delphini* e *Staphylococcus*

cornubiensis, as quais pertencem ao grupo *Staphylococcus intermedius* (SIG) (BANNOEHR *et al.*, 2007; SASAKI *et al.*, 2007; MURRAY *et al.*, 2018).

O padrão de susceptibilidade aos antimicrobianos de cepas de *S. pseudintermedius* varia com o histórico clínico do paciente (VELÁZQUEZ-GUADARRAMA *et al.*, 2017; MENANDRO *et al.*, 2019; NISA *et al.*, 2019). Os estafilococos resistentes à meticilina são considerados resistentes a todos os agentes β -lactâmicos, como penicilinas, cefalosporinas e carbapenêmicos. O principal fator responsável por essa resistência é a síntese da proteína de ligação à penicilina modificada (PBP), codificada pelo gene *mecA*, que confere uma ligação fraca da proteína com antibióticos β -lactâmicos, tornando-os não efetivos (BROWN; REYNOLDS, 1980). Nos últimos anos, cepas de *S. pseudintermedius* resistentes à meticilina (MRSP) emergiram de maneira global, chamando atenção por sua resistência antimicrobiana e perfil de virulência (MENANDRO *et al.*, 2019). Além disso, essas cepas frequentemente demonstram ser resistentes a múltiplas drogas, o que também pode acarretar em uma preocupação não apenas na clínica animal, mas também a nível de saúde pública, visto que foram relatados casos de infecção em humanos por *S. pseudintermedius*, especialmente entre veterinários que trabalham em clínicas ou tutores de animais, comprovando seu potencial zoonótico (PAUL *et al.*, 2011; VAN DUIJKEREN *et al.*, 2011; WALTHER *et al.*, 2012; LOZANO *et al.*, 2017).

Outro destaque acerca de *S. pseudintermedius* é devido à espécie sintetizar uma variedade de fatores de invasão e virulência. Isso inclui fatores que permitem a adesão às células do hospedeiro ou matriz extracelular, com a potencial formação de biofilme, que são geralmente relacionados à infecções crônicas e refratárias (ARIMA *et al.*, 2018). Toxinas e fatores que modulam o sistema imune do hospedeiro também podem ser sintetizados por essa espécie, como leucocidinas (Luk-I), as quais causam destruição de leucócitos e necrose tecidual (GARBACZ *et al.*, 2013) e toxinas com propriedades de superantígenos, englobando a toxina da síndrome do choque tóxico 1 (TSST-1) e as enterotoxinas (SEs), que além disso possuem ação emética e diarreica (PHUMTHANAKORN *et al.*, 2018). Outro grupo de fatores de virulência inclui as toxinas esfoliativas SIET, EXI (ExpA) e ExpB, que causam danos a nível epidérmico (TERAUCHI *et al.*, 2003; FUTAGAWA-SAITO *et al.*, 2009; IYORI *et al.*, 2010). Além disso, outras toxinas, proteínas e enzimas como hemolisinas, coagulase, DNase, proteína A ou lipases também são sintetizadas por essa espécie, sendo também associadas à patogenicidade.

Até o momento, grande parte dos fatores de virulência de *S. pseudintermedius* não foram descritos detalhadamente, limitando, assim, o conhecimento sobre a virulência dessa

espécie. Desta maneira, a proposta desse estudo é determinar o perfil de virulência e potencial patogênico de *S. pseudintermedius*, através da identificação molecular de genes codificadores de toxinas, investigação do potencial de formação de biofilme e perfil de resistência aos antimicrobianos a partir de cepas MRSP e cepas *S. pseudintermedius* suscetíveis a meticilina (MSSP).

Materiais e métodos

Isolados bacterianos

Para esse estudo, foram analisados 33 isolados de *S. pseudintermedius* previamente obtidos de caninos, os quais são provindos de caninos com quadros clínicos de otite (n=5), infecções de pele (n=19), piometra (n=5), cistite (n=2) e quadros de septicemia (n=2). A identificação dos isolados foi confirmada por MALDI-TOF (*Matrix Assisted Laser Desorption Ionization – Time-of-flight mass spectrometer*).

Extração de DNA genômico total

Os isolados, previamente armazenados em caldo BHI (*Brain Heart Infusion*) e glicerol à -20 °C, foram recuperados em ágar sangue ovino 5 % e as colônias bacterianas foram selecionadas através de teste de coloração de Gram e catalase. Cada isolado teve seu DNA genômico extraído pelo método de extração orgânica por fenol/clorofórmio, padronizado no presente estudo. Brevemente, a partir do cultivo bacteriano de 1 mL de caldo BHI por 24 horas à 37 °C, obteve-se o precipitado celular por centrifugação. Para a realização da digestão celular, cada *pellet* foi ressuspendido em 1 ml de Tampão SET (Tris-HCl 50 mM pH 8, EDTA 50 mM, sacarose 20 %) mais 200 µl de lisozima (50 mg/ml) e incubado à 37 °C durante 03 horas, com eventual agitação leve. Em seguida foram adicionados 100 µl de proteinase K (20 mg/ml) e 200 µl de SDS 10 % com incubação de 1 hora à 55 °C. Após, foram adicionados fenol/clorofórmio na proporção 1:1 a fim de obter a desnaturação de proteínas e separação da fase aquosa da fase orgânica. Depois de centrifugar as amostras à 10.000 g por 9 minutos, o sobrenadante foi coletado para uma nova lavagem com clorofórmio na proporção 1:1. Após uma nova centrifugação à 10.000 g por 7 minutos, o sobrenadante foi coletado e precipitado *overnight* à -20 °C com etanol absoluto (2,5 X). O material, então, foi centrifugado durante 10 minutos à 10.000 g, seguido de lavagem do pellet com etanol 70 %, seguida de uma nova centrifugação de 2 minutos à 10.000 g. Os *pellets* foram resuspendidos em 30 µl TE (Tris-HCl 10 mM, EDTA 0,1 mM pH 8). Depois de tratados com 2 µl de RNaseI (10 mg/ml) à 37 °C por 1 hora, a integridade e quantidade do DNA foi analisada em

gel de agarose 1 %. Finalmente, os DNAs foram armazenados a -20 °C para os testes moleculares.

Caracterização molecular dos isolados

Os isolados foram investigados quanto à presença do gene *mecA*. A detecção foi realizada por reação de PCR como descrito anteriormente (BANNOEHR *et al.*, 2007). O ensaio foi realizado com nove isolados (todos provenientes de quadros de piometra, cistite e septicemia), enquanto os isolados de casos de otite e piodermatite (n=24) haviam sido previamente analisados (LOPES *et al.*, 2015).

Além disso, foram selecionados para este estudo 11 genes que codificam toxinas descritas pela literatura como importantes fatores de virulência para *S. pseudintermedius*. Os *primers* utilizados, bem como as condições para a realização da reação de PCR, foram selecionados para o presente trabalho utilizando diferentes estudos como referência, conforme demonstrado na Tabela 1.

As reações de amplificação foram realizadas em um termociclador *MiniAmp Thermal Cycler* (Thermo Fisher Scientific) com as seguintes condições, previamente descritas pelos estudos que descreveram os *primers*: 94 °C a 3 min, 30 a 45 ciclos de 92 a 95 °C de 2 a 5 min, temperatura de anelamento (Tabela 1) por 30 seg a 1 min, 72 de 1 a 2 min, extensão final de 72 °C a 5 min. Os produtos de PCR foram analisados em gel de agarose a 1 % corados com GelRed e observados sob luz ultravioleta.

Tabela 1 – Sequências de *primers* e condições térmicas para amplificação de PCR para cada gene de virulência

Gene	Sequência de oligonucleotídeos (5'-3')	Temperatura de anelamento	Tamanho do produto	Referência
<i>lukF</i>	CCTGTCTATGCCGCTAATCAA AGGTCATGGAAGCTATCTCGA	57 °C	572pb	Futagawa-Saito <i>et al.</i> , 2004
<i>lukS</i>	TGTAAGCAGCAGAAAATGGGG GCCCGATAGGACTTCTTACAA	57 °C	503pb	Futagawa-Saito <i>et al.</i> , 2004
<i>siet</i>	ATGGAAAATTTAGCGGCATCTGG CCATTACTTTTTCGCTTGTGTGC	56 °C	359pb	Lautz <i>et al.</i> , 2006
<i>seccanine</i>	GTAATTTTGATATTCGCACT TATCAAAAATCGGATTAACA	40 °C	800pb	Futagawa-Saito <i>et al.</i> , 2004
<i>sea</i>	CCTTTGGAAACGGTTAAAACG TCTGAACCTTCCCATCAAAAAC	55 °C	127pb	Becker <i>et al.</i> , 1998
<i>seb</i>	TCGCATCAAACGACAAAACG GCAGGTACTCTATAAGTGCCTGC	55 °C	477pb	Becker <i>et al.</i> , 1998
<i>sec</i>	CTCAAGAACTAGACATAAAAAGCTAGG TCAAAAATCGGATTAACATTATCC	55 °C	271pb	Becker <i>et al.</i> , 1998
<i>sel</i>	TAACGGCGATGTAGGTCCAGG CATCTATTTCTTGTGCGGTAAC	55 °C	383pb	Omoe, <i>et al.</i> , 2005
<i>sem</i>	GGATAATTCGACAGTAACAG TCCTGCATTAATCCAGAAC	55 °C	379pb	Omoe, <i>et al.</i> , 2005
<i>seq</i>	AATCTCTGGGTCAATGGTAAGC TTGTATTCGTTTTGTAGGTATTTTCG	55 °C	122pb	Omoe, <i>et al.</i> , 2005
<i>tst</i>	AAGCCCTTTGTTGCTTGCG ATCGAACTTTGGCCCATACTTT	55 °C	445pb	Becker <i>et al.</i> , 1998

Fonte: próprio autor.

Teste de susceptibilidade aos antimicrobianos

O perfil de susceptibilidade aos antimicrobianos foi determinado pelo método de disco-difusão em ágar, conforme o CLSI-M100 (2015). Foram testados 13 antimicrobianos diferentes, representando as seguintes 10 classes: aminoglicosídeos (gentamicina (10 µg) e tobramicina (10 µg)), anfenicóis (florfenicol (30 µg)), rifampicina (5 µg), glicopeptídeos (vancomicina (30 µg)), lincosamidas (clindamicina (2 µg)), macrolídeos (eritromicina (15 µg)), penicilinas (oxacilina (1 µg)), quinolonas (ácido nalidíxico (30 µg), ciprofloxacina (5 µg) e enrofloxacina (5 µg)), sulfonamidas (sulfametoxazol/trimetoprima (25 µg)) e tetraciclina (30 µg)). As categorias suscetíveis (S), intermediárias (I) ou resistentes (R) foram atribuídas com base nos pontos de corte recomendados pelo *Clinical Laboratory Standards Institute* (CLSI VET-2018). O teste foi realizado com nove isolados (todos provenientes de quadros de piometra, cistite e septicemia), enquanto os isolados de

casos de otite e piodermatite (n=24) tiveram seu perfil de susceptibilidade aos antimicrobianos previamente determinado (LOPES *et al.*, 2015).

Caracterização dos isolados quanto a capacidade de formação de biofilme *in vitro*

A capacidade *in vitro* dos isolados de formar biofilme foi investigada segundo o método de Stepanovic *et al.* (2007) com algumas modificações. Os isolados foram cultivados em meio TSA + 1 % de glicose por 24 h à 37 °C com recultivo nas mesmas condições. Depois, cada isolado foi ressuscitado em solução salina 0,9 % até atingir a turbidez de padrão 5 da escala de McFarland, que corresponde a $1,5 \times 10^8$ UFC/mL, onde, após, 20 µl de cada ressuspensão foi adicionada em quadruplicata em placas estéreis de microtitulação de 96 poços de poliestireno, adicionando-se 180 µl de meio de cultivo TBS + 1 % de glicose, logo, as placas foram mantidas 24 h à 37 °C. O controle negativo continha somente meio de cultivo. As placas foram lavadas três vezes com 200 µl de solução salina 0,9 % antes da adição de 200 µl de metanol (PA) com incubação de 20 min à temperatura ambiente para o processo de fixação das bactérias remanescentes. Depois de verter o metanol e secar as placas durante 1 h à 55 °C, são adicionados 200 µl de uma solução de cristal violeta 0,5 %. As placas foram incubadas à temperatura ambiente durante 15 min antes de remover o excesso de corante através de lavagens com água. O biofilme é ressuscitado em 200 µl de álcool:acetona (80:20) e incubado à temperatura ambiente durante 30 min. A leitura da densidade óptica (DO) do biofilme bacteriano foi feita em espectrofotômetro leitor de microplacas a um comprimento de onda de 550nm. Com base na DO produzida por biofilmes bacterianos comparativamente ao controle negativo (c-), as cepas foram classificadas nas seguintes categorias: não produtor de biofilme ($DO \leq DO_{c-}$), produtor fraco de biofilme ($DO_{c-} < DO \leq 2 \times DO_{c-}$), moderado ($2 \times DO_{c-} < DO \leq 4 \times DO_{c-}$) e fortes produtores de biofilme ($4 \times DO_{c-} < DO$), conforme proposto por Stepanovic *et al.* (2007). Os experimentos foram realizados três vezes de maneira independente a fim de obter resultados consistentes. A cepa *Staphylococcus epidermidis* ATCC 35984 foi empregada como controle positivo dos experimentos.

Resultados

Detecção do gene *mecA*

Como pode ser observado na Tabela 2, 100 % dos isolados que demonstraram padrão fenotípico de MRSP, ou seja, resistência à oxacilina, possuem o gene *mecA*, conforme a descrição de Lopes *et al.* (2015). Dos 14 isolados susceptíveis à oxacilina (cepas MSSP), somente um deles (isolado 705), de origem de um quadro clínico de piodermatite, possui o

gene *mecA*, enquanto que os demais foram negativos para a reação de PCR que buscou por este gene.

Tabela 2 – Perfil de virulência em *Staphylococcus pseudintermedius*. Identificação dos genes de toxinas, gene *mecA*, detecção de resistência à oxacilina e intensidade de formação de biofilme *in vitro*

<i>S. pseudintermedius</i> Id.	origem	<i>lukS</i>	<i>lukF</i>	<i>siet</i>	<i>seccan</i>	<i>sel</i>	<i>sem</i>	<i>seq</i>	<i>sea</i>	<i>seb</i>	<i>sec</i>	<i>tst</i>	<i>mecA</i>	Oxa resist.	Formação biofilme
166/18	cistite	+	+	+	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	Forte
205/18	cistite	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	Forte
072/17	piometra	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	Forte
072/18	piometra	+	+	+	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	Forte
215/18	piometra	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	Forte
269/18	piometra	+	+	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	Forte
034/18	piometra	+	+	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	Forte
009/19	sepse	+	+	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	Forte
187/18	sepse	+	+	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	Forte
511OD	otite	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	Forte
511 OE	otite	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	Forte
1387	otite	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	Forte
1044	otite	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	Forte
1259	otite	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	Forte
1378	piodermatite	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	Forte
559	piodermatite	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	Forte
561	piodermatite	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	Forte
619	piodermatite	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	Forte
651	piodermatite	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	Forte
695	piodermatite	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	Forte
705	piodermatite	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	Forte
795	piodermatite	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	Forte
817	piodermatite	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	Moderado
833	piodermatite	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	Forte
843	piodermatite	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	Forte
890	piodermatite	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	Forte
1037	piodermatite	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	Forte
1346	piodermatite	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	Forte
554	piodermatite	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	Forte
1379	piodermatite	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	Forte
1382	piodermatite	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	Forte
1397	piodermatite	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	Forte
6848	piodermatite	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	Forte

Abreviações: Id: identificação; Oxa resist.: resistente à oxacilina; +: presença do gene; -: ausência do gene.
Fonte: próprio autor.

Detecção de genes toxigênicos

Dentre os 11 diferentes genes testados, alguns atingiram alto percentual de presença distribuída nos isolados (Tabela 2), sendo 81 % (27/33) dos isolados positivos para *lukS*,

enquanto que 90 % (30/33) foram positivos para *lukF* e, ainda, 87 % positivos para *siet*. Já outros genes foram de detecção menos frequente, sendo identificados em um número menor de isolados, como *seq* (12 %), *sel* (9 %) e *sem* (3 %). Os genes, *sea*, *seb*, *sec*, *seccanine* e *tst-1*, não foram detectados em nenhum dos isolados testados no presente estudo.

De maneira interessante, os genes *seq*, *sel* e *sem*, que codificam para enterotoxinas, foram encontrados somente em isolados MSSP. Já os genes *lukS*, *lukF* e *siet* foram encontrados tanto em cepas MSSP quanto MRSP. Além disso, os mesmos genes *seq*, *sel* e *sem* foram identificados em isolados originados de casos clínicos de piometra, cistite ou septicemia, ou seja, em nenhum dos isolados provindos de casos clínicos de piodermatite ou otite foram encontrados tais genes (Tabela 2).

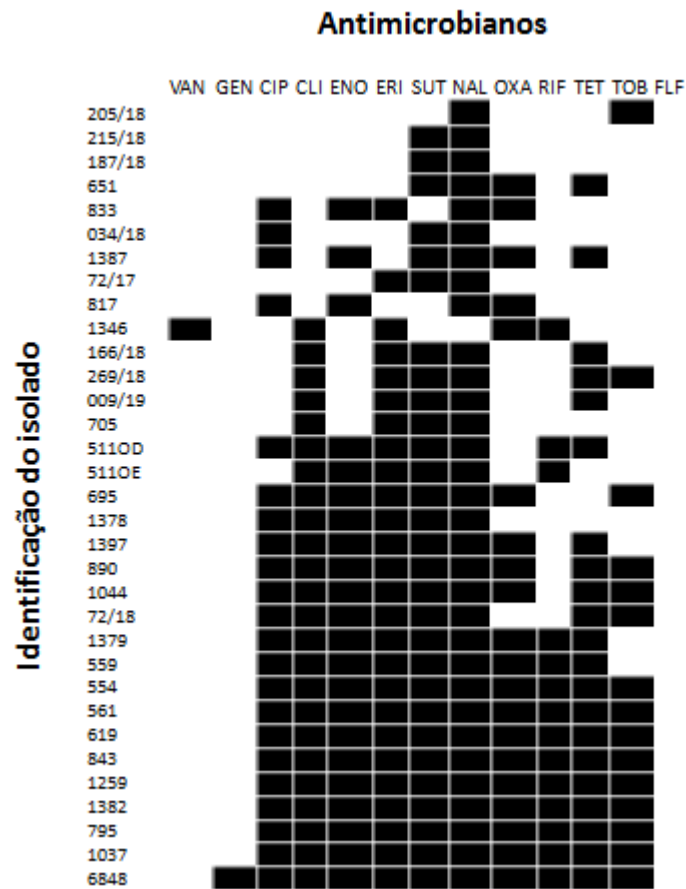
Teste de susceptibilidade aos antimicrobianos

Os padrões de resistência aos antimicrobianos identificados no presente estudo são apresentados na Figura 3. Dos isolados testados, 57,5 % (19/33) apresentaram o padrão fenotípico de cepas MRSP, sendo dois isolados de casos clínicos de otite, e o restante (17/33) de casos de piodermatite (Lopes *et al.* 2015). O percentual de isolados classificados como MSSP foi de 42,4 % (14/33), onde cinco eram provenientes de casos de piometra, dois de cistite, dois de piodermatite, dois de quadros de septicemia e outros três de otite. O percentual de isolados *Multidrug resistant*, ou seja, aqueles que foram resistentes a três ou mais classes de antimicrobianos foi de 84,8 % (28/33), sendo a grande maioria destes *S. pseudintermedius* de casos de piodermatite.

Em resumo, a resistência foi observada ao ácido nalidíxico (97 %), sulfametoxazol/trimetoprima (88 %), eritromicina (78 %), clindamicina (69 %), ciprofloxacina (69 %), enrofloxacina (66 %), tetraciclina (63 %), oxacilina (57 %), tobramicina (45 %) e rifampicina (42 %). A grande maioria dos isolados foi suscetível à vancomicina e gentamicina, enquanto que todos os isolados demonstraram ser suscetíveis ao florfenicol.

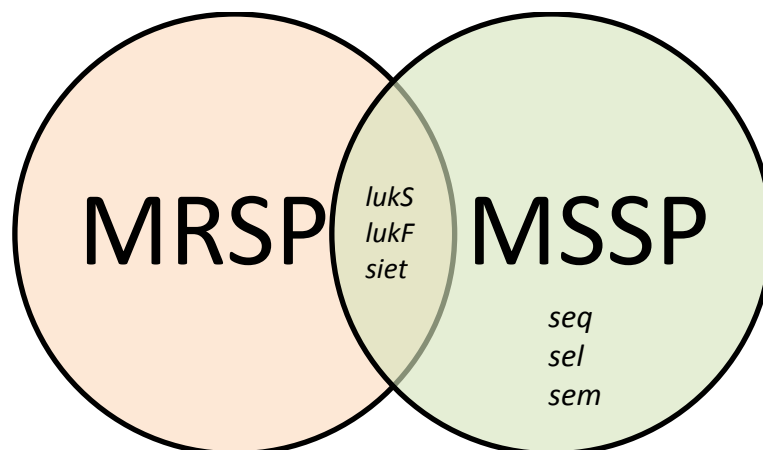
A relação entre ambas às características, presença de genes de toxinas e classificação de resistência ou susceptibilidade à oxacilina (MRSP ou MSSP), é ilustrada na Figura 4.

Figura 3 – Perfil de resistência dos isolados de *Staphylococcus pseudintermedius* aos antimicrobianos



CIP: ciprofloxacina; CLI: clindamicina; ENO: enrofloxacina; ERI: eritromicina; FLF: florfenicol; GEN: gentamicina; NAL: ácido nalidíxico; OXA: oxacilina; RIF: rifampicina; SUT: sulfametoxazol-trimetropim; TET: tetraciclina; TOB: tobramicina e VAN: vancomicina. Fonte: próprio autor.

Figura 4 – Diagrama de Venn correlacionando a identificação de genes codificadores de toxinas entre as cepas MRSP e MSSP



Abreviações: MRSP: *Methicillin resistant Staphylococcus pseudintermedius*. MSSP: *Methicillin susceptible Staphylococcus pseudintermedius*. Fonte: próprio autor.

Caracterização dos isolados quanto a capacidade de formação de biofilme *in vitro*

Os ensaios de formação de biofilme *in vitro* foram realizados em placas de poliestireno, e os resultados apontam que com a exceção de um isolado (identificação: 817) que, *in vitro*, demonstrou ser um moderado formador de biofilme, os demais foram todos classificados como fortes formadores de biofilme, não sendo observadas associações entre o local de isolamento e a classificação de formação de biofilme dentre as cepas estudadas (Tabela 2).

Discussão

Comparativamente à *Staphylococcus aureus*, existem poucas informações a respeito de fatores de virulência e patogenicidade de *S. pseudintermedius*. Desta maneira, o objetivo deste trabalho foi analisar isolados de *S. pseudintermedius* provindos de diferentes sítios de infecção de caninos quanto a presença de genes codificadores de toxinas, perfil de resistência aos antimicrobianos e capacidade de formação de biofilme, a fim de caracterizar os isolados quanto ao seu perfil de virulência. Foi identificado um alto perfil de virulência nos *S. pseudintermedius* estudados, incluindo presença de vários genes codificadores de toxinas, perfil de multirresistência e forte capacidade de formação de biofilme nas condições testadas.

Nesse estudo, a frequência da presença tanto do gene *lukS*, quanto *lukF* foi alta em todos os isolados estudados (Tabela 2). Esses dois genes associados codificam a toxina Luk-I, semelhante à leucocidina *Panton-Valentine* sintetizada por *S. aureus* (YOONG; TORRES, 2015), a qual causa destruição de leucócitos e necrose tecidual através da formação de poros octaméricos que penetram na bicamada lipídica da membrana plasmática da célula, levando ao influxo e efluxo de íons (YOONG; TORRES, 2015). A ampla ocorrência destes genes nos isolados estudados permite observar que, independentemente do sítio de infecção de origem de *S. pseudintermedius*, estas bactérias possuem, na sua grande maioria, a maquinaria genética para a síntese dessa toxina, a qual é muito importante na virulência de *Staphylococcus*. No entanto, levando em conta dados encontrados por outros pesquisadores, onde os mesmos genes são amplamente observados em cepas de *S. pseudintermedius* (FUTAGAWA-SAITO *et al.*, 2004; RUSCHER *et al.*, 2010), sendo inclusive detectados tanto em animais saudáveis quanto doentes (GARBAZ *et al.*, 2013), nos leva a concluir que reguladores transcricionais destes genes devem ser relevantes para a virulência das cepas, pois já foi demonstrado que a presença da mesma por si só causa efeito citotóxico (ABOUELKHAIR *et al.* 2018).

Outro gene encontrado com alta frequência foi *siet*, que codifica uma toxina esfoliativa, importante na patogênese de casos clínicos de piodermatite. Estudos experimentais, *in vivo*, demonstram que a administração desta toxina em cães, leva a sinais clínicos como eritema, esfoliação e crostas, semelhantes aos sinais observados na piodermatite canina (TERAUCHI *et al.*, 2003). Isso evidencia que as consequências da presença da toxina se restringem aos sítios dermatológicos. Entretanto, no presente estudo foi possível identificar o gene não somente em isolados oriundos de casos clínicos de piodermatite, como também foi encontrado em *S. pseudintermedius* isolados de piometra, cistite, otite e sepse. Esse fato evidencia potencialmente que *S. pseudintermedius* de diversos sítios infecciosos podem expressar essa toxina esfoliativa, dependendo, provavelmente, de influências de fatores externos ambientais e do próprio hospedeiro na indução da expressão da toxina.

Os genes de detecção menos frequente, *seq*, *sel* e *sem*, são genes que codificam para enterotoxinas SE1Q, SE1L e SE1M, respectivamente, que são toxinas pirogênicas que ao se ligarem às moléculas de MHC II causam uma estimulação exacerbada de linfócitos T e imunossupressão e, ademais da atividade de superantígeno, as SE1 também induzem diarreia (YOON *et al.*, 2010). Esses genes foram encontrados em *S. pseudintermedius* isolados de casos de cistite, piometra e sepse, sendo, portanto, ausentes em isolados provindos de quadros de piodermatite ou otite. Casos de piometra ou sepse são sempre definidos como quadros de infecção aguda, sendo provável que cepas mais patogênicas, ou seja, com mais fatores de virulência estejam presentes causando infecção. Enquanto que quadros de piodermatite geralmente são traçados como crônicos, sendo possível associar assim a ausência dos genes supracitados nos isolados provindos desse sítio. Porém são necessários mais estudos para verificar como a presença desses genes está envolvida na patogenicidade do sítio de infecção. Além disso, esses genes estavam presentes em cepas MSSP e ausentes em MRSP, por mais que o gene já tenha sido descrito, anteriormente, em cepas MRSP (PHUMTHANAKORN *et al.*, 2018). Porém, os dados obtidos, bem como os descritos na literatura, são insuficientes para determinar se existe alguma correlação entre presença de genes de virulência e resistência à meticilina.

Os genes *sea*, *seb*, *sec* e *tst* não foram encontrados nos isolados neste presente estudo, assim como ocorreu, de maneira semelhante, em outros trabalhos (YOON *et al.*, 2010; GARBACZ *et al.*, 2013). Além do mais, a variação da enterotoxina C presente em *S. pseudintermedius* isolados de cães, codificada pelo gene *seccanine*, não foi identificada em nenhum dos isolados no presente estudo. Estes achados estão em concordância com os outros

estudos que já buscaram por esse gene em isolados de *S. pseudintermedius*, e identificaram que o mesmo é comumente encontrado em uma baixa frequência (YOON *et al.*, 2010; GARBACZ *et al.*, 2013).

O perfil de resistência aos antimicrobianos demonstrou que a maioria dos isolados classificados como MRSP foram isolados provindos de casos de piodermatite (n=17). Por estarem presentes em um sítio em que ocorrem infecções crônicas, que é o caso da piodermatite, e por possivelmente sofrerem uma maior pressão seletiva por agente externos, incluindo drogas antimicrobianas e antissépticos, é possível que ocorra a seleção de cepas carreadoras de genes e elementos de resistência, visto que, todos os isolados MRSP também foram classificados como *multidrug resistant*. Ainda, pode ser observado na Figura 3 que um grupo de isolados obteve um padrão de multirresistência aos antimicrobianos semelhante entre si, onde partilham a característica de serem predominantemente isolados de piodermatite, demonstrando que pode ser que exista alguma influência externa a respeito do local de infecção em relação ao padrão fenotípico de resistência aos antimicrobianos.

De acordo com o CLSI-VET (2018) *Staphylococcus* resistentes à oxacilina devem ser reportados como resistentes a todos os β -lactâmicos, incluindo a metilicina. Majoritariamente a resistência à oxacilina é mediada pelo gene *mecA*, codificador da proteína PBP2a. Assim, isolados testados positivos para *mecA* devem ser reportados como resistentes a oxacilina (CLSI-VET (2018)). Interessantemente, em apenas um dos isolados estudados que se apresentou, *in vitro*, fenotipicamente susceptível à oxacilina foi identificada, por reação de PCR, a presença do gene *mecA*, o qual é um importante fator na conferência de resistência aos antibióticos β -lactâmicos. Acreditamos que são necessários mais estudos para o entendimento da regulação da expressão deste gene tanto *in vitro* como *in vivo*.

No presente estudo, foi possível observar que tanto cepas MRSP quanto MSSP são capazes de produzir biofilme, nas condições testadas, não havendo diferenças entre ambas, como já foi demonstrado e descrito anteriormente (HAN; YANG; PARK, 2015; STEFANETTI *et al.*, 2017). Os isolados de *S. pseudintermedius* estudados foram classificados como fortes formadores de biofilme, independente, inclusive, do sítio de infecção de origem dos mesmos. A formação de biofilme facilita a comunicação entre bactérias, através de sinalização por *quorum sensing*; promove uma maior capacidade de evasão da resposta imune do hospedeiro, bem como resistência à ação de antimicrobianos; e ainda, implica em uma maior proteção física e química das bactérias pela formação da matriz do biofilme (FLEMMING, 2009). Além desses fatores, foi comprovado que quanto maior foi a intensidade da produção de biofilme, maior é a síntese de proteínas pró inflamatórias

(ARIMA *et al*, 2018), sendo assim, podemos concluir que os isolados estudados no presente trabalho, por apresentarem de maneira quase unânime uma forte formação de biofilme, possuem grande potencial patogênico.

Conclusão

Em conclusão, a alta ocorrência de genes codificadores de toxinas, como *lukS*, *lukF* e *siet*, a forte capacidade de formação de biofilme *in vitro* e os diversos perfis de multirresistência aos antimicrobianos presentes nos isolados de *S. pseudintermedius* deste estudo, sugerem o grande potencial patogênico desta espécie. Também foi possível observar a presença de alguns genes, como *sel*, *sem* e *seq*, somente em cepas MSSP e em determinados sítios, sugerindo a necessidade de mais estudos a respeito da possibilidade de existir correlação entre genes de virulência e resistência à oxacilina ou sítio de infecção do agente.

Agradecimentos

Ao setor de Medicina Veterinária Preventiva da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS) pela disponibilidade de parte dos isolados bacterianos.

4. CONCLUSÕES

Staphylococcus pseudintermedius é um agente com grande potencial patogênico. A presença de genes que codificam enterotoxinas, toxinas esfoliativas e superantígenos demonstram possuir grande variação dentre os trabalhos presentes na literatura, evidenciando a necessidade de maiores estudos sobre o tema.

Através desse estudo pôde-se concluir que:

- a) A maioria dos isolados possuem os genes *lukS*, *lukF* e *siet*.
- b) Nenhum isolado possui os genes *sea*, *seb*, *sec*, *seccanine* e *tst-1*.
- c) A maioria dos isolados são classificados como *Multidrug resistant*.
- d) Os genes *sel*, *sem* e *seq* foram detectados em isolados de casos de cistite, piometra e sepse, sendo, portanto, ausentes em isolados provindos de quadros de piodermatite ou otite.
- e) Os isolados que possuíam os genes *sel*, *sem* e *seq* foram todos classificados como MSSP.
- f) A maioria dos isolados classificados como MRSP foram isolados provindos de casos de piodermatite.
- g) A observação de um amplo perfil de isolados classificados como fortes formadores de biofilme, evidencia ainda mais as características de *S. pseudintermedius* sendo agentes com grande potencial patogênico e virulento.

REFERÊNCIAS

- ABOUELKHAIR, M. A. *et al.* Characterization of a leukocidin identified in *Staphylococcus pseudintermedius*. **PloS one**, San Francisco, v. 13, n. 9, p. e0204450, sep. 2018.
- ABRAHAM, J. L. *et al.* Surveillance of healthy cats and cats with inflammatory skin disease for colonization of the skin by methicillin-resistant coagulase-positive staphylococci and *Staphylococcus schleiferi* ssp. *schleiferi*. **Veterinary dermatology**, Oxford, v. 18, n. 4, p. 252-259, aug. 2007.
- ARIMA, S. *et al.* *Staphylococcus pseudintermedius* biofilms secrete factors that induce inflammatory reactions in vitro. **Letters in applied microbiology**, Oxford, v. 67, n. 3, p. 214-219, sep. 2018.
- BANNOEHR, J. *et al.* Population genetic structure of the *Staphylococcus intermedius* group: insights into agr diversification and the emergence of methicillin-resistant strains. **Journal of Bacteriology**, Washington, v. 189, n. 23, p. 8685-8692, dec. 2007.
- BANNOEHR, J.; GUARDABASSI, L. *Staphylococcus pseudintermedius* in the dog: taxonomy, diagnostics, ecology, epidemiology and pathogenicity. **Veterinary dermatology**, Oxford, v. 23, n. 4, p. 253-e52, aug. 2012.
- BECKER, K.; ROTH, R.; PETERS, G. Rapid and specific detection of toxigenic *Staphylococcus aureus*: use of two multiplex PCR enzyme immunoassays for amplification and hybridization of staphylococcal enterotoxin genes, exfoliative toxin genes, and toxic shock syndrome toxin 1 gene. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 36, n. 9, p. 2548-2553, 1998.
- BROWN, D. F. J.; REYNOLDS, P. E. Intrinsic resistance to β -lactam antibiotics in *Staphylococcus aureus*. **FEBS letters**, Amsterdam, v. 122, n. 2, p. 275-278, dec. 1980.
- CLSI. Performance Standards for Antimicrobial Disk and Dilution Susceptibility Tests for Bacteria Isolated From Animals. 4th ed. **CLSI supplement VET08**. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2018.
- CHAN, W.Y. *et al.* Biofilm production by pathogens associated with canine otitis externa, and the antibiofilm activity of ionophores and antimicrobial adjuvants. **Journal of veterinary pharmacology and therapeutics**, Oxford, p. 1-11, sep. 2019.
- CHUANG, C. Y. *et al.* Catheter-related bacteremia caused by *Staphylococcus pseudintermedius* refractory to antibiotic-lock therapy in a hemophilic child with dog exposure. **Journal of clinical microbiology**, Washington, v. 48, n. 4, p. 1497-1498, apr. 2010.
- DEVRIESE, L. A. *et al.* *Staphylococcus pseudintermedius* versus *Staphylococcus intermedius*. **Veterinary Microbiology**, Amsterdam, v. 133, p. 206–207, jan. 2009.

- DEVRIESE, L. A. *et al.* *Staphylococcus pseudintermedius* sp. nov., a coagulase-positive species from animals. **International Journal Systematic and Evolutionary Microbiology**, Reading, v. 55, p. 1569-1573, jul. 2005.
- DIRIBE, O. *et al.* Genotypic relatedness and characterization of *Staphylococcus pseudintermedius* associated with post-operative surgical infections in dogs. **Journal of Medical Microbiology**, Edinburgh, v. 64, p. 1074–1081, sep. 2015.
- DONLAN, R. M. Biofilm formation: a clinically relevant microbiological process. **Clinical Infectious Diseases**, Chicago, v. 33, n. 8, p. 1387-1392, oct. 2001.
- EDWARDS, V. M. *et al.* Characterization of the canine type C enterotoxin produced by *Staphylococcus intermedius* pyoderma isolates. **Infection and immunity**, Washington, v. 65, n. 6, p. 2346-2352, jun. 1997.
- FITZPATRICK, F.; HUMPHREYS, H.; O'GARA, J. P. Evidence for icaADBC-independent biofilm development mechanism in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clinical isolates. **Journal of clinical microbiology**, Washington, v. 43, n. 4, p. 1973-1976, apr. 2005.
- FLEMMING, H. C. Why microorganisms live in biofilms and the problem of biofouling. *In*: FLEMMING, H. C. *et al.* (ed.). **Marine and industrial biofouling**. Heidelberg: Springer-Verlag, 2009. p. 3-12. (Springs Series on Biofilms, 4).
- FUTAGAWA-SAITO, K. *et al.* Identification and prevalence of an enterotoxin-related gene, se-int, in *Staphylococcus intermedius* isolates from dogs and pigeons. **Journal of applied microbiology**, Oxford, v. 96, n. 6, p. 1361-1366, 2004.
- FUTAGAWA-SAITO, K. *et al.* Identification of first exfoliative toxin in *Staphylococcus pseudintermedius*. **FEMS microbiology letters**, Amsterdam, v. 301, n. 2, p. 176-180, dec. 2009.
- FUTAGAWA-SAITO, K. *et al.* Prevalence and characterization of leukotoxin-producing *Staphylococcus intermedius* in isolates from dogs and pigeons. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 42, n. 11, p. 5324-5326, nov. 2004.
- FUTAGAWA-SAITO, K. *et al.* Prevalence of virulence factors in *Staphylococcus intermedius* isolates from dogs and pigeons. **BMC veterinary research**, London, v. 2, n. 1, p. 4, jan. 2006.
- GARBACZ, K. *et al.* Pathogenicity potential of *Staphylococcus pseudintermedius* strains isolated from canine carriers and from dogs with infection signs. **Virulence**, Austin, v. 4, n. 3, p. 255-259, apr. 2013.
- GERKE, C. *et al.* Characterization of the N-Acetylglucosaminyltransferase Activity Involved in the Biosynthesis of the *Staphylococcus epidermidis* Polysaccharide Intercellular Adhesin. **Journal of Biological Chemistry**, Baltimore, v. 273, n. 29, p. 18586-18593, jul. 1998.

- GHARSA, H. *et al.* Antimicrobial resistance, virulence genes, and genetic lineages of *Staphylococcus pseudintermedius* in healthy dogs in Tunisia. **Microbial ecology**, New York, v. 66, n. 2, p. 363-368, aug. 2013.
- HAJEK, V. *Staphylococcus intermedius*, a new species isolated from animals. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, London v. 26, n. 4, p. 401-408, 1976.
- HAN J. I.; YANG C. H.; PARK H. M. Emergence of biofilm-producing *Staphylococcus pseudintermedius* isolated from healthy dogs in South Korea. **Veterinary Quarterly**, Hague, v. 35, p. 207-210, oct. 2015.
- HILL, P. B.; IMAI, A. The immunopathogenesis of staphylococcal skin infections—A review. **Comparative immunology, microbiology and infectious diseases**, Oxford, v. 49, p. 8-28, dec. 2016.
- HILLIER, A. *et al.* Guidelines for the diagnosis and antimicrobial therapy of canine superficial bacterial folliculitis (Antimicrobial Guidelines Working Group of the International Society for Companion Animal Infectious Diseases). **Veterinary dermatology**, Oxford, v. 25, n. 3, p. 163-e43, jun. 2014.
- IYORI, K. *et al.* Identification of a novel *Staphylococcus pseudintermedius* exfoliative toxin gene and its prevalence in isolates from canines with pyoderma and healthy dogs. **FEMS microbiology letters**, Amsterdam, v. 312, n. 2, p. 169-175, nov. 2010.
- IYORI, K. *et al.* *Staphylococcus pseudintermedius* exfoliative toxin EXI selectively digests canine desmoglein 1 and causes subcorneal clefts in canine epidermis. **Veterinary dermatology**, Oxford, v. 22, n. 4, p. 319-326, aug. 2011.
- JAIN, A.; AGARWAL, A. Biofilm production, a marker of pathogenic potential of colonizing and commensal staphylococci. **Journal of microbiological methods**, Amsterdam, v. 76, n. 1, p. 88-92, jan. 2009.
- KATAYAMA, Y.; ITO, T.; HIRAMATSU, K. A new class of genetic element, staphylococcus cassette chromosome mec, encodes methicillin resistance in *Staphylococcus aureus*. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, Washington, v. 44, n. 6, p. 1549-1555, jun. 2000.
- KMIECIAK, W.; SZEWCZYK, E. M. Are zoonotic *Staphylococcus pseudintermedius* strains a growing threat for humans? **Folia microbiologica**, New York, v. 63, n. 6, p. 743-747, nov. 2018.
- LAUTZ, S. *et al.* Dissemination of the gene encoding exfoliative toxin of *Staphylococcus intermedius* among strains isolated from dogs during routine microbiological diagnostics. **Journal of Veterinary Medicine, Series B**, Berlin, v. 53, n. 9, p. 434-438, nov. 2006.
- LINA, G. *et al.* Standard nomenclature for the superantigens expressed by *Staphylococcus*. **The Journal of infectious diseases**, Chicago, v. 189, n. 12, p. 2334-2336, jun. 2004.

- LOPES, G. V. *et al.* Methicillin-resistant *Staphylococcus pseudintermedius* clonal groups isolated from canine pyoderma in Brazil. **Acta Scientiae Veterinariae**, Porto Alegre, v. 43, p. 1138, 2015.
- LOZANO, C. *et al.* *Staphylococcus pseudintermedius* human infection cases in Spain: dog-to-human transmission. **Vector-Borne and Zoonotic Diseases**, Larchmont, v. 17, n. 4, p. 268-270, apr. 2017.
- MADIGAN, M. T. *et al.* Regulação metabólica. In: MADIGAN, M. T. *et al.* **Microbiologia de Brock**. 14. ed. Porto Alegre : Artmed, 2016. p. 215-244.
- MENANDRO, M. L. *et al.* Prevalence and characterization of methicillin-resistant *Staphylococcus pseudintermedius* from symptomatic companion animals in Northern Italy: Clonal diversity and novel sequence types. **Comparative immunology, microbiology and infectious diseases**, Oxford, v. 66, p. 101331, oct. 2019.
- MURRAY, A. K. *et al.* *Staphylococcus cornubiensis* sp. nov., a member of the *Staphylococcus intermedius* Group (SIG). **International journal of systematic and evolutionary microbiology**, London, v. 68, n. 11, p. 3404-3408, nov. 2018.
- NISA, S. *et al.* Combining MALDI-TOF and genomics in the study of methicillin resistant and multidrug resistant *Staphylococcus pseudintermedius* in New Zealand. **Scientific reports**, London, v. 9, n. 1, p. 1271, feb. 2019.
- OMOE, K. *et al.* Comprehensive analysis of classical and newly described staphylococcal superantigenic toxin genes in *Staphylococcus aureus* isolates. **FEMS microbiology letters**, Amsterdam, v. 246, n. 2, p. 191-198, 2005.
- PALMQVIST, N. *et al.* Protein A is a virulence factor in *Staphylococcus aureus* arthritis and septic death. **Microbial pathogenesis**, London, v. 33, n. 5, p. 239-249, nov. 2002.
- PAUL, N. C. *et al.* Carriage of methicillin-resistant *Staphylococcus pseudintermedius* in small animal veterinarians: indirect evidence of zoonotic transmission. **Zoonoses and public health**, Berlin, v. 58, n. 8, p. 533-539, dec. 2011.
- PELLERIN, J. L. *et al.* Epidemiosurveillance of antimicrobial compound resistance of *Staphylococcus intermedius* clinical isolates from canine pyodermas. **Comparative immunology, microbiology and infectious diseases**, Oxford, v. 21, n. 2, p. 115-133, apr. 1998.
- PHUMTHANAKORN, N. *et al.* Enterotoxin gene profile of methicillin-resistant *Staphylococcus pseudintermedius* isolates from dogs, humans and the environment. **Journal of medical microbiology**, London, v. 67, n. 6, p. 866-873, jun. 2018.
- POTTUMARTHY, S. *et al.* Clinical isolates of *Staphylococcus intermedius* masquerading as methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. **Journal of clinical microbiology**, Washington, v. 42, n. 12, p. 5881-5884, dec. 2004.

RUSCHER, C. *et al.* Widespread rapid emergence of a distinct methicillin-and multidrug-resistant *Staphylococcus pseudintermedius* (MRSP) genetic lineage in Europe. **Veterinary microbiology**, Amsterdam, v. 144, n. 3-4, p. 340-346, aug. 2010.

SAHAL, G.; BILKAY, I. S. Multi drug resistance in strong biofilm forming clinical isolates of *Staphylococcus epidermidis*. **Brazilian Journal of Microbiology**, Rio de Janeiro, v. 45, n. 2, p. 539-544, ago. 2014.

SASAKI, T. *et al.* Methicillin-resistant *Staphylococcus pseudintermedius* in a veterinary teaching hospital. **Journal of clinical microbiology**, Washington, v. 45, n. 4, p. 1118-1125, apr. 2007.

SASAKI, T. *et al.* Reclassification of phenotypically identified *Staphylococcus intermedius* strains. **Journal of clinical microbiology**, Washington, v. 45, n. 9, p. 2770-2778, sep. 2007.

SHARMA, H. *et al.* Toxic Shock Syndrome Toxin 1 Evaluation and Antibiotic Impact in a Transgenic Model of Staphylococcal Soft Tissue Infection. **mSphere**, Washington, v. 4, n. 5, p. e00665-19, oct. 2019.

SINGH, A. *et al.* Characterization of the biofilm forming ability of *Staphylococcus pseudintermedius* from dogs. **BMC veterinary research**, London, v. 9, n. 1, p. 93, may. 2013.

STEFANETTI, tefanetti V. *et al.* . Investigation of the antibiotic resistance and biofilm formation of *Staphylococcus pseudintermedius* strains isolated from canine pyoderma. **Veterinaria Italiana**, Teramo, v. 53, p. 289-296, dec. 2017.

STEPANOVIĆ, S. *et al.* Quantification of biofilm in microtiter plates: overview of testing conditions and practical recommendations for assessment of biofilm production by staphylococci. **Apmis**, Copenhagen, v. 115, n. 8, p. 891-899, aug. 2007.

TALAN, D. A. *et al.* *Staphylococcus intermedius*: clinical presentation of a new human dog bite pathogen. *Annals of emergency medicine*, **Lansing**, v. 18, n. 4, p. 410-413, apr. 1989.

TANABE, T. *et al.* Prevalence of staphylococcal enterotoxins in *Staphylococcus pseudintermedius* isolates from dogs with pyoderma and healthy dogs. **Microbiology and immunology**, Richmond, v. 57, n. 9, p. 651-654, sep. 2013.

TERAUCHI, R. *et al.* Cloning of the gene coding for *Staphylococcus intermedius* exfoliative toxin and its expression in *Escherichia coli*. **Veterinary microbiology**, Amsterdam, v. 94, n. 1, p. 31-38, jun. 2003.

TERAUCHI, R. *et al.* Isolation of exfoliative toxin from *Staphylococcus intermedius* and its local toxicity in dogs. **Veterinary microbiology**, Amsterdam, v. 94, n. 1, p. 19-29, jun. 2003.

VAN DUIJKEREN, E. *et al.* Methicillin-resistant staphylococci isolated from animals. **Veterinary microbiology**, Amsterdam, v. 103, n. 1-2, p. 91-97, 2004.

VAN DUIJKEREN, E. *et al.* Review on methicillin-resistant *Staphylococcus pseudintermedius*. **Journal of antimicrobial chemotherapy**, v. 66, n. 12, p. 2705-2714, 2011.

VELÁZQUEZ-GUADARRAMA, N. *et al.* Presence of environmental coagulase-positive staphylococci, their clonal relationship, resistance factors and ability to form biofilm. **Revista Argentina de microbiología**, Buenos Aires, v. 49, n. 1, p. 15-23, ene. 2017.

WALTHER, B. *et al.* Sharing more than friendship—nasal colonization with coagulase-positive staphylococci (CPS) and co-habitation aspects of dogs and their owners. **PloS one**, San Francisco, v. 7, n. 4, p. e35197, 2012.

WEESE, J. S.; VAN DUIJKEREN, E. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus pseudintermedius* in veterinary medicine. **Veterinary microbiology**, Amsterdam, v. 140, n. 3-4, p. 418-429, jan. 2010.

YOON, J. W. *et al.* Prevalence of genes for enterotoxins, toxic shock syndrome toxin 1 and exfoliative toxin among clinical isolates of *Staphylococcus pseudintermedius* from canine origin. **Veterinary dermatology**, Oxford, v. 21, n. 5, p. 484-489, oct. 2010.

YOONG, P.; TORRES, V. J. Counter inhibition between leukotoxins attenuates *Staphylococcus aureus* virulence. **Nature communications**, London, v. 6, p. 8125, sep. 2015.