

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA - UNESP
CÂMPUS DE JABOTICABAL**

**BACTÉRIAS ASSOCIADAS À FERIDAS CUTÂNEAS
AGUDAS E CRÔNICAS EM CÃES**

**Luciana de Cenço Corrêa de Lacerda
Médica Veterinária**

2018

**T
E
S
E
/
L
A
C
E
R
D
A**

**L.
C.
C.**

**2
0
1
8**

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA - UNESP
CÂMPUS DE JABOTICABAL**

**BACTÉRIAS ASSOCIADAS À FERIDAS CUTÂNEAS
AGUDAS E CRÔNICAS EM CÃES**

Luciana de Cenço Corrêa de Lacerda

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Paola Castro Moraes

Coorientadora: Dr^a. Andressa de Souza-Pollo

Tese apresentada à Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – Unesp, Câmpus de Jaboticabal, como parte das exigências para a obtenção do título de Doutor em Medicina Veterinária (área de concentração) - Cirurgia Veterinária.

2018

L131b Lacerda, Luciana de Cenço Corrêa
Bactérias associadas à feridas cutâneas agudas e crônicas em
cães / Luciana de Cenço Corrêa de Lacerda. – – Jaboticabal, 2018
xix, 71 p. : il. ; 29 cm

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de
Ciências Agrárias e Veterinárias, 2018

Orientadora: Paola Castro Moraes

Coorientadora: Andressa de Souza-Pollo

Banca examinadora: Alessandra Aparecida Medeiros-Ronchi,
José Geraldo Meirelles Palma Isola, Janete Aparecida Desidério,
Annelise Carla Camplesi

Bibliografia

1. Feridas-cutâneas. 2. Bactérias. 3. Cães. 4. Sequenciamento
16S rRNA 5. Resistência antimicrobiana. I. Título. II. Jaboticabal-
Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias.

CDU 619:616.98:636.7

Ficha catalográfica elaborada pela Seção Técnica de Aquisição e Tratamento da Informação –
Diretoria Técnica de Biblioteca e Documentação - UNESP, Câmpus de Jaboticabal.



CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO DA TESE: BACTÉRIAS ASSOCIADAS À FERIDAS CUTÂNEAS AGUDAS E CRÔNICAS EM CÃES

AUTORA: LUCIANA DE CENÇO CORRÊA LACERDA
ORIENTADORA: PAOLA CASTRO MORAES
COORDENADORA: ANDRESSA DE SOUZA POLLO

Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de Doutora em CIRURGIA VETERINÁRIA, pela Comissão Examinadora:

Profa. Dra. PAOLA CASTRO MORAES
Departamento de Clínica e Cirurgia Veterinária / FCAV/UNESP - Jaboticabal

Profa. Dra. ALESSANDRA APARECIDA MEDEIROS-RONCHI
Faculdade de Medicina Veterinária / UFU - Uberlândia/MG

Profa. Dra. JANETE APARECIDA DESIDERIO
Departamento de Biologia Aplicada à Agropecuária / FCAV / UNESP - Jaboticabal

Doutor JOSÉ GERALDO MEIRELLES PALMA ISOLA
Médico Veterinário / Autônomo / Ribeirão Preto / SP

Profa. Dra. ANNELISE CARLA CAMPLESI DOS SANTOS
Departamento de Clínica e Cirurgia Veterinária / FCAV / UNESP - Jaboticabal

Jaboticabal, 03 de maio de 2018

DADOS CURRICULARES DO AUTOR

LUCIANA DE CENÇO CORRÊA DE LACERDA - nascida em 02 de outubro de 1983, em Ribeirão Preto, São Paulo. Graduiu-se em Medicina Veterinária pela UEL - Universidade Estadual de Londrina - PR, em dezembro de 2008. Concluiu a Residência Veterinária, na área de Clínica Médica e Cirurgia de Pequenos Animais, na UNIRP – Centro Universitário de Rio Preto, na cidade de São José do Rio Preto - São Paulo, em março de 2011. Obteve título de mestre em Cirurgia Veterinária pela Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias (FCAV) - UNESP - Câmpus de Jaboticabal, sob orientação do Prof. Dr. José Luiz Laus, em março de 2014. Atualmente, é aluna regular do Programa de Pós-graduação em Cirurgia Veterinária, nível de doutorado, da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias (FCAV) - UNESP - Câmpus de Jaboticabal, sob orientação da Prof^a. Dr^a. Paola Castro Moraes e coorientação da Dr^a Andressa de Souza-Pollo.

SUMÁRIO

| | Página |
|--|--------|
| RESUMO..... | iv |
| ABSTRACT..... | v |
| 1. INTRODUÇÃO | 01 |
| 2. REVISÃO DE LITERATURA | 03 |
| 2.1. Feridas cutâneas | 03 |
| 2.2. Microbiota cutânea | 04 |
| 2.3. Infecções bacterianas associadas às feridas cutâneas | 06 |
| 2.4. Espécies bacterianas produtoras de enterotoxinas | 09 |
| 2.5. Resistência bacteriana a antimicrobianos | 11 |
| 2.6. Diagnóstico molecular..... | 16 |
| 3. MATERIAL E MÉTODOS | 17 |
| 3.1. Locais de coleta e processamento das amostras e ética no uso de animais | 17 |
| 3.2. Amostragem | 17 |
| 3.3. Obtenção dos isolados | 18 |
| 3.4. Extração de DNA dos isolados | 18 |
| 3.5. Seleção dos isolados por RAPD | 19 |
| 3.6. Sequenciamento da região 16S rRNA | 20 |
| 3.7. PCR espécie-específico para <i>Staphylococcus</i> spp. e <i>Bacillus</i> spp. e identificação de genes codificadores de toxinas em isolados de <i>Staphylococcus</i> , <i>Bacillus</i> e <i>E. coli</i> | 21 |
| 3.8. PCR para identificação de genes codificadores de enzimas que conferem resistência a antimicrobianos | 22 |
| 3.9. Testes de sensibilidade a antimicrobianos | 23 |
| 4. RESULTADOS | 24 |
| 4.1. Isolados obtidos, seleção dos isolados e identificação por sequenciamento da região 16S rRNA | 24 |

| | |
|--|----|
| 4.2. PCR espécie-específico para <i>Staphylococcus</i> spp. e <i>Bacillus</i> spp. e identificação de genes codificadores de toxinas de <i>Staphylococcus</i> , <i>Bacillus</i> e <i>E. coli</i> | 33 |
| 4.3. PCR para identificação de genes codificadores de enzimas que conferem resistência a antimicrobianos | 34 |
| 4.4. Teste de sensibilidade a antimicrobianos | 34 |
| 5. DISCUSSÃO | 39 |
| 6. CONCLUSÕES | 47 |
| 7. REFERÊNCIAS | 48 |
| Anexo 1 | 69 |
| Anexo 2 | 71 |

CEUA – COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

CERTIFICADO

Certificamos que o projeto intitulado "Identificação de gêneros bacterianos associados à feridas cutâneas agudas e crônicas de cães e sensibilidade a antimicrobianos", protocolo nº 013690/17, sob a responsabilidade da Prof.^a Dr.^a Paola Castro Moraes, que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao Filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica (ou ensino) - encontra-se de acordo com os preceitos da lei nº 11.794, de 08 de outubro de 2008, no decreto 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA), da FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS, UNESP - CÂMPUS DE JABOTICABAL-SP, em reunião ordinária de 06 de setembro de 2017.

| | |
|---------------------|---|
| Vigência do Projeto | 10/09/2017 a 10/11/2017 |
| Espécie / Linhagem | <i>Canis lupus familiaris</i> |
| Nº de animais | 20 |
| Peso / Idade | Variado |
| Sexo | Ambos os sexos |
| Origem | Hospital Veterinário "Governador Laudo Natta" - UNESP |

Jaboticabal, 06 de setembro de 2017.


Prof.^a Dr.^a Lizandra Amoroso
Coordenadora – CEUA

BACTÉRIAS ASSOCIADAS À FERIDAS CUTÂNEAS AGUDAS E CRÔNICAS EM CÃES

RESUMO - Lesões na pele podem resultar em feridas que, dependendo do tempo de reparação tissular podem ser classificadas como agudas ou crônicas, sendo crônicas aquelas que não apresentaram cicatrização dentro do período de quatro semanas. A ferida é contaminada por diferentes espécies bacterianas, sendo o sistema imunológico da pele o responsável por impedir que tais contaminações evoluam para infecções. No entanto, muitas vezes o quadro infeccioso é instalado, havendo necessidade de tratamento com antimicrobianos. Tendo em vista que o mau uso de antimicrobianos provoca resistência a multidrogas em estirpes bacterianas potencialmente patogênicas, este trabalho teve como objetivo identificar as bactérias prevalentes em feridas agudas e crônicas de cães por meio de sequenciamento da região 16S rRNA e testar a sensibilidade dos isolados a diferentes antimicrobianos. Para tanto, foram amostradas 20 feridas, sendo cada uma de um cão atendido no Hospital Veterinário da UNESP, Câmpus de Jaboticabal. De cada ferida foram obtidos dez isolados, os quais foram selecionados para o sequenciamento de DNA por meio de comparação entre os perfis genéticos obtidos pelo emprego de marcador molecular randômico. Foram sequenciados 74 isolados identificados como pertencentes a oito gêneros de bactérias gram-negativas, *Proteus mirabilis*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Enterobacter* spp., *Acinetobacter baumannii*, *Klebsiella* spp., *Kluyvera georgiana* e *Providencia stuartii*, e três de gram-positivas, *Enterococcus* sp., *Staphylococcus* spp. e *Bacillus* spp. Casos de cães com feridas agudas ou crônicas, associadas a mais de um gênero bacteriano, foram de 85,7% e 30,7%, respectivamente. Isolados da espécie *S. aureus* apresentaram amplificação para quatro genes codificadores das enterotoxinas *sea*, *seh*, *see* e *hlg*, enquanto um isolado de *B. cereus* foi positivo para a presença dos genes *hblA*, *hblC*, *hblD*, *nheA*, *nheB*, *nheC* e *entFM*. Dois dos isolados de *E. coli* (6%) apresentaram o gene *blaCTX-M-2* e provaram ser resistentes à cefotaxima, um antibiótico do grupo dos β -lactâmicos. Todos os isolados avaliados apresentaram resistência a pelo menos um dos antimicrobianos testados, sendo metronidazol, cefalexina e cefazolina, aqueles pelos quais os isolados mostraram maior resistência. Cinco pacientes que estavam sob antibioticoterapia no momento da coleta possuíam estirpes resistentes aos antimicrobianos pelos quais estavam sendo tratados. Tendo em vista que há uma grande diversidade bacteriana resistente à multidrogas colonizando feridas cutâneas agudas e crônicas de cães, a implantação de antibiogramas previamente à recomendação de antimicrobianos é prática imprescindível e deve ser implantada para preservação da saúde animal e, conseqüentemente, pública.

Palavras-chave: antibiograma, resistência bacteriana, enterotoxinas, genes de β -lactamases, pele, sequenciamento da região 16S rRNA.

BACTERIA ASSOCIATED WITH ACUTE AND CHRONIC SKIN WOUNDS IN DOGS

ABSTRACT - Skin lesions can result in cutaneous wounds that may be classified as acute or chronic depending on the period of time spent in tissue repairment. Wounds that have not healed within four weeks are generally classified as chronic. The wound is contaminated by different bacterial species and the immune system of the skin is responsible for preventing infections. Nonetheless, the infectious process is often developed and antimicrobial treatment become necessary. Considering that the misuse of antimicrobials provokes multidrug resistance in potentially pathogenic bacterial strains, this work aimed to identify prevalent bacteria in acute and chronic wounds of dogs by 16S rRNA sequencing and to test the sensitivity of the isolates to different antimicrobials. For that, 20 wounds were sampled, each one from a dog admitted at the Veterinary Hospital of UNESP, Jaboticabal, São Paulo, Brazil. From each wound ten isolates were obtained, which were selected for DNA sequencing through genetic profiles comparison by applying a random molecular marker. Seventy-five isolates were identified as belonging to eight Gram-negative bacteria genera, *Proteus mirabilis*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Enterobacter* spp., *Acinetobacter baumannii*, *Klebsiella* spp., *Kluyvera georgiana* and *Providencia stuartii*, and to three gram-positive bacteria genera, *Enterococcus* sp., *Staphylococcus* spp. and *Bacillus* spp. Cases of dogs with acute or chronic wounds associated to more than one bacterial genus were 85.7% and 30.7%, respectively. *Staphylococcus aureus* isolates presented amplification to four enterotoxin encoding the genes *sea*, *seh*, *see* and *hlg*, whereas a *B. cereus* isolate was positive for *hblA*, *hblC*, *hblD*, *nheA*, *nheB*, *nheC* and *entFM* genes. Two of the *E. coli* isolates (6%) presented the *blaCTX-M-2* gene and proved to be resistant to cefotaxime, a β -lactam antibiotic. All isolates evaluated were resistant to at least one of the antimicrobials tested, being metronidazole, cephalexin and cefazolin the ones for those the isolates showed to be more resistant. Five patients undergoing antibiotic therapy at the same period of sampling presented resistant bacterial strains to the antibiotics by which the patients were being treated. Considering that there is great multidrug resistant bacterial diversity colonizing acute and chronic cutaneous wounds of dogs, the implantation of antibiograms prior to the antimicrobials recommendation is a practice to be implemented in order to preserve animal and, consequently, public health.

KEYWORDS: antibiogram, bacterial resistance, enterotoxins, genes encoding β -lactamases, skin, 16S rRNA sequencing.

1. INTRODUÇÃO

A pele atua como barreira física, imunológica e microbiana muito eficaz na proteção do corpo contra desidratação e injúrias ambientais constantes (TORRES et al., 2017). Portanto, rupturas nesta barreira podem resultar em feridas e infecções. Feridas cutâneas são geralmente secundárias à mordedura, incisões cirúrgicas, queimaduras, injúrias, abrasões, lacerações dentre outras causas. Dependendo do tempo de cicatrização, as feridas cutâneas são classificadas como agudas ou crônicas, sendo as crônicas aquelas que não apresentam cicatrização dentro do período de quatro semanas (KORTING; SCHÖLLMANN; WHITE, 2011).

No entanto, uma das principais complicações de uma ferida aberta é a possibilidade de evolução para o quadro infeccioso. Os tecidos cutâneos expostos garantem ambiente propício para a proliferação bacteriana. A presença de bactérias nas feridas, mesmo sob ausência de infecção, provoca uma série de respostas locais e sistêmicas no hospedeiro que conduzem a um retardo na cicatrização, o que resulta em maior exposição da lesão à contaminação por diferentes espécies bacterianas (SIBBALD et al., 2003).

Espécies de bactérias produtoras de toxinas podem estimular a produção de mediadores inflamatórios locais, potencializar a proliferação bacteriana de várias outras espécies, além de reduzir a efetividade da terapia antimicrobiana (COHEN et al., 2016; RUDKIN et al., 2017).

A falta de cuidado com infecções de feridas em cães e mesmo o mau uso de antimicrobianos representam uma ameaça potencial para saúde humana, uma vez que estudos já comprovaram a possível transmissão de bactérias de animais de companhia para humanos, incluindo aquelas patogênicas e com resistência a antimicrobianos (TIWARI et al., 2013; VINCZE et al., 2014). Mesmo os microrganismos comensais e aqueles pertencentes à microbiota normal da pele podem ser reservatórios de genes codificadores de toxinas e enzimas responsáveis pela resistência destes microrganismos a antimicrobianos (SALYERS; GUPTA; WANG, 2004).

A distinção entre microrganismos comensais e patogênicos depende diretamente da capacidade da pele do hospedeiro de resistir à infecção (COGEN; NIZET; GALLO, 2008). Desta forma, a identificação de gêneros e espécies bacterianas que podem estar associados aos diferentes tipos de ferida é imprescindível para a escolha do tratamento apropriado, evitando-se a evolução para o quadro infeccioso. Em cães, há poucos estudos sobre os possíveis agentes colonizadores de feridas cutâneas agudas e crônicas, tampouco estudos moleculares envolvendo a avaliação da diversidade genética de microrganismos presentes nessas feridas. Assim, este trabalho objetivou isolar bactérias residentes em feridas cutâneas agudas e crônicas de cães, identificar os isolados por sequenciamento de DNA, avaliar a presença de genes codificadores de toxinas, quando possível, e a presença de isolados resistentes aos antimicrobianos mais utilizados na rotina clínica veterinária.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Feridas cutâneas

Feridas são rupturas da estrutura e função anatômica normal da pele e resultam de processos patológicos. A quebra da integridade da pele pode resultar em feridas classificadas de diversas maneiras. De acordo com o tempo de cicatrização, as feridas cutâneas podem ser classificadas em agudas ou crônicas (KORTING; SCHÖLLMANN; WHITE, 2011).

Feridas agudas referem-se àquelas com instalação rápida da lesão e curso relativamente rápido de reparação, cujas fases de cicatrização ocorrem em menos de quatro semanas (TALLMAN et al., 1997; DAVIDSON, 1998; KORTING; SCHÖLLMANN; WHITE, 2011). Tais feridas podem ser superficiais, envolvendo tanto a epiderme como a camada superficial da derme, ou até a espessura total da pele, onde a camada subcutânea é comprometida. Lesões deste tipo são, geralmente, ocasionadas por incisões cirúrgicas, queimaduras, abrasões ou lacerações (KORTING; SCHÖLLMANN; WHITE, 2011).

O processo de cicatrização inclui uma fase inflamatória, que envolve neutrófilos, macrófagos e migração de linfócitos para a região da lesão, o que produz inflamação local que dura cerca de duas semanas (LI; CHEN; KIRSNER, 2007). O reparo da lesão é regulado por citocinas e fatores de crescimento liberados próximos ao leito da ferida (GREAVES et al., 2013). Nessa fase, durante as primeiras 48 a 72 horas, o risco de infecção é maior (McGUCKIN et al., 2003). Após a fase inflamatória, ocorre a fase proliferativa que é caracterizada pela granulação, formação do tecido epitelial (re-epitelização) e restauração da rede vascular. Os queratinócitos estão envolvidos na reparação da barreira epidérmica enquanto que os fibroblastos e as células endoteliais são responsáveis pela angiogênese e produção da matriz extracelular. A fase final, de remodelação, envolve reorganização e contração da matriz recém-formada, podendo durar por vários anos (MENKE et al., 2007; WILGUS, 2012).

Desta forma, o processo cicatricial envolve várias etapas e, a qualquer momento, pode ser interrompido, levando a uma possível complicação do quadro

inflamatório, seguido de infecção. Se esta condição persistir por meses ou anos, a ferida passa a ser classificada como crônica (TALLMAN et al., 1997). As feridas cutâneas crônicas estão relacionadas à problemas de cicatrização de todas as camadas da pele, mesmo com o uso de terapia antimicrobiana adequada e curativos (SWAIM; HENDERSON; PIDGEON, 1990). Podem ocorrer em qualquer parte do corpo e estão frequentemente associadas com infecções locais, corpos estranhos, neoplasias, imunossupressão ou doenças metabólicas como o Diabetes Mellitus ou o hipotireoidismo (LUCROY; EDWARDS; MADEWELL, 1999). A morbidade de feridas crônicas em humanos é alta, afetando em torno de 2,4 a 4,5 milhões de pessoas somente nos Estados Unidos (BROWNRIGG et al., 2013; RICHMOND; MADERAL; VIVAS, 2013), cujos tratamentos geram custos que vão além de 25 bilhões de dólares por ano (SEN et al., 2009).

2.2. Microbiota cutânea

A microbiota presente em qualquer local do corpo de um organismo saudável é conhecida como microbiota normal. A microbiota normal da pele é composta principalmente por bactérias, as quais são necessárias para a manutenção do equilíbrio do órgão, protegendo o hospedeiro, sendo responsável por modular a resposta imune inata e prevenir a colonização da pele por microrganismos potencialmente patogênicos (GRICE; SEGRE, 2011; WANKE et al., 2011; OH et al., 2014).

Um estudo com abordagem molecular da diversidade bacteriana da pele de humanos evidenciou que a microbiota é dependente do local do corpo em que ela reside. Os autores demonstraram que a colonização bacteriana depende da fisiologia local da pele. Bactérias específicas estão associadas às condições ambientais de cada local do corpo, como ambientes úmidos, secos ou ricos em glândulas sebáceas (GRICE; SEGRE, 2011).

De forma similar, em animais, a composição da microbiota normal da pele pode variar de acordo com a sua espécie, alimentação e condições de alojamento em que vive, incluindo a densidade populacional (SORUM; SUNDE, 2001). Cada região do corpo difere entre si e cria um ambiente seletivo de gêneros bacterianos

(GRICE; SEGRE, 2011). Os órgãos dos mamíferos que contêm a maior diversidade e mais complexa microbiota bacteriana são a pele e o sistema digestório. Em comparação, existe maior número de bactérias gram-positivas na pele do que na microbiota intestinal de animais (SORUM; SUNDE, 2001).

A microbiota é, sobretudo, rica e abundante em partes quentes e úmidas da pele de humanos. A maioria dos microrganismos é encontrada nas camadas mais superficiais da epiderme e nas porções superiores dos folículos pilosos (GRICE; SEGRE, 2011). Aqueles microrganismos encontrados na superfície da pele que estão muito raramente associados a doenças são tipicamente referidos como comensais (SORUM; SUNDE, 2001; COGEN; NIZET; GALLO, 2008). Em humanos, estudo com sequenciamento metagenômico da região 16S rDNA, revelou que a maioria das bactérias da pele fazem parte de quatro diferentes filos: Actinobacteria, Firmicutes, Bacteroidetes e Proteobacteria. Além disso, os pesquisadores concluíram que a pele possui baixa diversidade em nível de filo, mas alta diversidade em espécies (GAO et al., 2007). Já as espécies bacterianas mais frequentemente encontrados na pele de humanos são *Staphylococcus epidermidis*, *S. aureus*, *S. warneri*, *Streptococcus pyogenes*, *S. mitis*, *Propionibacterium acnes*, *Corynebacterium* spp., *Acinetobacter johnsonii* e *Pseudomonas aeruginosa*, as quais foram classificadas como ocasionalmente patogênicos, com exceção das espécies *S. aureus* e *S. pyogenes*, que foram consideradas usualmente patogênicas (DEKIO et al., 2005; GAO et al., 2007).

Em relação à microbiota da pele de cães, estudo metagenômico com cães saudáveis e alérgicos revelou uma alta variabilidade bacteriana individual entre amostras coletadas de diferentes pacientes e partes do corpo (HOFFMANN et al., 2014). Maior riqueza de espécies e diversidade microbiana foi observada em locais com quantidade maior de pelo, quando comparada com superfícies mucosas ou junções mucocutâneas, como as narinas e a conjuntiva. Nas diferentes regiões da pele e superfícies mucosas, o filo mais abundantemente encontrado foi Proteobacteria, seguido de Firmicutes, Actinobacteria, Bacteroidetes e Cyanobacteria. Já a família *Oxalobacteriaceae* (Filo Proteobacteria; Classe Betaproteobacteria; Ordem Burkholderiales) foi a mais abundante na maioria das amostras, cujo gênero *Ralstonia* spp. foi o mais encontrado. A comissura labial

mostrou ser predominantemente colonizada por bactérias da família *Porphyromonadaceae* e gênero *Porphyromonas* spp. Outros gêneros que foram comumente encontrados na maioria das amostras de pele e junções mucocutâneas foram *Bacillus* spp., *Corynebacterium* spp., *Micrococcus* spp. e *Pseudomonas* spp. A pele de cães alérgicos apresentou menor riqueza de espécies quando comparada à de cães saudáveis (HOFFMANN et al., 2014). Tal achado corrobora àqueles obtidos em estudos com humanos que sugeriram que a interrupção da exposição microbiana da pele pode resultar em doença alérgica (NOVERR; HUFFNAGLE, 2005).

Desta forma, é conhecido que a pele dos mamíferos, como o cão, possui uma rica microbiota composta por microrganismos com diferentes graus de relações simbióticas entre si. Podendo existir relações simbióticas em que apenas um organismo se beneficia enquanto o outro é prejudicado, como é o caso do parasitismo, da predação, do amensalismo e da competição. Já a relação de comensalismo é caracterizada quando um organismo se beneficia e nenhum dano ocorre ao outro e quando há mutualismo ambos são beneficiados (COGEN; NIZET; GALLO, 2008). Por exemplo, *Staphylococcus epidermidis* possui um importante papel protetivo na pele por influenciar a resposta imune inata de queratinócitos através da sinalização dos receptores *toll-like* (TLR), que reconhecem padrões moleculares associados aos patógenos. No entanto, o fator mais importante é reconhecer que a distinção entre o que é considerado como pertencente à flora inofensiva ou como agente patogênico, geralmente, reside na capacidade da pele de resistir à infecção e não nas propriedades inerentes ao microrganismo (COGEN; NIZET; GALLO, 2008).

2.3. Infecções bacterianas associadas às feridas cutâneas

Quando a resposta imune do hospedeiro é insuficiente, microrganismos comensais e/ou potencialmente patogênicos presentes nas feridas se replicam e provocam uma série de respostas locais e sistêmicas que conduzem a um retardo na cicatrização (HEGGERS, 1998; BOWLER; DUERDEN; ARMSTRONG, 2001; SIBBALD et al., 2003). Além de estar relacionada com a resposta imune do

hospedeiro, a variedade de agentes microbianos envolvidos na etiologia da infecção da ferida é influenciada pela sua localização no corpo, pela profundidade dos tecidos afetados e pela qualidade e intensidade da perfusão tecidual (ROBSON, 1997; ERON, 1999). Adicionalmente, embora muitas vezes seja necessário o emprego de antimicrobianos, estes, podem remover microrganismos comensais importantes, como é o caso do *S. epidermidis*, permitindo que organismos potencialmente patogênicos colonizem a ferida mais efetivamente (COGEN; NIZET; GALLO, 2008).

A diversidade de espécies bacterianas associada às feridas em cães também está relacionada com o tipo de injúria tecidual. Infecções em feridas cirúrgicas, assim como aquelas de origem traumática, possuem etiologia polimicrobiana, envolvendo microrganismos anaeróbios e aeróbios (WINDAHL et al., 2015), provenientes principalmente de mucosas, da cavidade oral e do intestino (ROBSON, 1997; BROOK; FRAZIER, 1998). Já feridas ocasionadas por mordedura de cães, apesar de também terem etiologia polimicrobiana, geralmente são colonizadas por uma quantidade maior de microrganismos aeróbios (MOURO; VILELA; NIZA, 2010).

Os contaminantes presentes nas feridas podem ser originários de três fontes principais: (i) do meio ambiente, sendo estes microrganismos exógenos do ar ou aqueles introduzidos por lesão traumática, (ii) da pele circundante, ou seja, microrganismos que fazem parte da microbiota normal da pele, e (iii) de fontes endógenas, que incluem as mucosas, em especial a gastrointestinal, a orofaríngea e a geniturinária (DUERDEN, 1994; SCHULTZ et al., 2003).

Diversos estudos demonstraram grande diversidade de organismos colonizando o leito tanto de feridas agudas como de crônicas em humanos e cães (SORUM; SUNDE, 2001; MEYERS et al., 2008; MOURO; VILELA; NIZA, 2010; ANGEL et al., 2011; URUMOVA et al., 2012). Um estudo envolvendo cultura bacteriana e análises moleculares mostrou que os tecidos profundos de feridas clinicamente não infectadas de humanos abrigava uma microbiota diversificada de organismos potencialmente patogênicos, com predominância de gêneros como *Pseudomonas* e *Staphylococcus*, presentes em mais de 70% das feridas estudadas, incluindo também espécies anaeróbicas, como *Peptostreptococcus* (DAVIES et al., 2001).

Patógenos aeróbios ou facultativos, como o *S. aureus*, *P. aeruginosa* e *Streptococcus* β -hemolítico são comumente isolados de feridas infectadas e não infectadas de cães (MEYERS et al., 2008). *Staphylococcus aureus* pode causar desde infecções cutâneas menores e auto-limitadas a doenças invasivas e que ameaçam a vida. As infecções cutâneas causadas por *S. aureus* incluem impetigo, foliculite, furúnculos e abscessos subcutâneos, além da síndrome da pele escaldada estafilocócica em caso de estirpes produtoras de toxinas esfoliativas. Além disso, esta bactéria pode causar sérias infecções invasivas como artrite séptica, osteomielite, pneumonia, meningite, septicemia e endocardite (LOWY, 1998; IWATSUKI et al., 2006).

Bastonetes aeróbios gram-negativos, tais como *Pseudomonas* spp., fazem parte de um dos grupos de organismos encontrados mais tardiamente no leito das feridas. Eles tendem a não invadir os tecidos mais profundos, porém, podem causar significativa deterioração local devido à produção de enzimas antifagocíticas, lesivas aos tecidos, além de exo e endotoxinas (KINGSLEY, 2003; SCHULTZ et al., 2003). Por sua vez, *Streptococcus* β -hemolítico está associado a infecções cutâneas mais profundas, como celulite e erisipela, infecções do tecido conjuntivo e tecido adiposo subjacente (COGEN; NIZET; GALLO, 2008).

Um estudo microbiológico de feridas infectadas de cães apontou a diversidade de espécies bacterianas que podem ser encontradas. Foram identificadas espécies como *S. intermedius*, *Streptococcus* β -hemolítico, actinobactérias, enterobactérias, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Proteus mirabilis*, *Citrobacter* spp., *Pasteurella multocida*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Prevotella melaninogenica*, sendo a espécie *S. intermedius* a que apresentou maior prevalência (URUMOVA et al., 2012). Já em outro estudo, identificou-se a presença de microrganismos tais como *Staphylococcus* coagulase negativo, *S. intermedius*, *Streptococcus* spp., *S. canis*, *Streptococcus* piogênico, *Bacillus* spp., *Actinomyces* spp., *Corynebacterium* spp., *Pasteurella multocida*, *Pasteurella canis*, enterobactérias e da família *Vibrionaceae*, entre outros, em 50 cães acometidos por feridas secundárias à mordedura (MEYERS et al., 2008).

2.4. Espécies bacterianas produtoras de enterotoxinas

A secreção de toxinas tem como papel principal danificar o tecido hospedeiro e é parte integrante dos processos infecciosos de muitos agentes patogênicos bacterianos (PINCHUK; BESWICK; REYES, 2010; RUDKIN et al., 2017). Algumas vezes a secreção de toxinas não beneficia diretamente a bactéria, possuindo papel de evasão imunológica (FOSTER, 2005; RUDKIN et al., 2017). Como exemplo, podemos citar os superantígenos, que são uma classe de toxinas produzidas por vários gêneros bacterianos tais como *Streptococcus* e *Staphylococcus*, e atuam no processo imune, que resulta na liberação sistêmica maciça de citocinas pró-inflamatórias, o que pode levar à febre, choque e morte do paciente (RUDKIN et al., 2017).

Toxinas bacterianas têm efeito direto na necrose tecidual e estimulam a produção de mediadores inflamatórios locais, como citocinas e proteases, que são conhecidos por prejudicar significativamente o processo cicatricial. Bactérias que produzem toxinas são mais virulentas do que aquelas que não as produzem ou que produzem toxinas menos potentes (OVINGTON, 2003). Nesse contexto, as feridas crônicas são colonizadas, na maioria das vezes, por estirpes bacterianas mais virulentas além de apresentarem microbiota mais diversificada em relação àquelas que apresentaram menor tempo de cicatrização (WALL et al., 2002; BOWLER, 2003; SCHULTZ et al., 2003). Tais relatos são coincidentes com os resultados de um experimento no qual, pulmões de ratos foram infectados com variedades de espécies bacterianas de forma individual e em co-infecção com *S. aureus*. Os pesquisadores descobriram que a α -toxina, produzida por *S. aureus*, potencializa a proliferação de bactérias gram-negativas, sua disseminação sistêmica e a letalidade aos animais por evitar a acidificação das bactérias que possuem fagossomas nos macrófagos, reduzindo efetivamente a morte tanto de bactérias gram-negativas quanto da própria espécie, *S. aureus* (COHEN et al., 2016).

Staphylococcus aureus é um anaeróbio facultativo que pode secretar várias enzimas, tais como citotoxinas, exotoxinas, como as enterotoxinas, e toxinas esfoliativas. Tal característica faz desta bactéria um patógeno versátil capaz de causar diferentes tipos de doenças (MORANDI et al., 2009; PINCHUK; BESWICK;

REYES, 2010). As enterotoxinas estafilocócicas são membros de uma família de mais de vinte diferentes exotoxinas estafilocócicas e estreptocócicas que estão funcionalmente relacionadas e são codificadas por genes que possuem sequências de DNA homólogas. Estas proteínas bacterianas são conhecidas por serem pirogênicas e estão relacionadas à significativas doenças em humanos que incluem intoxicação alimentar e síndrome do choque tóxico (PINCHUK; BESWICK; REYES, 2010). Algumas das enterotoxinas estafilocócicas de grande importância que podem atuar como superantígenos são *sea*, *seb*, *sec*, *sed*, *see*, *seg*, *seh*, *sei*, *sej*, leucocidina de Pantón-Valentine (*pvl*), toxina da síndrome do choque tóxico 1 (*tsst-1*), toxina esfoliativa (*eta* e *etb*) (PANIAGUA-CONTRERAS et al., 2012) e quatro hemolisinas (alfa-, beta-, gamma-, e delta-hemolisina) (NILSSON et al., 1999).

Bacillus cereus também é outra espécie bacteriana comumente isolada de feridas pós-traumáticas e pós-cirúrgicas, sendo o cateter intravenoso o grande responsável pela contaminação causada por espécies deste gênero em humanos (ÅKESSON; HEDSTRÖUM; RIPA, 1991; GURLER et al., 2012). Os esporos de *Bacillus* são encontrados em abundância no solo, água doce, no ambiente hospitalar e na flora gastrointestinal normal de pacientes hospitalizados por período prolongado (GURLER et al., 2012). É considerada uma bactéria que ocorre de forma ubíqua na natureza, cujas estirpes podem funcionar tanto como probióticos ou como patógenos, produzindo endosporos resistentes ao calor e capaz de formar biofilmes (WIJMAN et al., 2007; STENFORS ARNESEN; FAGERLUND; GRANUM, 2008; NAM et al., 2014).

O principal efeito lesivo relacionado à *Bacillus* é sua capacidade de produzir toxinas (JEßBERGER et al., 2015). Infecções por *Bacillus* estão associadas a casos de gastroenterites agudas em intoxicações alimentares, as quais são, na maioria das vezes, autolimitantes e benignas (DROBNIEWSKI, 1993; BOTTONE, 2010). Entretanto, esta espécie bacteriana pode causar infecções sistêmicas fatais em neonatos, pacientes imunossuprimidos e usuários de drogas intravenosas (BOTTONE, 2010; GURLER et al., 2012), além de doenças severas como meningite, endocardite e osteomielite (GURLER et al., 2012; TATARA et al., 2013).

O grupo *Bacillus cereus sensu lato* compreende oito espécies de bactérias intimamente relacionadas, tais como *B. cereus*, *B. anthracis*, *B. thuringiensis*, *B.*

weihenstephanensis, *B. mycoides*, *B. pseudomycoides*, *B. cytotoxicus* e *B. toyonensis*, as quais compreendem estirpes altamente tóxicas e não tóxicas (GUINEBRETIERE et al., 2008). As principais toxinas produzidas por *Bacillus* são: a enterotoxina não hemolítica (*nhe*) (LUND; GRANUM, 1996), a hemolisina BL (*hbl*) (BEECHER; MACMILLAN, 1991), a citotoxina K (*cytK*) (LUND; DE BUYSER; GRANUM, 2000), e as enterotoxinas FM (*entFM*) (ASANO et al., 1997) e T (*bceT*) (AGATA et al., 1995). *Nhe* e *hbl*, são subdivididas nos tipos *nheA*, *nheB* e *nheC*, e *l2*, *l1* e *b*, respectivamente (STENFORS ARNESEN; FAGERLUND; GRANUM, 2008). Acreditava-se que somente as enterotoxinas *nhe*, *hbl* e *cytK* estavam envolvidas com a intoxicação alimentar (GRANUM, 2001), mas, atualmente, foi relatado que as enterotoxinas *entFM* e *bceT* também são indutoras da doença diarreica e contribuem para o agravamento do quadro infeccioso (WALKER-YORK-MOORE; MOORE; FOX, 2017).

Uma outra espécie bacteriana produtora de enterotoxinas de grande importância é a *Escherichia coli*. A estirpe enterohemorrágica é a principal causa de surtos de diarreia, síndrome hemolítica-urêmica e colite hemorrágica em humanos em animais no mundo todo (KWON; CHO, 2015). Estirpes com sorotipo O157:H7 são mundialmente zoonóticas e são as maiores causadoras de infecções alimentares, sendo encontradas em cães e outros animais como o gado (HEUVELINK et al., 2002; JAY-RUSSELL et al., 2014). A shiga toxina (*stx*), uma potente citotoxina que esta estirpe produz, é o principal fator de virulência ligado aos casos de síndrome hemolítica-urêmica e colite hemorrágica (MOHAWK; O'BRIEN, 2011). Outro fator de virulência atribuído ao patógeno inclui a produção de uma enterohemolisina codificada pelo gene *eaeA* (McDANIEL; KAPER, 1997). Estirpes portadoras do gene *eaeA* e *stx* são capazes de ocasionar doenças humanas graves, especialmente síndrome hemolítica-urêmica (OSWALD et al., 2000).

2.5. Resistência bacteriana a antimicrobianos

Além do potencial patogênico relacionado à produção de toxinas, as bactérias podem apresentar resistência a antimicrobianos (SCHMITZ et al., 1997). O rápido aumento de estirpes bacterianas resistentes está ocorrendo em todo o mundo,

colocando em risco a eficácia de antibióticos e a vida de milhares de pessoas e animais (CDC NNIS System, 2004; WEESE, 2008; VENTOLA, 2015). A crise de resistência aos antimicrobianos tem sido atribuída tanto ao mau uso desses medicamentos quanto ao seu uso excessivo, assim como à falta de desenvolvimento de novas drogas pela indústria farmacêutica devido a redução no incentivo econômico e ao desafio dos requerimentos regulatórios de novas drogas (GOULD; BAL, 2013; SPELLBERG; GILBERT, 2014; VENTOLA, 2015).

A resistência antimicrobiana limita as opções de tratamento e aumenta o risco de falha terapêutica. Além disso, a ocorrência de bactérias resistentes a antimicrobianos em cães representa uma ameaça potencial para a saúde humana (VINCZE et al., 2014). Evidências sugerem que o contato direto entre animais de companhia e seres humanos pode levar à transmissão de bactérias patogênicas dos animais para os humanos, incluindo aquelas com resistência antimicrobiana (GUARDABASSI; SCHWARZ; LLOYD, 2004; LLOYD, 2007; VINCZE et al., 2014). Em cães, infecções bacterianas, tais como gastroenterites, otites, piodermites, infecções respiratórias e do trato urinário (UTIs), e de feridas, são comumente tratadas com agentes antimicrobianos (PEDERSEN et al., 2007; WAYNE; MCCARTHY; LINDENMAYER, 2011; BOOTHE et al., 2012).

A resistência a antimicrobianos pode ocorrer devido a propriedades intrínsecas, que são características fenotípicas naturais, ou pela aquisição de genes de resistência através de plasmídeos e transposons, ou, ainda, pela mutação genética (HEALTH AND CONSUMER PROTECTION DIRECTORATE-GENERAL OF THE EUROPEAN COMMISSION, 2002; EUROPEAN FOOD SAFETY AUTHORITY, 2012). Tais propriedades, intrínsecas ou adquiridas, podem tornar a bactéria capaz de inativar rapidamente antibióticos específicos pela degradação e expulsão da molécula antimicrobiana para fora da célula através do sistema de efluxo ou da alteração do sítio alvo do antibiótico (EUROPEAN FOOD SAFETY AUTHORITY, 2012; BUTAYE; DEVRIESE; HAESBROUCK, 2003; HEALTH AND CONSUMER PROTECTION DIRECTORATE-GENERAL OF THE EUROPEAN COMMISSION, 2002).

As espécies *S. aureus* e *S. pseudintermedius* frequentemente apresentam resistência aos antimicrobianos comumente usados na rotina clínica. Desde a

emergência de estirpes produtoras de penicilinases ou β -lactamases na década de 40, estafilococos, enterococos e estreptococos provaram sua capacidade em desenvolver ou adquirir mecanismos que conferem resistência a todas as classes antimicrobianas clinicamente disponíveis (WOODFORD, 2005). Tem havido um aumento dramático no número de cepas resistentes a antibióticos, incluindo *S. aureus* resistente à meticilina (MRSA) em ambientes hospitalares e comunitários, e até mesmo relatos de estirpes de *S. aureus* resistentes à vancomicina (VRSA) (HIRAMATSU, 2001; FOSTER, 2005). A emergência da resistência à meticilina é devido à aquisição de um elemento gênico transferível, carreador do gene *mecA*, que codifica a proteína PBP2a que se liga à meticilina (FOSTER, 2004).

Cefalosporinas de primeira geração, amoxicilina + ácido clavulânico, clindamicina, sulfametoxazol + trimetoprima e enrofloxacina são rotineiramente utilizados na prática de pequenos animais para tratamento de infecções estafilocócicas (MAY, 2006). Consequentemente, a crescente resistência a estes fármacos, particularmente entre MRSA, aumenta a probabilidade de falha no tratamento e representa um risco para a saúde pública (RUBIN; BALL; CHIRINOTREJO, 2011; VINCZE et al., 2014). Além disso, a maioria do MRSA são estirpes produtoras de toxinas (*tsst-1*, *sea*, *seb*, *sed*) (SCHMITZ et al., 1997). Assim, este patógeno multirresistente a drogas é uma das principais preocupações dos hospitais ao redor do mundo (PINCHUK; BESWICK; REYES, 2010).

Bactérias do gênero *Bacillus* spp. também são comprovadamente resistentes a diversos tipos de antimicrobianos, como cloranfenicol, tetraciclina, eritromicina, lincomicina, penicilina e estreptomina (CIFFO, 1984; MAZZA; ZANI; MARTELLI, 1992; GREEN et al., 1999; HOA et al., 2000). Devido à sua capacidade de estimular o sistema imunológico e proteger o hospedeiro contra microrganismos patogênicos (D'ARIENZO et al., 2006; HUANG et al., 2008), o gênero *Bacillus* tem sido amplamente utilizado em aplicações biotecnológicas, como probióticos para seres humanos e inoculados na alimentação de animais. Existe, entretanto, uma crescente preocupação em saúde pública sobre a possibilidade desses microrganismos comensais agirem como reservatórios de genes de resistência a antibióticos e serem capazes de transferir tais genes para células do hospedeiro (WITTE, 2000; SALYERS; GUPTA; WANG, 2004). Mazza, Zani e Martelli (1992)

observaram que *B. subtilis* presentes no probiótico comercial Enterogermina, posteriormente reclassificado como *B. clausii* por Senesi et al. (2001), era resistente aos antimicrobianos cloranfenicol, tetraciclina, rifampicina e estreptomicina. Já outro estudo sobre a susceptibilidade a antimicrobianos de *Bacillus* spp. isolados de frangos de corte, mostrou que duas das cepas isoladas, *B. licheniformis* e *B. clausii*, eram resistentes à eritromicina e à lincomicina (BARBOSA et al., 2005).

A espécie *Escherichia coli* é um organismo sentinela útil para monitorar a susceptibilidade antimicrobiana em cães e outras espécies (De GRAEF et al., 2004; BOOTHE et al., 2012). Algumas estirpes são comensais do trato intestinal de mamíferos, outras são potencialmente patogênicas e comumente isoladas na rotina clínica de animais de companhia (BEUTIN, 1999; THOMPSON et al., 2011), sendo causa mais comum de infecção do trato urinário em cães (BALL et al., 2008). Os mecanismos mais reconhecidos de resistência antimicrobiana foram detectados nessa espécie, sendo considerado um organismo que prontamente adquire resistência frente à pressão da seleção local (AARESTRUP, 2005; ERB et al., 2007). Assim, *E. coli* é uma fonte chave de genes de resistência antimicrobiana, podendo conferir resistência a outros agentes bacterianos patogênicos através de mecanismos de transferência horizontal (WEESE, 2008). O tratamento contra esse microrganismo inclui o uso de antimicrobianos, dentre os quais os β -lactâmicos são os mais comumente usados em Medicina Veterinária (PRESCOTT et al., 2002). Esta diversificada classe antimicrobiana inclui as penicilinas, as cefalosporinas, as cefamicinas, os carbapenem e as monobactamas (CATEGORIZATION OF ANTIMICROBIAL DRUGS BASED ON IMPORTANCE IN HUMAN MEDICINE, 2009).

O aumento da resistência aos β -lactâmicos é preocupante. Em *E. coli*, a resistência aos β -lactâmicos mais frequentemente resulta da produção de enzimas degradativas, as β -lactamases (LIVERMORE; WOODFORD, 2006). β -lactamases de amplo espectro, incluindo as β -lactamases de espectro estendido (ESBL) e as enzimas do tipo AmpC (como CMY-2) são especialmente importantes devido à sua capacidade de degradar penicilinas (como ampicilina ou amoxicilina), cefalosporinas de primeira geração, cefalosporinas mais recentes como cefotaxime, ceftazidima, cefoxitina e ceftiofur, e aztreonam (LIVERMORE, 1995; PODSCHUN; ULLMANN,

1998; DESHPANDE; PFALLER; JONES, 2000; PATERSON et al., 2003; RUBIN; PITOUT, 2014). Desde meados dos anos 2000, a emergência dessas enzimas entre isolados presentes em humanos no Canadá tem sido dramática. Entre 2007 e 2011, a frequência de *E. coli* produtoras de ESBL entre humanos aumentou significativamente de 3,4% para 7,1%, sendo o CTX-M o tipo de enzima dominante (DENISUIK et al., 2013).

Outro gênero reconhecidamente produtor de ESBL muito encontrado em humanos é *Klebsiella* spp., sendo considerado, ainda, resistente a diversas outras drogas (LIVERMORE, 1995; PODSCHUN; ULLMANN, 1998; DESHPANDE; PFALLER; JONES, 2000; PATERSON et al., 2003). Resistência de *Klebsiella* spp. a tetraciclina, sulfametoxazol + trimetoprim, quinolonas e aminoglicosídeos são cada vez mais observadas em infecções nosocomiais de humanos (BRISSE et al., 2000; PATERSON et al., 2000; STOCK; WIEDEMANN, 2001; BOUZA; CERCENADO, 2002). Brisse e van Duijkeren (2005) testaram a susceptibilidade de 100 isolados de *Klebsiella* a nove antimicrobianos ou combinações deles, em diversas espécies de animais, e observaram que todos os isolados, exceto um, obtido de bovino com mastite, foram resistentes à ampicilina, 43% dos isolados foram resistentes à cefalexina, 11% à tetraciclina, 7% à sulfametoxazol + trimetoprima, 7% à amoxicilina + ácido clavulânico, 5% à enrofloxacina, 4% à gentamicina, 2% à ceftazidime e 2% à ceftiofur.

Em animais, assim como em humanos, ESBLs conferem altos níveis de resistência aos antibióticos β -lactâmicos de última geração, como ceftiofur e cefquinoma, que são cefalosporinas amplamente utilizadas em animais de produção, contra bactérias da família Enterobacteriaceae. Do mesmo modo que aconteceu na medicina humana, esta situação é especialmente devida ao sucesso epidemiológico de certos genes ESBL, em particular o gene *bla*CTX-M. Embora tais genes possam se espalhar através de clones de estirpes que os possui, dados recentes sugerem fortemente que os plasmídeos desempenham um papel fundamental na transferência horizontal desses genes (DAHMEN; HAENNI; MADEC, 2012; MADEC et al., 2012).

2.6. Diagnóstico molecular

A identificação rápida e precisa de isolados bacterianos é tarefa fundamental em microbiologia clínica, e fornece conhecimento sobre etiologias de doenças infecciosas e terapia apropriada (WOO et al., 2008). O emprego da PCR espécie-específica como única ferramenta para a identificação de microrganismos pode não ser completamente confiável. Oligonucleotídeos específicos para determinada espécie microbiana podem vir a amplificar banda de igual tamanho para outros microrganismos, resultando em falsos-positivos. Além disso, testar uma amostra com diversos oligonucleotídeos específicos pode tornar o trabalho oneroso e pouco prático. Desta forma, a identificação assertiva de gêneros e espécies de microrganismos é realizada por sequenciamento de DNA (SOUZA-POLLO et al., 2016). Quando não se tem pistas da identificação de um isolado bacteriano, o sequenciamento da região 16S rDNA é uma boa abordagem para a identificação confiável de gêneros. Trata-se de região ribossomal conservada, presente em todos os procaríotos, que agrega mutações resultantes da evolução das espécies (NERCESSIAN et al., 2005; MIZRAHI-MAN; DAVENPORT; GILAD, 2013; SRINIVASAN et al., 2015). O sequenciamento desta região permite a identificação de bactérias ao nível de gênero com 96% de acurácia e, em caso de espécies, pode apresentar até 87% de confiabilidade (SRINIVASAN et al., 2015).

No entanto, seguir com o diagnóstico microbiológico resultará em perda significativa do conhecimento da diversidade bacteriana presente em uma determinada amostra (DAVIES et al., 2001; HILL et al., 2003; VARTOUKIAN; PALMER; WADE, 2010). A realização do cultivo bacteriano é necessária para o isolamento de colônias puras e subsequente realização de testes de sensibilidade a antimicrobianos (HEGGERS, 1998; BOWLER; DUERDEN; ARMSTRONG, 2001), Estudo comparativo entre técnicas microbiológicas e moleculares para pesquisa de espécies bacterianas em feridas de humanos mostrou resultados diferentes e conflitantes entre elas (RHOADS et al., 2012). De fato, os métodos moleculares produzem resultados mais confiáveis do que a identificação presuntiva de um microrganismo por análise morfológica das células ou mesmo por testes bioquímicos. Desta forma, na atualidade, as ferramentas moleculares são

indispensáveis em estudos envolvendo diversidade microbiana e complementam os resultados obtidos por outras técnicas (LAVIGNE et al., 2015).

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Locais de coleta e processamento das amostras e ética no uso de animais

As coletas das amostras foram realizadas no setor de Cirurgia do Hospital Veterinário “Governador Laudo Natel” da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias (FCAV), da Universidade Estadual Paulista ‘Júlio de Mesquita Filho’, UNESP, Câmpus de Jaboticabal. Já os procedimentos de microbiologia e biologia molecular foram realizados no Laboratório de Epidemiologia Molecular, do Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Reprodução Animal também localizado na FCAV.

A pesquisa foi realizada após aprovação pela CEUA - Comissão de Ética no Uso de Animais, sob protocolo de número 013690/17 da FCAV, e sob a concessão dos tutores dos pacientes.

3.2. Amostragem

Foram amostradas 20 feridas cutâneas, sendo uma de cada cão, de raças variadas, machos ou fêmeas, atendidos junto ao Setor de Clínica Cirúrgica do Hospital Veterinário “Governador Laudo Natel”. Tais feridas apresentavam-se com ou sem presença de secreções, sangue ou sujidades e estavam localizadas em diferentes regiões do corpo do paciente. As feridas foram classificadas como agudas e crônicas, de acordo com o tempo decorrido de cicatrização após a injúria tecidual, sendo consideradas como agudas as feridas com menos de quatro semanas de evolução e crônicas aquelas com tempo de cicatrização superior a este período, segundo propõe a literatura (TALLMAN et al., 1997; DAVIDSON, 1998; KORTING; SCHÖLLMANN; WHITE, 2011).

Previamente à coleta, foi realizada antissepsia ao redor da lesão com álcool etílico 70% (v/v) e solução salina 0,9% (v/v). A amostragem das feridas foi realizada

com o auxílio de suabe estéril de acordo com o método Levine (ANGEL et al., 2011) ou com micropipeta estéril de 10 µL em caso de presença de secreção. Os suabes e/ou alíquotas de secreções foram depositados em tubos de ensaio contendo 5,0 mL de caldo BHI estéril (Brain Heart Infusion Broth, Oxoid, Waltham, USA). Os tubos foram transportados em isopor com gelo para o Laboratório de Epidemiologia Molecular, onde a multiplicação bacteriana ocorreu em estufa bacteriológica em aerobiose a 37°C por 24 horas.

3.3. Obtenção dos isolados

As amostras que apresentaram multiplicação bacteriana foram submetidas à diluição seriada para isolamento de colônias puras. Para tal, 0,1 mL de cada amostra foi transferido para tubos de ensaio contendo 1,9 mL de caldo BHI estéril (diluição 10^{-1}), utilizado para as demais diluições, até a diluição 10^{-7} . De cada uma das diluições, 10^{-6} e 10^{-7} , foram transferidas alíquotas de 100 µL para placas de Petri contendo Ágar BHI (Oxoid, Waltham, USA), as quais foram espalhadas de forma homogênea com o auxílio de alças de Drigalski estéreis. As placas foram então incubadas a 37°C por 24 horas. Após o aparecimento de colônias individuais nas placas, foram selecionadas dez colônias por placa de cada amostra das feridas para posterior identificação dos gêneros bacterianos. Todos os isolados foram armazenados em freezer -80°C em glicerol 20% (v/v).

3.4. Extração de DNA dos isolados

A extração de DNA dos isolados bacterianos foi baseada no protocolo proposto por Bag et al. (2016). Para tanto, alíquotas de 1,0 mL do cultivo bacteriano de cada isolado foram centrifugadas a 10000 x g por 3 minutos para obtenção de um *pellet* de células. O meio de cultura foi descartado e o *pellet* bacteriano foi ressuscitado em 450 µL de tampão de extração [Tris-HCl 160 mM pH 8,0; EDTA 50 mM pH 8,0; NaCl 20 mM e SDS 0,5% (p/v)]. A lise celular ocorreu em banho seco Thermomixer (Eppendorf, Hamburgo, Alemanha) a 65°C por 30 minutos. Posteriormente, foram acrescentados à solução 180 µL de acetato de potássio 5 M a

qual, após homogeneização, foi mantida no gelo por 15 minutos. A purificação foi realizada com 400 μL de clorofórmio: álcool isoamílico 24:1 (v/v) sob centrifugação a 12000 x g por 10 minutos. O sobrenadante foi transferido para tubos novos aos quais foram acrescentados 1000 μL de álcool etílico absoluto gelado. A solução foi misturada e mantida em freezer a -20°C por 12 horas para precipitação do DNA. Posteriormente, realizou-se a centrifugação dos tubos a 12.000 x g por 18 minutos para obtenção do *pellet* de DNA, o qual foi lavado com 1000 μL de álcool etílico 70% (v/v), seco em estufa e ressuscitado em 30 μL de tampão TE 10:1 (Tris-HCl 10 mM pH 8,0; EDTA 1 mM pH 8,0). As amostras de DNA foram quantificadas em espectrofotômetro NanoDropOne (Thermo Scientific, Waltham, EUA).

3.5. Seleção dos isolados por RAPD

Para o sequenciamento da região 16S rRNA, os isolados representativos da coleção foram selecionados de acordo com o seu perfil genético, empregando-se a técnica de RAPD (*Random Amplified of Polymorphic DNA*). Para tanto, foram testados os seguintes oligonucleotídeos randômicos: OPP1 ao OPP20, OPA1 ao OPA12, OPA17, OPG1 ao OPG10, OPG15, OPG19, OPI4, OPI7, OPJ1 ao OPJ4, OPJ6, OPM2, OPM4, OPM7, OPM18, OPN1 ao OPN5, OPO2, OPO6 OPO15, OPQ1, OPQ2, OPQ4, OPQ7, OPQ18, OPR2, OPR8, OPR13, OPR14, OPR18 e OPR20 (*Operon Technologies*, California, EUA). O oligonucleotídeo selecionado foi aquele que resultou em amplificação de bandas definidas e polimórficas para os diferentes isolados obtidos, sendo este o OPP7 (5' GTCCATGCCA 3'). As reações de PCR foram compostas por tampão 1X (20mM Tris-HCl pH 8,4; 50mM KCl), 2,5 mM de MgCl_2 ; 0,2 mM de dNTP, 0,5 U de Taq DNA polimerase (Invitrogen, Waltham, EUA), 5 pmol do oligonucleotídeo, 60 ng de DNA e água pura estéril para 20 μL . A amplificação foi realizada em termociclador Nexus (Eppendorf, Hamburgo, Alemanha), programado para realizar um ciclo a 92°C por 3 minutos; 45 ciclos a 92°C por 60 segundos; 36°C por um minuto e 45 segundos e 72°C por um minuto e 45 segundos, e, para finalizar, um ciclo a 72°C por 10 minutos. As amostras foram submetidas à eletroforese em gel de agarose 1% (p/v), contendo brometo de etídio (0,5 $\mu\text{g}/\text{mL}$) e padrão de tamanho molecular 1kb DNA Ladder Plus (Invitrogen,

Waltham, EUA). Representantes de cada um dos perfis genéticos observados foram submetidos ao sequenciamento de DNA.

3.6. Sequenciamento da região 16S rRNA

A amplificação da região 16S rRNA foi realizada utilizando-se os oligonucleotídeos 8F (5' - AGAGTTTGATYMTGGCTCAG - 3') e 907R (5' - CCGTCAATTCMTTTRAGTTT - 3') (NERCESSIAN et al., 2005). As reações foram compostas por tampão 1X (20mM Tris-HCl pH 8,4; 50mM KCl), 2 mM de MgCl₂; 0,2 mM de dNTP, 0,5 U de Platinum® Taq DNA polimerase (Invitrogen, Waltham, EUA), 4 pmol de cada oligonucleotídeo, 60 ng de DNA e água pura estéril para 20 µL. A amplificação foi realizada em termociclador Nexus (Eppendorf, Hamburgo, Alemanha), programado para realizar um ciclo a 95°C por 3 minutos; 35 ciclos a 94°C por 30 segundos; 50°C por 30 segundos e 72°C por 40 segundos, e, para finalizar, um ciclo a 72°C por 10 minutos. As amostras foram submetidas à eletroforese em gel de agarose 1% (p/v), contendo brometo de etídio (0,5 µg/mL) e padrão de tamanho molecular 1kb DNA Ladder Plus (Invitrogen, Waltham, EUA) para confirmação da amplificação.

Os produtos de PCR obtidos foram então submetidos à PCR de sequenciamento, utilizando-se o kit do Big Dye Terminator v3.1 (Applied Biosystems, Waltham, EUA), seguindo-se as instruções do fabricante, e os mesmos oligonucleotídeos utilizados para obtenção dos produtos de PCR. O sequenciamento foi realizado em um sequenciador ABI3130 (Applied Biosystems, Waltham, USA).

Os eletroferogramas obtidos foram previamente preparados pelo software DNA Sequencing Analysis Versão 6.0 e, posteriormente, analisados pelo pacote de programas Phred/Phrap/Consed (GREEN, 1996; EWING; GREEN, 1998; GORDON; ABAJIAN; GREEN, 1998), para obtenção das sequências consenso e corte das extremidades, considerando apenas bases com qualidade phred maior que 20. As sequências de DNA qualificadas foram comparadas com as demais sequências depositadas no GenBank (www.ncbi.nlm.nih.gov/Genbank), empregando-se a ferramenta BLAST (ALTSCHUL et al., 1997).

As sequências de DNA do estudo e demais sequências obtidas do banco de dados foram alinhadas pela ferramenta MUSCLE (EDGAR, 2004). As árvores filogenéticas foram obtidas pelo software MrBayes 3.2.3 (RONQUIST; HUELSENBECK, 2003) utilizando-se o algoritmo Markov Chain Monte Carlo (MCMC), o modelo de substituição 6 e distribuição gamma, segundo o Critério de Informação de Akaike (AIC) obtido pelo software jModelTest v2.1.7 (DARRIBA, 2012). Foram realizadas quatro corridas independentes com 10.000.000 de gerações, sendo as cadeias amostradas a cada 200 gerações. Ao final das análises, obtendo-se desvio padrão inferior a 0,01%, 25% das árvores geradas inicialmente foram descartadas. O filograma gerado pelo MrBayes foi editado graficamente pelo software TreeGraph 2.3.0 (STÖVER; MÜLLER, 2010).

3.7. PCR espécie-específico para *Staphylococcus* spp. e *Bacillus* spp. e identificação de genes codificadores de toxinas em isolados de *Staphylococcus*, *Bacillus* e *E. coli*

Os isolados identificados como *Staphylococcus* pelo sequenciamento da região 16S rRNA foram submetidos a uma PCR multiplex para identificação das espécies *S. aureus*, *S. intermedius*, *S. schleiferi*, *S. delphini* grupo A e B, *S. pseudointermedius* e *S. hyicus* (SASAKI et al., 2010, Anexo 1). Aqueles isolados identificados como *S. aureus* foram então testados quanto à presença dos genes codificadores das enterotoxinas *sea*, *seb*, *sec*, *sed*, *see*, *seg*, *seh*, *sei*, *tst*, *eta*, *pvl* e *hlg* (PANIAGUA-CONTRERAS et al., 2012). Para tanto, na PCR foram utilizados DNAs de estirpes positivas para tais genes¹.

Já os isolados identificados como pertencentes ao gênero *Bacillus* foram testados com um par de oligonucleotídeos específicos para *B. cereus* (MANZANO et al., 2003, Anexo 1). Além disso, tais isolados foram testados quanto à presença dos genes codificadores das enterotoxinas *hblA*, *hblC*, *hblD*, *nheA*, *nheB*, *nheC*, *cytK*, *entFM* e *bceT* (THAENTHANE; WONG; PANBANGRED, 2005; NGAMWONGSATIT et al., 2008; MTENGA et al., 2012, Anexo 1). Os isolados

¹ Estirpes de *S. aureus* utilizadas como controle positivo: *S. aureus* (ATCC6538); *sea* e *sed* (ATCC23235); *seb* (ATCC14458); *sec*, *seh*, *sei* e *hlg* (ATCC19095); *see* (ATCC27664); *seg*, *tst* e *pvl* (ATCC25923); *eta* (TC-142).

identificados como *E. coli*, segundo o sequenciamento de DNA, foram testados quanto à presença dos genes de virulência *eaeA*, *stx1* e *stx2*² (CHINA; PIRSON; MAINIL, 1996, Anexo 1).

As PCRs para identificação de espécies bacterianas e genes codificadores de toxinas foram realizadas conforme protocolo descrito no item 3.6 para amplificação da região 16S rRNA.

3.8. PCR para identificação de genes codificadores de enzimas que conferem resistência a antimicrobianos

Os isolados confirmados como pertencentes à espécie *S. aureus* foram submetidos à PCR para identificação do gene *mecA*, responsável pela resistência à meticilina, utilizando-se os oligonucleotídeos *mecA1* (5'-AAAATC GAT GGT AAA GGT TGG C-3') e *mecA* (5'-AGT TCT GCA GTA CCG GAT TTG C-3') (MURAKAMI et al., 1991).

Para testar a presença de genes de resistência a antibióticos do grupo dos β -lactâmicos nos isolados identificados como pertencentes à família Enterobacteriaceae, foram utilizados oligonucleotídeos para identificação dos seguintes genes: *blaTEM1 e 2*, *blaSHV-0 e 1*, *blaOXA-1, 4 e 30*, *blaCTX-M Grupos 1, 2, 9 e 8/25* (DALLENNE et al., 2010, Anexo 2). Para a realização do teste, os isolados foram submetidos à extração de DNA pelo método de fervura, no qual a lise celular ocorre a 99°C, a fim de preservar o material genético dos plasmídeos, onde geralmente tais genes estão localizados.

Nesta etapa para identificação de genes de resistência a antimicrobianos, foi aplicado o mesmo protocolo de PCR mencionado no item 3.6 para amplificação da região 16S rRNA.

² Estirpe de *E. coli* utilizada como controle positivo: EcL 6611

3.9. Testes de sensibilidade a antimicrobianos

Para a realização dos antibiogramas, os isolados foram repicados para tubos contendo 3 mL de caldo BHI, os quais foram incubados a 37°C por 24 horas. Após o cultivo bacteriano, a densidade óptica (DO) de cada cultura foi calibrada para 0,1, medindo-se a absorvância a 600 nm em um equipamento biofotômetro (Eppendorf, Hamburgo, Alemanha). As culturas com DO padrão foram semeadas em duplicata em placas de Petri contendo 20 mL de Ágar Mueller-Hinton com o auxílio de suabes estéreis. Posteriormente, foram depositados seis discos em cada placa contendo os seguintes antimicrobianos (Cefar, São Paulo, São Paulo): Amoxicilina + Ácido Clavulânico 30 µg, Cefalexina 30 µg, Cefalotina 30 µg, Cefazolina 30 µg, Ceftiofur 30 µg, Ciprofloxacina 5 µg, Cloranfenicol 30 µg, Enrofloxacina 5 µg, Gentamicina 10 µg, Metronidazol 50 µg, Sulfametoxazol + Trimetoprima 25 µg e Tetraciclina 30 µg. As placas foram incubadas a 37°C por 24 horas para avaliar a sensibilidade dos isolados aos antimicrobianos.

Após o período de incubação, os diâmetros dos halos de inibição da multiplicação bacteriana foram mensurados com o auxílio de uma régua e analisados de acordo com a tabela padrão fornecida pelo fabricante (baseada na CLSI, 2015), por meio da qual os isolados foram classificados como sensíveis ou resistentes aos antimicrobianos testados. Quanto ao antimicrobiano cefalexina, não existem critérios interpretativos na tabela padrão, portanto, neste caso, os isolados que apresentaram qualquer multiplicação celular foram classificados como resistentes, enquanto aqueles com ausência de multiplicação foram considerados como sensíveis.

Foram submetidos aos testes de sensibilidade aos antimicrobianos do grupo dos β -lactâmicos os isolados que apresentaram amplificação para algum dos genes que conferem resistência a essa classe, e alguns isolados que não apresentaram amplificação gênica como controle negativo do teste. Para tanto, as culturas com DO padrão de 0,1 medida a 600 nm foram semeadas em placas de Petri contendo ágar MacConkey (Oxoid, Waltham, USA) suplementado com 1mg/L de cefotaxima, uma cefalosporina de terceira geração, em duplicata. As placas foram incubadas por 24

horas à 37°C e posteriormente avaliadas quanto à presença e/ou ausência de multiplicação bacteriana.

4. RESULTADOS

4.1. Isolados obtidos, seleção dos isolados e identificação por sequenciamento da região 16S rRNA

Dentre as 20 amostras de feridas avaliadas, sete foram classificadas como agudas e 13 como crônicas. Todas as amostras resultaram em cultivo bacteriano, mesmo aquelas que não apresentaram secreção, o que possibilitou a obtenção de dez isolados por cão, totalizando 200 isolados. Mediante comparação entre os perfis genéticos dos dez isolados obtidos de cada paciente (Figura 1), foram selecionados aqueles representantes para o sequenciamento.

Desta forma, dos 200 isolados obtidos, 74 tiveram a região 16S rRNA sequenciada. Embora esta região do DNA apresente maior especificidade para identificação de bactérias em gênero, alguns isolados puderam ser identificados em espécie (SRINIVASAN et al., 2015) (Figuras 2 e 3). Como o marcador molecular OPP7 mostrou uma nítida distinção entre os perfis genéticos de isolados pertencentes a diferentes gêneros e espécies bacterianas, foi possível identificar todos os isolados com base nos resultados do sequenciamento (Figura 1, Tabela 1).

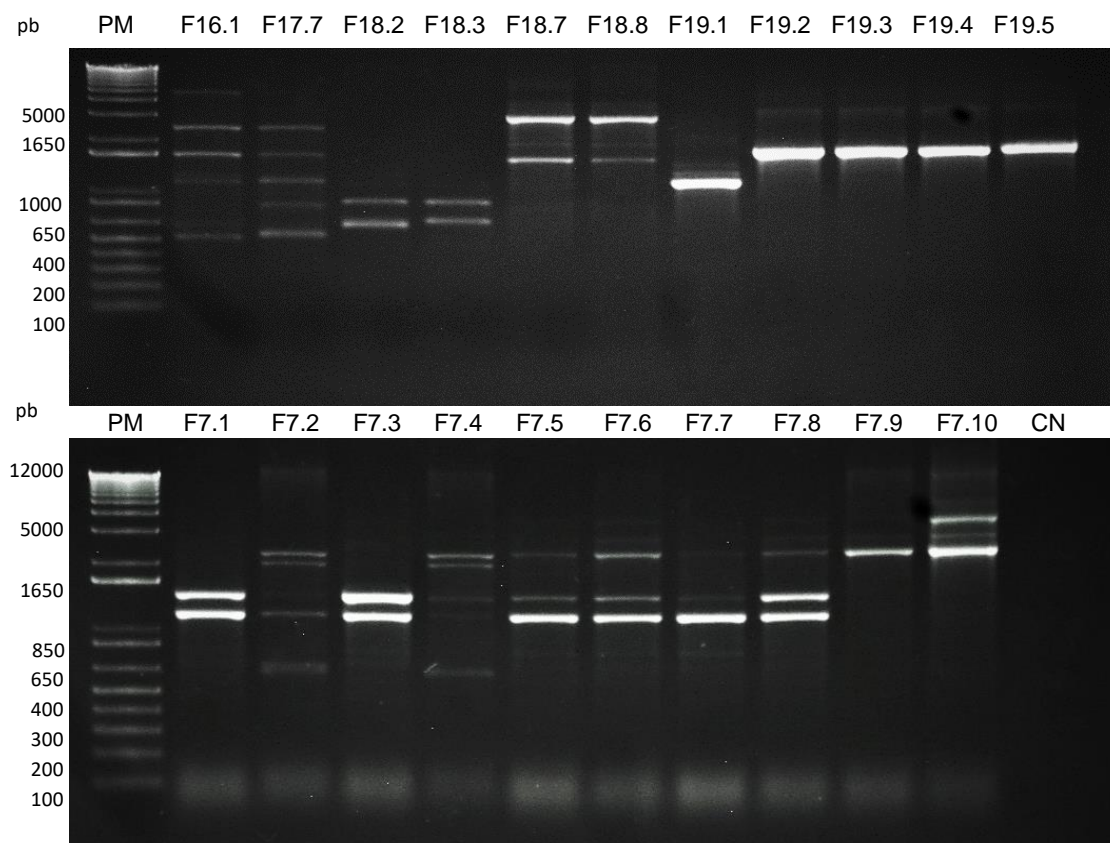


Figura 1. Perfil genético de isolados bacterianos obtidos de feridas cutâneas de cães, segundo PCR-RAPD com o oligonucleotídeo OPP7. PM: padrão de tamanho molecular 1kb plus (Invitrogen); F16.1: *Staphylococcus* sp.; F17.7: *Staphylococcus aureus*; F18.2 e F18.3: *Klebsiella pneumoniae*; F18.7 e F18.8: *Escherichia coli*; F19.1: *Bacillus cereus*; F19.2 a F19.5: *Enterococcus* sp.; F7.1, F7.3, F7.5 a F7.8: *Proteus mirabilis*; F7.2 e F7.4: *Klebsiella pneumoniae*; F7.9: *Klebsiella variicola*; F7.10: *Providencia stuartii*. CN: controle negativo.

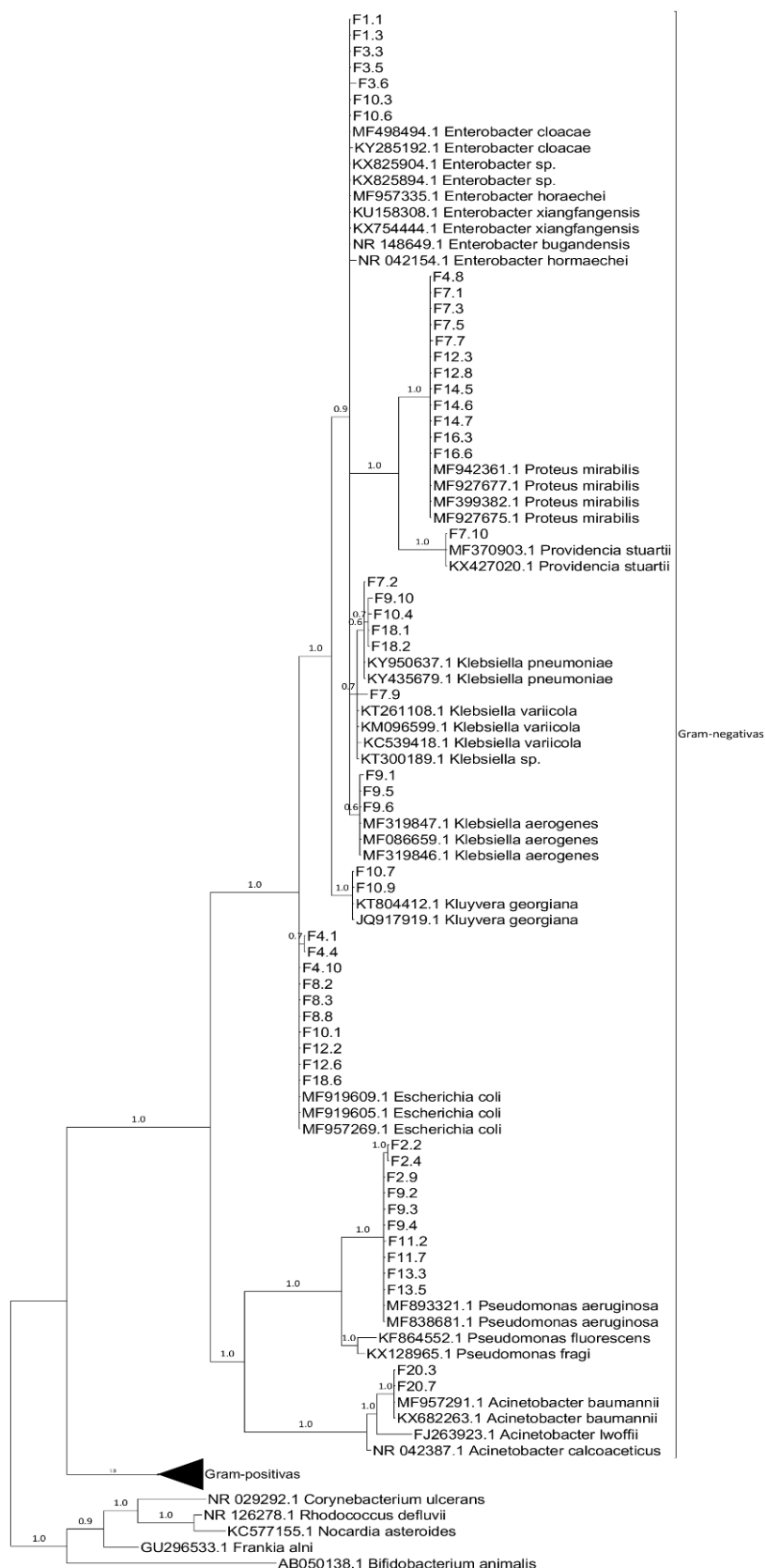


Figura 2. Agrupamento filogenético dos isolados obtidos de feridas cutâneas de cães, com destaque para as bactérias Gram-negativas. Os números entrenós referem-se à confiabilidade dos ramos.

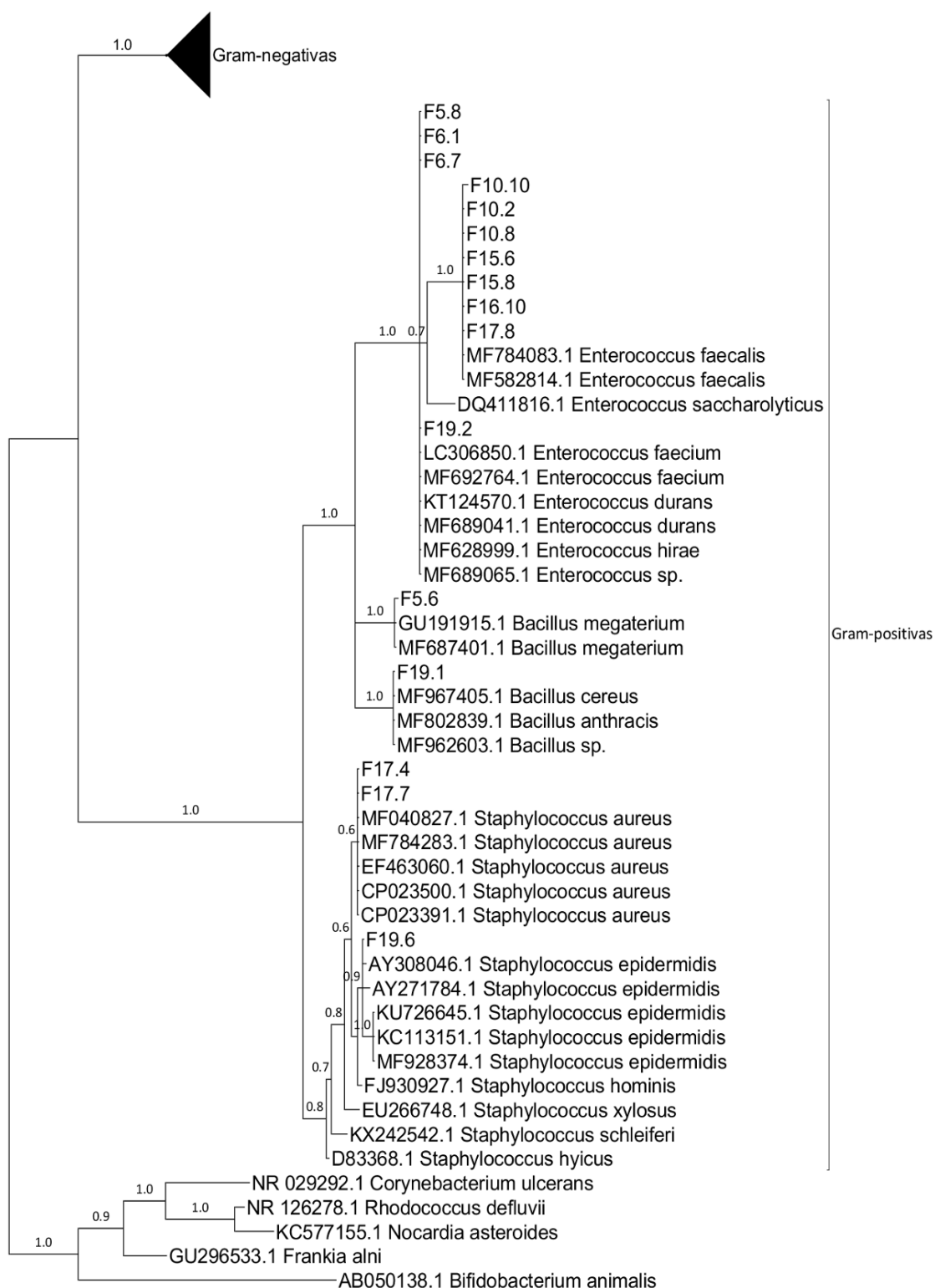


Figura 3. Agrupamento filogenético dos isolados obtidos de feridas cutâneas de cães, com destaque para as bactérias Gram-positivas. Os números entrenós referem-se à confiabilidade dos ramos.

Tabela 1. Características dos pacientes como raça, idade, uso de antibioticoterapia, tipo de ferida amostrada, localização da ferida no corpo, causa da lesão e isolados bacterianos identificados por sequenciamento da região 16S rRNA dos 20 cães avaliados no presente estudo.

| Pacientes | Raça/Idade | Antibiótico-terapia | Tipo de Ferida/Secreção | Localização da Ferida no Corpo | Causa | Espécie ou Gênero encontrado (nº de isolados) |
|-----------|--------------------------|---------------------|-------------------------|--------------------------------|--|--|
| F1 | SRD*/4 anos | Sim | Crônica/Sem secreção | Face (região de focinho) | Queimadura (eletrocoagulação) | <i>Enterobacter</i> spp. (10) |
| F2 | SRD*/4 meses | Sim | Crônica/Sem secreção | Membro Torácico Direito | Necrose por aplicação | <i>Pseudomonas aeruginosa</i> (10) |
| F3 | Shih tzu/5 anos | Sim | Aguda/ Purulenta | Membro Torácico Direito | Mordedura | <i>Enterobacter</i> spp. (4) <i>Enterobacter hormaechei</i> (6) |
| F4 | Yorkshire Terrier/9 anos | Sim | Crônica/ Purulenta | Pelve | Deiscência de Pontos (amputação) | <i>Proteus mirabilis</i> (1) <i>Escherichia coli</i> (9) |
| F5 | Golden Retriever/9 anos | Sim | Aguda/ Purulenta | Pelve | Deiscência de pontos (amputação de membro) | <i>Enterococcus</i> spp. (9) <i>Bacillus megaterium</i> (1) |
| F6 | SRD*/9 anos | Sim | Crônica/ Sem secreção | Membro Torácico Esquerdo | Necrose por aplicação | <i>Enterococcus</i> spp. (10) <i>Proteus mirabilis</i> (6) |
| F7 | SRD*/adulto | Sim | Aguda/ Sem secreção | Membro Pélvico Direito | Desconhecida | <i>Klebsiella pneumoniae</i> (2) <i>Klebsiella variicola</i> (1) <i>Providencia stuartii</i> (1) |

*SRD: sem raça definida

Continuação da Tabela 1

| Pacientes | Raça/Idade | Antibiótico -terapia | Tipo de Ferida/Secreção | Localização da Ferida no Corpo | Causa | Espécie ou Gênero encontrado (nº de isolados) |
|-----------|------------------------------|-------------------------|-------------------------------|-----------------------------------|--|--|
| F8 | Poodle/8 anos | Sim | Crônica/ Purulenta | Mama | Ulceração de tumor | <i>Escherichia coli</i> (10) |
| F9 | SRD*/2 anos | Não | Aguda/ Serosanguinolenta | Cauda | Trauma (desconhecido) | <i>Klebsiella pneumoniae</i> (1) <i>Klebsiella aerogenes</i> (3) <i>Pseudomonas aeruginosa</i> (6) |
| F10 | Poodle/2 anos | Sim | Crônica/ Purulenta | Face | Fístula Oral | <i>Escherichia coli</i> (1) <i>Klebsiella pneumoniae</i> (1) <i>Enterococcus</i> spp. (2) <i>Enterococcus faecalis</i> (2) <i>Enterobacter</i> spp. (2) <i>Kluyvera georgiana</i> (2) |
| F11 | Pastor Alemão/9anos | Sim | Crônica/ Serosanguinolenta | Membro Pélvico Direito | Arraste de membro (lesão em coluna) | <i>Pseudomonas aeruginosa</i> (10) |
| F12 | Poodle/10 anos | Sim | Aguda/ Sem secreção | Região Inguinal Direita | Trauma por atropelamento | <i>Escherichia coli</i> (4) <i>Proteus mirabilis</i> (6) |
| F13 | American Pit Bull/ 8 anos | Sim | Crônica/ Sanguinolenta | Prepúcio | Ulceração de tumor | <i>Pseudomonas aeruginosa</i> (10) |

* SRD: Sem raça definida.

Continuação da Tabela 1

| Pacientes | Raça/Idade | Antibiótico -terapia | Tipo de Ferida/Secreção | Localização da Ferida no Corpo | Causa | Espécie ou Gênero encontrado (nº de isolados) |
|-----------|------------------------------|-------------------------|----------------------------|-----------------------------------|--|---|
| F14 | American Pit Bull/ 7 anos | Sim | Crônica/ Purulenta | Mama | Ulceração de tumor | <i>Proteus mirabilis</i> (10) |
| F15 | SRD*/12 anos | Sim | Crônica/ Purulenta | Olho Direito | Tumor palpebral | <i>Enterococcus faecalis</i> (10) |
| F16 | American Pit Bull/ 8 anos | Sim | Crônica/ Sem secreção | Mama | Ulceração de tumor | <i>Proteus mirabilis</i> (8) <i>Enterococcus faecalis</i> (2) |
| F17 | American Pit Bull/ 7 anos | Sim | Crônica/ Sanguinolenta | Mama | Ulceração de tumor | <i>Staphylococcus aureus</i> (9) <i>Enterococcus faecalis</i> (1) |
| F18 | Shih tzu/45 dias | Não | Aguda/ Sem secreção | Região Inguinal | Lambadura | <i>Klebsiella pneumoniae</i> (3) <i>Enterococcus faecalis</i> (1) <i>Escherichia coli</i> (6) |
| F19 | American Pit Bull/ 8 anos | Sim | Aguda/ Sem secreção | Escroto | Picada de aranha de espécie desconhecida | <i>Bacillus cereus</i> (1) <i>Enterococcus</i> spp. (8) <i>Staphylococcus epidermidis</i> (1) |
| F20 | Poodle/10 anos | Sim | Crônica/ Sanguinolenta | Mama | Ulceração de tumor | <i>Acinetobacter baumannii</i> (10) |

* SRD: Sem raça definida.

Foram encontradas bactérias pertencentes a dois filos, Proteobacteria e Firmicutes. Ao todo, foram identificados 11 gêneros bacterianos pertencentes a cinco famílias: (i) Enterobacteriaceae: *Proteus mirabilis* (15.5%), *Escherichia coli* (15%), *Enterococcus* sp. (14.5%), *Enterobacter* spp. (8%), *Enterococcus faecalis* (8%), *Klebsiella pneumoniae* (3.5%), *Enterobacter hormaechei* (3%), *Klebsiella aerogenes* (1.5%), *Kluyvera georgiana* (1%), *Klebsiella variicola* (0.5%), *Providencia stuartii* (0.5%); (ii) Pseudomonadaceae: *Pseudomonas aeruginosa* (18%); (iii) Bacillaceae: *Bacillus megaterium* (0.5%), *Bacillus* sp. (0.5%); (iv) Staphylococcaceae: *Staphylococcus aureus* (4.5%) e *Staphylococcus epidermidis* (0.5%), e (v) Moraxellaceae: *Acinetobacter baumannii* (5%).

Ambos os pacientes (F10 e F18) que apresentaram feridas cutâneas secundárias à contaminação por secreção salivar, sendo fístula oral e lambadura, respectivamente, apresentaram a identificação de pelo menos três espécies similares, como *Klebsiella pneumoniae*, *Enterococcus faecalis* e *Escherichia coli*. Dentre os cinco pacientes amostrados com ulceração de tumor em região de mama, três (F14, F16 e F17) apresentaram pelo menos uma das seguintes espécies bacterianas em comum *Proteus mirabilis* e *Enterococcus faecalis*.

Casos de cães com feridas agudas ou crônicas, associadas a mais de um gênero bacteriano, foram de 85,7% e 30,7%, respectivamente. Dentre as 18 espécies bacterianas identificadas, sete foram encontradas apenas em feridas agudas e quatro apenas em feridas crônicas (Figura 4). Apesar desta discrepância em termos de espécies, foram encontrados exatamente nove gêneros bacterianos diferentes tanto em feridas agudas quanto em crônicas.

Já em relação à idade dos pacientes, notou-se que ao dividi-los em dois grupos, de 45 dias a 5 anos e de 7 a 12 anos de idade, havia relação da faixa etária do paciente com o tipo de ferida e, inclusive, com a presença de certos gêneros/espécies bacterianas. O grupo dos pacientes mais novos apresentou 57% de feridas classificadas como agudas e 43% como crônicas. Os gêneros *Enterobacter* e *Klebsiella* foram obtidos apenas em cães com esta faixa etária. Ao passo que, nos pacientes mais velhos, 77% das feridas eram crônicas e

23% agudas e, espécies dos gêneros *Bacillus* e *Staphylococcus* foram encontradas apenas em cães deste grupo (Figura 4).

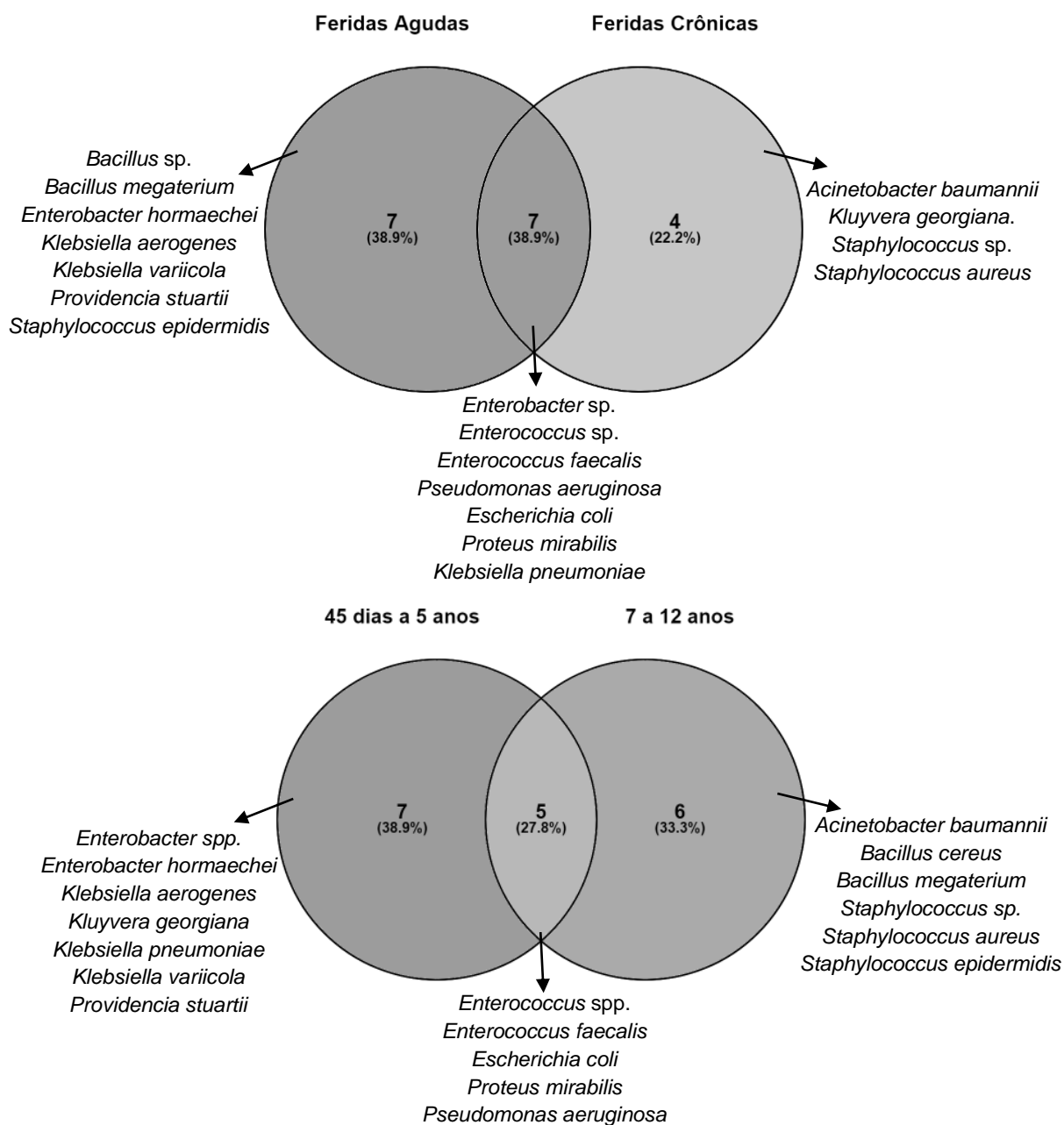


Figura 4. Diagramas de Venn indicando a distribuição de gêneros e espécies bacterianas encontradas em feridas agudas e crônicas, e em pacientes com diferentes faixas etárias.

4.2. PCR espécie-específico para *Staphylococcus* spp. e *Bacillus* spp. e identificação de genes codificadores de toxinas de *Staphylococcus*, *Bacillus* e *E. coli*

Dentre os dez isolados identificados como pertencentes ao gênero *Staphylococcus* pelo sequenciamento da região 16S rRNA, nove (F17.1, F17.2, F17.3, F17.4, F17.5, F17.6, F17.7, F17.9 e F17.10) apresentaram amplificação com os oligonucleotídeos específicos para a espécie *S. aureus*. Com exceção do isolado F17.7, os demais já haviam sido identificados como pertencentes a esta espécie pelo sequenciamento. Já os isolados F16.1 e F19.6 não apresentaram amplificação para as espécies testadas por oligonucleotídeos específicos, no entanto, o isolado F19.6 foi identificado pelo sequenciamento como pertencente à espécie *S. epidermidis*.

Com relação às toxinas estafilocócicas, todos os nove isolados de *S. aureus* obtidos apresentaram amplificação para os genes *sea* e *seh*, oito isolados (F17.1, F17.3, F17.4, F17.5, F17.6, F17.7, F17.9 e F17.10) foram positivos para o gene *see* e também oito (F17.1, F17.2, F17.3, F17.4, F17.6, F17.7, F17.9 e F17.10) para o gene *hlg*. Desta forma, sete isolados apresentaram a associação dos genes *sea + seh + see + hlg* (F17.1, F17.3, F17.4, F17.6, F17.7, F17.9 e F17.10), enquanto o isolado F17.2 apresentou a associação de três genes (*sea + seh + hlg*), assim como o isolado F17.5 que também amplificou para três genes (*sea + seh + see*).

Dentre os dois isolados pertencentes ao gênero *Bacillus* spp. submetidos à identificação por PCR espécie-específico, apenas o F19.1 mostrou-se positivo para a espécie *B. cereus*. Tal resultado coincide com aquele obtido pelo sequenciamento de DNA no qual o isolado F5.6 já havia sido identificado como pertencente à espécie *B. megaterium*. Ambos foram submetidos aos testes de presença de genes codificadores de toxinas. Apenas o isolado F19.1 apresentou amplificação para os genes *hblA*, *hblC*, *hblD*, *nheA*, *nheB*, *nheC* e *entFM*.

Todos os 30 isolados identificados como *E. coli* foram submetidos aos testes para presença dos genes *stx* e *eaeA*, no entanto, nenhum dos isolados apresentou amplificação com os oligonucleotídeos específicos.

4.3. PCR para identificação de genes codificadores de enzimas que conferem resistência a antimicrobianos

Todos os nove isolados positivos para a espécie *S. aureus* não amplificaram para o gene *mecA*, de resistência à meticilina.

Já dentre os 200 isolados testados para a presença de genes responsáveis pela resistência à antibióticos do grupo dos β -lactâmicos, apenas dois (F4.7 e F4.9) apresentaram amplificação com os oligonucleotídeos específicos para o gene *blaCTX-M-2*. A fim de se certificar do resultado, os produtos de amplificação dos dois isolados foram submetidos ao sequenciamento de DNA para comparação com o banco de dados *Genbank*. O resultado foi confirmatório para a presença do gene *blaCTX-M-2* nos dois isolados.

4.4. Teste de sensibilidade a antimicrobianos

Dos 200 isolados avaliados, foram encontrados 70% de resistência por parte dos isolados obtidos de feridas agudas e 63% por parte daqueles oriundos de feridas crônicas. Dentre os isolados presentes em feridas agudas avaliados, 60% apresentaram resistência ao cloranfenicol, 67% à cefalotina, 54% à enrofloxacin, 73% ao sulfametoxazol + trimetoprima, 50% à gentamicina, 60% ao ceftiofur, 94% à cefalexina, 69% à amoxicilina + ácido clavulânico, 80% à tetraciclina, 90% à cefazolina, 52% à ciprofloxacina e 100% ao metronidazol. Já dentre os isolados de feridas crônicas testados, 68% apresentaram resistência ao cloranfenicol, 86% à cefalotina, 31% à enrofloxacin, 63% ao sulfametoxazol + trimetoprima, 7% à gentamicina, 57% ao ceftiofur, 89% à cefalexina, 61% à amoxicilina + ácido clavulânico, 70% à tetraciclina, 94% à cefazolina, 26% à ciprofloxacina e 100% ao metronidazol

(Tabela 2). Assim, todos os isolados apresentaram resistência ao metronidazol, inclusive o isolado da espécie *B. megaterium* que apresentou resistência a apenas este antibiótico.

Os isolados bacterianos de feridas agudas, de diferentes gêneros e espécies, apresentaram maior resistência à cefalexina (94% dos isolados). Já os isolados de feridas crônicas apresentaram maior resistência à cefazolina (94% dos isolados) e, em segundo lugar, também à cefalexina (89% dos isolados). Por outro lado, a gentamicina, foi o antimicrobiano pelo qual os isolados apresentaram menor resistência, tanto aqueles oriundos de feridas agudas (50% dos isolados), quanto aqueles de feridas crônicas (7% dos isolados).

Também, houve casos individuais de alta resistência aos antimicrobianos testados. Os dez isolados obtidos do paciente F3, da espécie *Enterobacter hormaechei*, mostraram resistência aos doze antimicrobianos, assim como o isolado F5.8, do gênero *Enterococcus* sp. Tanto a ferida do cão F3 quanto do F5 foram classificadas como agudas e apresentavam secreção purulenta no momento da coleta, variando apenas a causa da lesão, no caso do paciente F3 foi devido à mordedura e do F5, deiscência de pontos.

Comparando-se a resistência antimicrobiana de isolados obtidos de feridas agudas e crônicas observou-se que, com exceção do cloranfenicol, cefalotina e cefazolina, os isolados de feridas agudas apresentaram maior percentual de resistência aos antimicrobianos testados em detrimento daqueles de feridas crônicas. Como exemplo, todos os isolados do gênero *Enterobacter* spp. obtidos de feridas agudas apresentaram resistência aos antimicrobianos testados, sendo que o mesmo não foi observado para aqueles pertencentes ao mesmo gênero obtidos de feridas crônicas.

Em relação aos isolados de *S. aureus* que apresentaram amplificação para genes codificadores de toxinas, notou-se que os isolados que tiveram associação dos genes *sea* + *seh* + *see* + *hlg* (F17.4 e F17.9) apresentaram resistência a cinco dos antibióticos testados, sulfametoxazol + trimetoprima, cefalexina, tetraciclina, cefazolina e metronidazol, assim como o isolado F17.5 que apresentou associação dos genes *sea* + *seh* + *see*. Já o isolado F17.7 que

também apresentou associação dos quatro genes citados primeiramente mostrou resistência apenas aos antibióticos cefalexina, tetraciclina e metronidazol.

Já o isolado F19.1 de *B. cereus*, que mostrou amplificação para sete dos nove genes de virulência testados, apresentou resistência a seis antimicrobianos, sulfametoxazol + trimetoprima, ceftiofur, cefalexina, amoxicilina + ácido clavulânico, cefazolina e metronidazol.

Os isolados F4.7 e F4.9 da espécie *E. coli*, supostamente resistentes à antibióticos do grupo dos β -lactâmicos por terem apresentado amplificação para o gene *blaCTX-M-2*, provaram ser de fato resistentes quando submetidos ao teste de sensibilidade ao antibiótico cefotaxima. Outros isolados do estudo, que não apresentaram amplificação para o gene, utilizados como controle negativo, não se multiplicaram nas placas com esse antibiótico. Adicionalmente, os isolados F4.7 e F4.9 apresentaram resistência a outros 10 dos antimicrobianos testados, como cloranfenicol, cefalotina, enrofloxacina, sulfametoxazol + trimetoprima, ceftiofur, cefalexina, tetraciclina, cefazolina, ciprofloxacina e metronidazol.

Dos 18 pacientes incluídos neste estudo que fizeram uso de antimicrobianos, apenas cinco (F2, F3, F4, F10 e F12) estavam sob tratamento no momento da coleta, sendo que para os demais já havia sido suspenso. Todos os cinco pacientes possuíam estirpes bacterianas resistentes aos antimicrobianos pelos quais estavam fazendo uso. O paciente F2 estava sendo tratado com cefalexina, o paciente F3 estava fazendo uso de cefalexina e metronidazol, ao paciente F10 foram prescritos amoxicilina + ácido clavulânico, e aos pacientes F4 e F12 estavam sendo ministrados cefazolina e metronidazol. Todos os dez isolados obtidos de cada um dos pacientes F2, F3 e F4 mostraram resistência aos antimicrobianos pelos quais estavam sendo tratados, assim como seis dos dez isolados testados do paciente F12 e cinco dentre os nove isolados testados do paciente F10.

Tabela 2. Porcentagem de isolados bacterianos obtidos de feridas agudas e crônicas de cães resistentes a antibióticos das classes das penicilinas, das cefalosporinas, das fluorquinolonas, dos aminoglicosídeos, dos nitroimidazólicos, das sulfonamidas e das tetraciclina.

| Tipo de ferida | Gêneros/espécies bacterianas (nº de isolados testados) | % de isolados resistentes aos antibióticos | | | | | | | | | | | |
|---------------------------------------|--|--|------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|------|-------|-------|
| | | AMC | CFE | CFL | CFZ | CTF | CIP | CLO | ENO | GEN | MTZ | SUT | TET |
| Aguda | <i>Bacillus cereus</i> (1) | 100% | 100% | - | 100% | 100% | - | - | - | - | 100% | 100% | - |
| | <i>Bacillus megaterium</i> (1) | - | - | - | - | - | - | - | - | - | 100% | - | - |
| | <i>Enterobacter sp.</i> (4) | 100% | 100% | 100% | 100% | 100% | 100% | 100% | 100% | 100% | 100% | 100% | 100% |
| | <i>Enterobacter hormaechei</i> (6) | 100% | 100% | 100% | 100% | 100% | 100% | 100% | 100% | 100% | 100% | 100% | 100% |
| | <i>Enterococcus sp.</i> (22) | 83.3% | 100% | 100% | 100% | 95.5% | 86.4% | 9% | 95.5% | 72.7% | 100% | 100% | 100% |
| | <i>Enterococcus faecalis</i> (1) | - | 100% | 100% | 100% | 100% | - | 100% | - | 100% | 100% | 100% | 100% |
| | <i>Escherichia coli</i> (10) | 30% | 100% | 70% | 60% | 50% | 80% | 90% | 10% | 10% | 100% | 50% | 70% |
| | <i>Klebsiella aerogenes</i> (3) | 100% | 100% | 100% | 100% | 66.7% | - | 66.7% | 33.3% | - | 100% | 66.7% | 66.7% |
| | <i>Klebsiella pneumoniae</i> (6) | 16.7% | 100% | 33.3% | 83.3% | 16.7% | - | 66.7% | 16.7% | - | 100% | 50% | 100% |
| | <i>Klebsiella variicola</i> (1) | 100% | 100% | 100% | 100% | - | - | 100% | - | 100% | 100% | - | 100% |
| | <i>Providencia stuartii</i> (1) | 100% | 100% | - | 100% | - | - | - | - | - | 100% | - | 100% |
| | <i>Proteus mirabilis</i> (12) | 33.3% | 100% | 33.3% | 91.7% | - | - | 16.7% | 16.7% | 8.3% | 100% | - | 100% |
| | <i>Pseudomonas aeruginosa</i> (6) | 50% | 100% | 100% | 100% | 50% | - | 100% | 50% | - | 100% | 100% | 50% |
| <i>Staphylococcus epidermidis</i> (1) | - | 100% | 100% | - | 100% | 100% | - | 100% | 100% | 100% | 100% | - | |

AMC, Amoxicilina + Ácido Clavulânico; CFE, Cefalexina; CFL, Cefalotina; CFZ, Cefazolina; CTF, Ceftiofur; CIP, Ciprofloxacina; CLO, Cloranfenicol; ENO, Enrofloxacin GEN, Gentamicina; MTZ, Metronidazol; SUT, Sulfametoxazol + Trimetoprima; TET, tetraciclina.

- = sensibilidade

Continuação da Tabela 2

| Tipo de ferida | Gêneros/espécies bacterianas (nº de isolados testados) | % de isolados resistentes aos antibióticos | | | | | | | | | | | |
|----------------|--|--|------|------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|------|-------|-------|
| | | AMC | CFE | CFL | CFZ | CTF | CIP | CLO | ENO | GEN | MTZ | SUT | TET |
| | <i>Acinetobacter baumannii</i> (10) | 20% | 100% | 100% | 100% | 100% | - | 100% | - | - | 100% | - | - |
| | <i>Enterobacter sp.</i> (12) | 83.3% | 100% | 100% | 100% | - | 16.7% | - | 8.3% | 8.3% | 100% | 8.3% | 16.7% |
| | <i>Enterococcus sp.</i> (7) | 100% | 100% | 100% | 100% | 100% | 71.4% | 28.6% | 100% | 28.6% | 100% | 100% | 100% |
| | <i>Enterococcus faecalis</i> (15) | 46.7% | 100% | 80% | 100% | 60% | - | 40% | 53.3% | 46.7% | 100% | 73.3% | 93.3% |
| | <i>Escherichia coli</i> (20) | 25% | 100% | 75% | 70% | 45% | 80% | 80% | 45% | - | 100% | 45% | 75% |
| | <i>Klebsiela pneumoniae</i> (1) | - | 100% | - | 100% | - | 100% | 100% | - | - | 100% | - | 100% |
| Crônica | <i>Kluyvera georgiana</i> (2) | 100% | 100% | 100% | 100% | 100% | - | 100% | 100% | - | 100% | 100% | 100% |
| | <i>Proteus mirabilis</i> (19) | 52.6% | 100% | 79% | 100% | 52.6% | - | 52.6% | - | 5.3% | 100% | 100% | 100% |
| | <i>Pseudomonas aeruginosa</i> (30) | 100% | 100% | 100% | 100% | 100% | - | 100% | 43.3% | - | 100% | 100% | 100% |
| | <i>Staphylococcus aureus</i> (9) | 11% | 100% | 11% | 88.9% | 11% | - | 11% | - | - | 100% | 44.4% | 100% |

AMC, Amoxicilina + Ácido Clavulânico; CFE, Cefalexina; CFL, Cefalotina; CFZ, Cefazolina; CTF, Ceftiofur; CIP, Ciprofloxacina; CLO, Cloranfenicol; ENO, Enrofloxacin GEN, Gentamicina; MTZ, Metronidazol; SUT, Sulfametoxazol + Trimetoprima; TET, tetraciclina; -, sensibilidade.

5. DISCUSSÃO

A microbiota normal da pele dos cães é muito rica em microrganismos que passam a ter contato com a ferida e podem vir a causar infecção dependendo da capacidade imunológica da pele do animal assim como do seu estado de saúde geral (COGEN; NIZET; GALLO, 2008; HOFFMANN et al., 2014). Neste estudo, observou-se que os casos de feridas crônicas em pacientes na faixa etária de sete a doze anos foram quase duas vezes maior do que nos pacientes com menos de cinco anos de idade, sendo este um indicativo de que o avanço da idade pode interferir no processo de cicatrização e viabilizar o surgimento de feridas crônicas. Além disso, notou-se que nas feridas dos pacientes mais velhos houve maior prevalência de bactérias gram-positivas em comparação com aquelas amostradas de pacientes que tinham até cinco anos de idade. De forma similar, os resultados de um estudo que correlacionou a faixa etária de humanos com a composição da microbiota da pele e das narinas, mostrou diferenças significativas de filo, gênero e espécies bacterianas que compunham a microbiota de crianças e adultos (OH et al., 2012). Os pesquisadores sugeriram que esta discrepância se dá principalmente devido às mudanças hormonais que ocorrem com o passar dos anos.

As bactérias identificadas no presente estudo foram pertencentes ao filo Proteobacteria, em sua maioria, e ao filo Firmicutes. Embora a técnica utilizada permita a identificação apenas das bactérias mais prevalentes na ferida de cada um dos pacientes amostrados, tais resultados coincidem com um estudo metagenômico da pele de cães saudáveis de diferentes raças e idades que também apontou o filo Proteobacteria como o mais abundante, seguido de Firmicutes, Actinobacteria, Bacteroidetes e Cyanobacteria (HOFFMANN et al., 2014).

Tanto as feridas agudas quanto crônicas amostradas apresentaram diversidade de gêneros e espécies bacterianas, com prevalência de bactérias gram-negativas (71,5%) sobre as gram-positivas (28,5%). A literatura relata grande diversidade de espécies e gêneros bacterianos presentes em feridas cutâneas e é divergente quanto aos casos de prevalência de microrganismos gram-negativos e gram-positivos na pele, o que dificulta a escolha da terapia clínica (SORUM;

SUNDE, 2001; MEYERS et al., 2008; MOURO; VILELA; NIZA, 2010; URUMOVA et al., 2012).

Dentre as espécies gram-negativas identificadas, *Proteus mirabilis* e *E. coli* foram isoladas em um maior número de pacientes, ocorrendo em 25% dos casos, sendo, inclusive, encontradas em associação em dois pacientes do estudo. Essas espécies estão geralmente associadas a infecções no trato urinário (COHN et al., 2003; BUBENIK et al., 2007) e a casos de otite externa crônica (ZAMANKHAN MALAYERI; JAMSHIDI; ZAHRAEI SALEHI, 2010), mas também já foram isoladas de feridas cirúrgicas infectadas de cães (WINDAHL et al., 2015). Por estarem presentes no solo, na água e no trato intestinal de mamíferos, podem ser consideradas grandes responsáveis por infecções nosocomiais em humanos (JACOBSEN; SHIRTLIFF, 2011). São gêneros bacterianos importantes, não somente sob o ponto de vista veterinário mas, principalmente, em saúde pública (HARADA et al., 2014).

A resistência de estirpes de *E. coli* aos antimicrobianos do grupo dos β -lactâmicos constitui um sério problema, uma vez que tais antimicrobianos estão entre os mais modernos comumente utilizados na medicina humana e veterinária (PRESCOTT et al., 2002; EGUALE et al., 2017). Neste estudo, foram encontrados dois isolados de *E. coli* que apresentaram o gene *blaCTX-M-2* e mostraram resistência *in vitro* à uma cefalosporina de terceira geração, assim como a vários outros antimicrobianos. A literatura relata que estirpes ExPEC de *E. coli* (patogênica extra-intestinal), associadas a infecções do trato urinário, possuem maior prevalência dos genes *blaTEM*, *blaSHV* e *blaCTX-M*, respectivamente (BORA et al., 2014; SEYEDJAVADI; GOUDARZI; SABZEHALI, 2016). Dados mais recentes apontam que, entre as β -lactamases de espectro estendido, o tipo *blaCTX-M* é o mais comum, sendo o filogrupo *blaCTX-M-1* o mais amplamente distribuído em todo o mundo (BROLUND; SANDEGREN, 2016). Além disso, estirpes que possuem genes codificadores para β -lactamases são, geralmente, resistentes a vários outros antimicrobianos (COURTICE, R.; SNIATYNSKI, M.; RUBIN, 2016), assim como observado no presente estudo. A emergência de estirpes resistentes a antimicrobianos do grupo dos β -lactâmicos consiste em grande risco à saúde pública mundial por estar associada à transferência de resistência a multidrogas

(SEYEDJAVADI; GOUDARZI; SABZEHALI, 2016), e se deve, principalmente, ao uso indiscriminado de antibióticos (RODAS et al., 2011).

Ainda com relação às espécies gram-negativas encontradas neste estudo, a segunda mais abundante, identificada em 20% dos pacientes e correspondente à 18% dos isolados obtidos, foi *Pseudomonas aeruginosa*. O gênero *Pseudomonas* spp. pode ser isolado da microbiota normal da pele (PETERSEN et al., 2002) e de feridas não infectadas (STEPHENS et al., 2003). No entanto, em cães, este gênero tem grande importância por estar relacionado a casos de otite crônica e piodermite crônica profunda (KROGH; KRISTENSEN, 1981; SEOL et al., 2002), podendo ter associação com outros patógenos, tais como *Staphylococcus intermedius* e *E. coli* (SCOTT; MILLER; GRIFFIN, 2001).

No presente estudo, a espécie *P. aeruginosa* foi identificada em 12% dos isolados obtidos de feridas agudas e em 23% dos isolados de feridas crônicas. De fato, a literatura relata que o gênero *Pseudomonas* spp. é encontrado mais tardiamente no leito de feridas em humanos, o qual tende a não invadir os tecidos mais profundos, porém, pode causar significativa deterioração local devido à produção de enzimas lesivas aos tecidos (SCHULTZ et al., 2003). Outro estudo, que utilizou abordagem metagenômica de feridas crônicas em humanos, mostrou uma relação significativa da antibioticoterapia com o aumento na abundância de bactérias da família Pseudomonadaceae (PRICE et al., 2009). De forma similar, no presente estudo, dentre os quatro pacientes nos quais a espécie *P. aeruginosa* foi identificada, três estavam sob uso de antimicrobianos. Além disso, destaca-se que o paciente F2, cuja ferida era crônica, apresentou prevalência de isolados dessa espécie bacteriana, os quais se mostraram resistentes ao antimicrobiano cefalexina, o qual estava sendo ministrado na ocasião da coleta das amostras.

Membros do gênero *Enterobacter* spp., por sua vez, foram identificados em 11% dos isolados obtidos. Tais bactérias são comumente encontradas em ambientes terrestres e aquáticos, assim como no trato intestinal de mamíferos (DAVIN-REGLI; PAGÈS, 2015). Em humanos, *Enterobacter* spp. foi reportado como causa de infecções hospitalares, incluindo infecções do trato urinário, sepse, pneumonia e infecções no sítio operatório (YE et al., 2006; MANZUR et al., 2007). A espécie *E. hormaechei*, encontrada no presente trabalho, resistente a todos os

antimicrobianos testados, foi relatada em surtos hospitalares de infecção invasiva em vários pacientes (PAAUW et al., 2009).

Dentre as Enterobacteriaceae, *Klebsiella pneumoniae*, identificada tanto em feridas agudas quanto em crônicas no presente estudo, está entre as causas mais importantes de infecções bacterianas hospitalares em humanos (SEKI et al., 2013) e o aumento de sua resistência a agentes antimicrobianos tem se tornado um problema cada vez mais relevante (PATERSON, 2006). De fato, os isolados desta espécie encontrados no presente estudo apresentaram alta resistência aos antimicrobianos testados, com exceção apenas da gentamicina. O gênero *Klebsiella* foi encontrado em quatro pacientes e totalizou 5,5% dos isolados obtidos. *Klebsiella* é uma bactéria comensal presente no intestino, entretanto, é um patógeno oportunista que pode estar relacionado com casos de mastite no gado (DAHMEN et al., 2013), abortos em éguas (FERRER; PALOMARES, 2017), sepse em bezerros (FECTEAU et al., 1997), pneumonia e infecções do trato urinário em cães, pneumonia e septicemia em potros (WILSON; MADIGAN, 1989) e poliartrites em crianças (BERNABE et al., 1998).

A espécie *Kluyvera georgiana* foi encontrada apenas no paciente F10 com ferida crônica, no qual foram encontradas outras cinco espécies bacterianas. Esta espécie está associada à graves infecções em humanos e a um alto nível de resistência a antimicrobianos (RIBEIRO et al., 2012), como de fato foi verificado no presente estudo. O gênero *Kluyvera* é responsável por casos de sepse, peritonite, infecções de tecidos moles e nos tratos urinário e gastrointestinal em humanos (SARRIA; VIDAL; KIMBROUGH, 2001; BROOKS; FELDMAN, 2003).

Acinetobacter baumannii, uma espécie também gram-negativa, é um patógeno oportunista que possui mecanismos de expressão gênica que os tornam multirresistentes a antibióticos (MUNOZ-PRICE; WEINSTEIN, 2008; ENDIMIANI et al., 2011), relato este comprovado pelos resultados da nossa pesquisa, na qual 70% dos isolados desta espécie foram resistentes a multidrogas. Esta espécie foi encontrada em apenas uma paciente diagnosticada com neoplasia em mama com ferida crônica com mais de um ano de evolução. *A. baumannii* é comumente responsável por infecções nosocomiais em pacientes humanos imunossuprimidos e severamente doentes (PELEG; SEIFERT; PATERSON, 2008), o que pode justificar

seu isolamento em uma paciente com doença crônica e de característica imunossupressiva.

Providencia stuartii foi encontrada em apenas um paciente com ferida aguda. Esta bactéria está intimamente relacionada aos gêneros *Proteus* sp. e *Morganella* sp. (O'HARA; BRENNER; MILLER, 2000), sendo isolada neste paciente juntamente com estirpes da espécie *Proteus mirabilis*. Em humanos, espécies de *Providencia* são uropatógenos comuns e contribuem para o desenvolvimento de urolitíase (WIE, 2015), além de serem capazes de ocasionar gastroenterites (YOH et al., 2005). Em um relato de caso, *P. stuartii*, foi reportada ocasionando infecção em um cão com ulceração severa da pele e celulite (PAPADOGIANNAKIS et al., 2007). Como *P. stuartii* é comumente encontrada no trato urinário, os pesquisadores supuseram que a bactéria possa ter infectado a pele devido à sua disseminação via corrente sanguínea, o que não pôde ser confirmado neste estudo.

Dentre as bactérias gram-positivas encontradas, o gênero *Staphylococcus* é um dos mais citados na literatura como pertencente à microbiota da pele de cães e comumente encontrado em casos de feridas (SORUM; SUNDE, 2001; MEYERS et al., 2008; MOURO; VILELA; NIZA, 2010; URUMOVA et al., 2012). A espécie *S. pseudointermedius* faz parte da microbiota normal da pele do cão, colonizando até 90% dos animais (RUSCHER et al., 2009). Espécies como *S. aureus*, *S. intermedius*, *S. hyicus*, *S. schleiferi* e *S. pseudointermedius* são as mais relatadas dentro do gênero como causadoras de doenças em pele e outros tecidos do corpo, além de cavidades (WINDAHL et al., 2015). *S. aureus* é o patógeno primário encontrado em humanos, enquanto que em cães, são as espécies *S. intermedius* e *S. schleiferi*. No entanto, no presente estudo, não foi observada uma prevalência significativa de isolados pertencentes a esse gênero nas feridas amostradas, estando presente em apenas dois pacientes e com baixa diversidade de espécies, como *S. aureus* e *S. epidermidis*, o que corrobora com estudo metagenômico realizados por Hoffmann e colaboradores (2014), os quais não identificaram isolados desse gênero na pele de cães.

Os isolados da espécie *S. aureus* foram considerados resistentes a multidrogas. Nos estafilococos, a resistência aos macrolídeos, aminoglicosídeos, β -lactâmicos e glicopeptídeos geralmente prejudica a escolha do tratamento

antimicrobiano (CARNEIRO; QUEIROZ; MERQUIOR, 2004). A espécie *S. aureus* ainda produz uma variedade de exoprodutos, como as enterotoxinas (CARNEIRO; QUEIROZ; MERQUIOR, 2004). A presença de toxinas em estirpes de *Staphylococcus* pode potencializar a proliferação de bactérias gram-negativas, sua disseminação sistêmica e a letalidade aos animais (COHEN et al., 2016).

Bactérias produtoras de enterotoxinas têm sido amplamente estudadas, não somente pela possibilidade de infectar alimentos com suas toxinas, mas, principalmente, por serem encontradas em animais e seres humanos (PINCHUK; BESWICK; REYES, 2010). As enterotoxinas estafilococócicas encontradas no presente estudo estão relacionadas principalmente com infecções alimentares (MORRIS; CONWAY; EVERALL, 1972; NILSSON et al., 1999; CHEN; CHIOU; TSEN, 2004; IKEDA et al., 2005; PINCHUK; BESWICK; REYES, 2010). Ler, Lee e Gopalakrishnakone (2006) citam que as enterotoxinas estafilococócicas consideradas mais comuns são *sea* e *seh*. No presente trabalho, todos os isolados de *S. aureus* obtidos possuíam os genes *sea* e *seh*, enquanto alguns apresentaram associação destes com outros genes, *see* e *hlg*. O gene *hlg* foi encontrado em oito dos nove isolados de *S. aureus* obtidos, o que corrobora os dados da literatura de que 99% das cepas desta espécie secretam esta toxina (ANWAR et al., 2009).

Apesar da importância dos estafilococos, o gênero que mais se destacou dentre os gram-positivos foi *Enterococcus* spp., com prevalência em 40% dos pacientes e, correspondente à 22% dos isolados obtidos. *Enterococcus* é uma bactéria comensal dos tratos gastrointestinal e urogenital de humanos, inúmeras espécies de mamíferos e pássaros (KOCH et al., 2004). São comuns em ambientes contaminados com materiais fecais de humanos e animais, como esgoto, reservatórios de água e solos que receberam fertilizantes de origem animal, assim como em alimentos derivados de animais (FRANZ et al., 2001; ARCHIMBAUD et al., 2002; KÜHN et al., 2003). Alguns isolados pertencentes a este gênero são utilizados como probióticos, tendo efeitos benéficos sobre uma série de doenças gastrointestinais e sistêmicas (OMAR et al., 2004). Entretanto, em algumas situações, podem causar doenças graves quando a relação de comensalismo com seus hospedeiros é interrompida (JETT; HUYCKE; GILMORE, 1994). *E. faecium* e *E. faecalis*, associados à colonização ou infecção em animais, são os maiores

causadores de infecções clínicas por enterococos em humanos, incluindo infecções nosocomiais, especialmente em pacientes imunossuprimidos (VERGIS et al., 2002). Estirpes de *Enterococcus* spp. costumam apresentar resistência a uma variedade de classes antimicrobianas, incluindo cefalosporinas, algumas penicilinas, clindamicina e trimetoprima, o que torna as implicações da resistência adquirida ainda maiores (WEESE, 2008). Em nosso estudo, isolados deste gênero apresentaram resistência a todas as classes de antimicrobianos testadas.

O gênero *Bacillus* spp. foi encontrado no presente estudo em apenas dois pacientes com feridas agudas, sendo duas espécies distintas, *B. cereus* e *B. megaterium*. Esta bactéria na forma de bacilo esporulado está associada a infecções cutâneas primárias, sendo a espécie *B. anthracis*, o agente causal do *anthrax* (DUNCAN; SMITH, 2011). A espécie *B. megaterium* já foi reportada em um relato de caso de ferida cutânea em humano com características semelhantes às aquelas ocasionadas por *B. anthracis* (DUNCAN; SMITH, 2011). O isolado pertencente à espécie *B. cereus* apresentou resistência a 50% dos antibióticos, além de possuir sete dos nove genes de enterotoxinas testados, enquanto o isolado de *B. megaterium*, apresentou resistência apenas ao metronidazol e não amplificou para nenhum dos genes de enterotoxinas.

Dentre as feridas amostradas neste estudo, 65% foram classificadas como crônicas. Alguns experimentos relatam maior abundância e diversidade de microrganismos neste tipo de ferida (WALL et al., 2002; SCHULTZ et al., 2003; BOWLER, 2003). No entanto, neste trabalho, na maioria dos casos de cães com feridas agudas foram encontrados mais de um gênero bacteriano associado em detrimento daqueles com feridas crônicas. Tal resultado está, possivelmente, relacionado ao fato dos pacientes com feridas agudas não estarem sob tratamento antimicrobiano por um longo período de tempo. Nas feridas crônicas, foram encontradas bactérias que possuem histórico de resistência a antimicrobianos, o que corrobora o fato dos pacientes terem permanecido por longos períodos com as feridas mesmo sob antibioticoterapia.

O paciente F10, com ferida crônica, apresentou cinco gêneros bacterianos diferentes, sendo este o paciente com maior diversidade de microrganismos do estudo. Tal resultado converge, também, com o fato da ferida crônica do paciente

F10 estar localizada na face, onde pode haver uma maior diversidade de microrganismos advindos de diferentes partes do corpo do cão, principalmente da cavidade oral (GRICE; SEGRE, 2011; HOFFMANN et al., 2014). Apesar de 50% dos isolados testados advindos desse paciente terem sido sensíveis ao antimicrobiano com o qual o paciente estava sendo tratado, possivelmente as outras estirpes resistentes se sobressaíram e conseguiram se instalar e se multiplicar na ferida.

Dentre os outros quatro pacientes em tratamento com antibióticos no momento da coleta das amostras, coincidentemente, dois deles, F4 e F12, estavam fazendo uso da mesma terapia, com cefazolina e metronidazol, e de ambos foram obtidos isolados das espécies *E. coli* e *P. mirabilis*, que apresentaram resistência aos dois antimicrobianos em questão. Já do paciente F3, com o único caso de ferida secundária à mordedura do estudo, foram obtidos apenas isolados do gênero *Enterobacter* que apresentaram resistência a todos os antimicrobianos testados, incluindo àqueles com os quais estava sob tratamento (cefalexina e metronidazol). Este caso difere do que relatam outros pesquisadores, os quais indicam que feridas causadas por mordeduras de cães são geralmente contaminadas e/ou infectadas por uma grande diversidade de microrganismos de diferentes fontes (MEYERS et al., 2008; MOURO; VILELA; NIZA, 2010).

De forma geral, os isolados encontrados no presente estudo, de diferentes gêneros e espécies bacterianas, apresentaram resistência à maioria dos antimicrobianos testados, além de terem sido, inclusive, resistentes aos antimicrobianos pelos quais alguns dos pacientes estavam sendo tratados. Todos os isolados apresentaram resistência ao metronidazol, o que já era de se esperar, já que é um fármaco comumente utilizado para protozoários e bactérias anaeróbicas (LÖFMARK; EDLUND; NORD, 2010). Estes resultados são preocupantes porque o cão muitas vezes vive em contato com seu companheiro humano e às vezes compartilha casa e cama (WALTHER et al., 2012). Além disso, os cães foram apontados como fator de risco de transferência de estirpes bacterianas possuidoras de genes de β -lactamases para seus proprietários (MEYER et al., 2012), e em amplo espectro, podem transferir estirpes com vários genes de enterotoxinas e responsáveis por resistência a multidroga.

6. CONCLUSÃO

O diagnóstico de resistência bacteriana através do antibiograma é prática, ainda, pouco utilizada na Medicina Veterinária. Apesar da técnica ser de simples realização e seu custo ser relativamente baixo, muitos profissionais preferem contar com a sorte e arriscar na escolha do tratamento contra infecções, sendo uma das principais causas de desenvolvimento de resistência à multidrogas e de bactérias portadoras de genes codificadores de toxinas. Por existir uma ampla gama de espécies colonizando feridas cutâneas agudas e crônicas de cães e, a grande maioria, apresentar resistência aos antimicrobianos mais utilizados na rotina clínica veterinária, a técnica deve ser de uso obrigatório e a escolha do tratamento, individualizada, para que, no futuro, não tenhamos organismos resistentes a todas às drogas disponíveis no mercado tanto para animais quanto para humanos.

7. REFERÊNCIAS

AARESTRUP, F. M. Veterinary drug usage and antimicrobial resistance in bacteria of animal origin. **Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology**, v. 96, n. 4, p. 271-281, 2005.

AGATA, N.; OHTA, M.; ARAKAWA, Y.; MORI, M. The bceT gene of *Bacillus cereus* encodes an enterotoxigenic protein. **Microbiology**, v. 141, n. pt 4; p. 983-988, 1995.

ÅKESSON, A.; HEDSTRÖM, S. Å.; RIPA, T. *Bacillus cereus*: A significant pathogen in postoperative and post-traumatic wounds on orthopaedic wards. **Scandinavian Journal of Infectious Diseases**, v. 23, n. 1, p. 71-77, 1991.

ALTSCHUL, S. F.; MADDEN, T. L.; SCHÄFFER, A. A.; ZHANG, J.; ZHANG, Z.; MILLER, W.; LIPMAN, D. J. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. **Nucleic Acids Research**, v. 25, n. 17, p. 3389-3402, 1997.

ANGEL, D. E.; LLOYD, P.; CARVILLE, K.; SANTAMARIA, N. The clinical efficacy of two semi-quantitative wound-swabbing techniques in identifying the causative organism(s) in infected cutaneous wounds. **International Wound Journal**, v. 8, n. 2, p. 176-185, 2011.

ANWAR, S.; PRINCE, L. R.; FOSTER, S. J.; WHYTE, M. K.; SABROE, I. The rise and rise of *Staphylococcus aureus*: laughing in the face of granulocytes. **Clinical and Experimental Immunology**, v. 157, n. 4, p. 216-224, 2009.

ARCHIMBAUD, C., SHANKAR, N., FORESTIER, C., BAGHDAYAN, A., GILMORE, M.S., CHARBONNÉ, F., JOLY, B., 2002. In vitro adhesive properties and virulence factors of *Enterococcus faecalis* strains. **Research in Microbiology**, v. 153, n. 2, p. 75-80, 2002.

ASANO, S. -I.; NUKUMIZU, Y.; BANDO, H.; IIZUKA, T.; YAMAMOTO, T. Cloning of novel enterotoxin genes from *Bacillus cereus* and *Bacillus thuringiensis*. **Applied and environmental microbiology**, v. 63, n. 3, p. 1054-1057, 1997.

BAG, S.; SAHA, B.; MEHTA, O.; ANBUMANI, D.; KUMAR, N.; DAYAL, M.; PANT, A.; KUMAR, P.; SAXENA, S.; ALLIN, K. H.; HANSEN, T., ARUMUGAM, M.; VESTERGAARD, H.; PEDERSEN, O.; PEREIRA, V.; ABRAHAM, P.; TRIPATHI, R.; WADHWA, N.; BHATNAGAR, S.; PRAKASH, V. G.; RADHA, V., ANJANA, R. M.; MOHAN, V.; TAKEDA, K.; KURAKAWA, T.; NAIR, G. B.; DAS, B. An improved method for high quality metagenomics DNA extraction from human and environmental samples. **Scientific Reports**, v. 6, p. 26775, 2016.

BALL, K. R.; RUBIN, J. E.; CHIRINO-TREJO, M.; DOWLING, P. M. Antimicrobial resistance and prevalence of canine uropathogens at the Western College of Veterinary Medicine Veterinary Teaching Hospital, 2002-2007. **The Canadian Veterinary Journal**, v. 49, n. 10, p. 985-990, 2008.

BARBOSA, T. M.; SERRA, C. R.; LA RAGIONE, R. M.; WOODWARD, M. J.; HENRIQUES, A. O. Screening for *Bacillus* isolates in the broiler gastrointestinal tract. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 71, n. 2, p. 968-978, 2005.

BEECHER, D. J.; MACMILLAN, J. D. Characterization of the components of hemolysin BL from *Bacillus cereus*. **Infection and Immunity**, v. 59, n. 5, p. 1778-1784, 1991.

BEUTIN, L. *Escherichia coli* as a pathogen in dogs and cats. **Veterinary Research**, v. 30, n. 2-3, p. 285-298, 1999.

BERNABE, A.; CONTRERAS, A.; GÓMEZ, M. A.; SÁNCHEZ, A.; CORRALES, J. C.; GÓMEZ, S. Polyarthritis in kids associated with *Klebsiella pneumoniae*. **The Veterinary Record**, v. 142, n. 2, p. 64-66, 1998.

BLUE, J. L.; WOOLEY, R. E. Antibacterial sensitivity patterns of bacteria isolated from dogs with otitis externa. **Journal of American Veterinary Medical Association**, v. 171, n. 4, p. 362-363, 1977.

BOOTHE, D.; SMAHA, T.; CARPENTER, D. M.; SHAHEEN, B.; HATCHCOCK, T. Antimicrobial resistance and pharmacodynamics of canine and feline pathogenic *E. coli* in the United States. **Journal of the American Animal Hospital Association**, v. 48, n. 6, p. 379-389, 2012.

BORA, A.; HAZARIKA, N. K.; SHUKLA, S. K.; PRASAD, K. N.; SARMA, J. B.; AHMED, G. Prevalence of bla_{TEM}, bla_{SHV} and bla_{CTX-M} genes in clinical isolates of *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* from Northeast India. **Indian Journal of Pathology and Microbiology**, v. 57, n. 2, p. 249-254, 2014.

BOTTONE, E. J. *Bacillus cereus*, a volatile human pathogen. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 23, n. 2, p. 382-398, 2010.

BOUZA, E.; CERCENADO, E. *Klebsiella* and *Enterobacter*: antibiotic resistance and treatment implications. **Seminars in Respiratory Infections**, v. 17, n. 3, p. 215-230, 2002.

BOWLER, P. G. The 10 (5) bacterial growth guideline: reassessing its clinical relevance in wound healing. **Ostomy/Wound Management**, v. 49, n. 1, p. 44-53, 2003.

BOWLER, P. G.; DUERDEN, B. I.; ARMSTRONG, D. G. Wound microbiology and associated approaches to wound management. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 14, n. 2, p. 244-269, 2001.

BOYCE, J. M.; HAVILL, N. L. Nosocomial Antibiotic-Associated Diarrhea Associated with Enterotoxin-Producing Strains of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*. **The American Journal of Gastroenterology**, v. 100, n. 8, p. 1828-1834, 2005.

BOZDOGAN, B. U.; ESEL, D.; WHITENER, C.; BROWNE, F. A.; APPELBAUM, P. C. Antibacterial susceptibility of a vancomycin-resistant *Staphylococcus aureus* strain isolated at the Hershey Medical Center. **The Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 52, n. 5, p. 864-868, 2003.

BRISSE, S.; VAN DUJKEREN, E. Identification and antimicrobial susceptibility of 100 *Klebsiella* animal clinical isolates. **Veterinary Microbiology**, v. 105, n. 3-4, p. 307-312, 2005.

BRISSE, S.; MILATOVIC, D.; FLUIT, A. C.; VERHOEF, J.; SCHMITZ, F. J. Epidemiology of quinolone resistance of *Klebsiella pneumoniae* and *Klebsiella oxytoca* in Europe. **European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases: Official Publication of the European Society of Clinical Microbiology**, v. 19, n. 1, p. 64-68, 2000.

BROLUND, A.; SANDEGREN, L. Characterization of ESBL disseminating plasmids. **Infectious Diseases**, v. 48, n. 1, p. 18-25, 2016.

BROOK, I.; FRAZIER, E. H. Aerobic and anaerobic microbiology of infection after trauma. **The American Journal of Emergency Medicine**, v. 16, n. 6, p. 585-591, 1998.

BROOKS, T.; FELDMAN, S. Central venous catheter infection in a child: case report and review of *Kluyvera* infection in children. **Southern Medical Journal**, v. 96, n. 2, p. 214-217, 2003.

BROWNRIGG, J. R.; APELQVIST, J.; BAKKER, K.; SCHAPER, N. C.; HINCHLIFFE, R. J. Evidence-based management of PAD & the diabetic foot. **European Journal of Vascular and Endovascular Surgery**, v. 45, n. 6, p. 673-681, 2013.

BUBENIK, L. J.; HOSGOOD, G. L.; WALDRON, D. R.; SNOW, L. A. Frequency of urinary tract infection in catheterized dogs and comparison of bacterial culture and susceptibility testing results for catheterized and noncatheterized dogs with urinary tract infections. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 231, n. 6, p. 893-899, 2007.

BUTAYE, P.; DEVRIESE, L. A.; HAESBROUCK, F. Antimicrobial growth promoters used in animal feed: effects of less well known antibiotics on gram-positive bacteria. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 16, n. 2, p. 175-188, 2003.

BYARUGABA, D. K. A view on antimicrobial resistance in developing countries and responsible risk factors. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 24, n. 2, p. 105-110, 2004.

CARNEIRO, L.; QUEIROZ, M.; MERQUIOR, V. L. C. Antimicrobial-resistance and enterotoxin-encoding genes among staphylococci isolated from expressed human breast Milk. **Journal of Medical Microbiology**, v. 53, n. 8, p. 761-768, 2004.

CATEGORIZATION OF ANTIMICROBIAL DRUGS BASED ON IMPORTANCE IN HUMAN MEDICINE, 2009. **Health Canada**. Disponível em: http://www.hc-sc.gc.ca/dhp-mps/vet/antimicrob/amr_ram_hum-med-rev-eng.php

CDC. **Incidence and trends of foodborne illness**, 2011. Centers for Disease Control and Prevention. 2013.

CDC NNIS System. National Nosocomial Infections Surveillance (NNIS) System Report, Data Summary From January 1992 Through June 2004, Issued October 2004. **American Journal of Infection Control**, v. 32, n. 8, p. 470-485, 2004.

CHEN, T. R.; CHIOU, C. S.; TSEN, H. Y. Use of Novel PCR Primers Specific to the Genes of Staphylococcal Enterotoxin G, H, I for the Survey of Staphylococcus aureus Strains Isolated From Food-Poisoning Cases and Food Samples in Taiwan. **International Journal of Food Microbiology**, v. 92, n. 2, p. 189-197, 2004.

CHINA, B.; PIRSON, V.; MAINIL, J. Typing of bovine attaching and effacing escherichia coli by multiplex in vitro amplification of virulence-associated genes. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 62, n. 9, p. 3462-3465, 1996.

CIFFO, F. Determination of the spectrum of antibiotic resistance of the "*Bacillus subtilis*" strains of Enterogermina. **Chemioterapia : International Journal of the Mediterranean Society of Chemotherapy**, v. 3, n. 1, p. 45-52, 1984.

CLSI. **Performance Standards for Antimicrobial Disk and Dilution Susceptibility Tests for Bacteria Isolated from Animals**. 3rd ed. CLSI supplement VET01S. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2015.

COGEN, A. L.; NIZET, V.; GALLO, R. L. Skin microbiota: a source of disease or defence? **The British Journal of Dermatology**, v. 158, n. 3, p. 442-455, 2008.

COHEN, T. S.; HILLIARD, J. J.; JONES-NELSON, O.; KELLER, A. E.; O'DAY, T.; TKACZYK, C.; DIGIANDOMENICO, A.; HAMILTON, M.; PELLETIER, M.; WANG, Q.; DIEP, B. A.; LE, V. T. M.; CHENG, L.; SUZICH, J.; STOVER, C. K.; SELLMAN, B. R. *Staphylococcus aureus* α toxin potentiates opportunistic bacterial lung infections. **Science Translational Medicine**, v. 8, n. 329, p. 329ra31, 2016.

COHN, L. A.; GARY, A. T.; FALES, W. H.; MADSEN, R. W. Trends in fluoroquinolone resistance of bacteria isolated from canine urinary tracts. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v. 15, n. 4, p. 338-343, 2003.

COURTICE, R.; SNIATYNSKI, M.; RUBIN, J. E. Antimicrobial resistance and beta-lactamase production of *Escherichia coli* causing canine urinary tract infections: Passive surveillance of laboratory isolates in Saskatoon, Canada, 2014. **The Canadian Veterinary Journal**, v. 57, n. 11, p. 1166-1168, 2016.

DAHMEN, S.; MÉTAYER, V.; GAY, E.; MADEC, J. Y.; HAENNI, M. Characterization of extended-spectrum beta-lactamase (ESBL)-carrying plasmids and clones of Enterobacteriaceae causing cattle mastitis in France. **Veterinary Microbiology**, v. 162, n. 2-4, p. 793-799, 2013.

DAHMEN, S.; HAENNI, M.; MADEC, J. Y. Inc11/ST3 plasmids contribute to the dissemination of the *bla*CTX-M-1 gene in *Escherichia coli* from several animal species in France. **The Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 67, n. 12, p. 3011-3012, 2012.

DALLENNE, C.; DA COSTA, A.; DECREÉ, D.; FAVIER, C.; ARLET G. Development of a set of multiplex PCR assays for the detection of genes encoding important beta-lactamases in Enterobacteriaceae. **The Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 65, n. 3, p. 490-495, 2010.

D'ARIENZO, R.; MAURANO, F.; MAZZARELLA, G.; LUONGO, D.; STEFANILE, R.; RICCA, E.; ROSSI, M. *Bacillus subtilis* spores reduce susceptibility to *Citrobacter rodentium*-mediated enteropathy in a mouse model. **Research in Microbiology**, v. 157, n. 9, p. 891-897, 2006.

DARRIBA, D.; TABOADA, G. L.; DOALLO, R.; POSADA, D. jModelTest 2: more models, new heuristics and parallel computing. **Nature Methods**, v. 9, n. 8, p. 772, 2012.

DAVIDSON, J. M. Animal models for wound repair. **Archives of Dermatological Research**, v. 290, p. S1-11, 1998.

DAVIES, C. E.; WILSON, M. J.; HILL, K. E.; STEPHENS, P.; HILL, C. M.; HARDING, K. G.; THOMAS, D. W. Use of molecular techniques to study microbial diversity in the skin: chronic wounds reevaluated. **Wound Repair and Regeneration**, v. 9, n. 5, p. 332-340, 2001.

DAVIN-REGLI, A.; PAGÈS, J. M. *Enterobacter aerogenes* and *Enterobacter cloacae*; versatile bacterial pathogens confronting antibiotic treatment. **Frontiers in Microbiology**, v. 6, p. 392, 2015.

De GRAEF, E. M.; DECOSTERE, A.; DEVRIESE, L. A.; HAESBROUCK, F. Antibiotic resistance among fecal indicator bacteria from healthy individually owned and kennel dogs. **Microbial Drug Resistance**, v. 10, n. 1, p. 65-69, 2004.

DEKIO, I.; HAYASHI, H.; SAKAMOTO, M.; KITAHARA M, NISHIKAWA T, SUEMATSU M, BENNO Y. Detection of potentially novel bacterial components of the human skin microbiota using culture-independent molecular profiling. **Journal of Medical Microbiology**, v. 54, n. 12, p. 1231-1238, 2005.

DENISUIK, A. J.; LAGACE-WIENS, P. R.; PITOUT, J. D.; MULVEY, M. R.; SIMNER, P. J.; TAILOR, F.; KARLOWSKY, J. A.; HOBAN, D. J.; ADAM, H. J.; ZHANEL, G. G. Molecular epidemiology of extended-spectrum beta-lactamase-, AmpC beta-lactamase- and carbapenemase-producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumonia* isolated from Canadian hospitals over a 5 year period: CANWARD 2007-11. **The Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 68, Suppl 1, p. i57-65, 2013.

DESHPANDE, L.; PFALLER, M. A.; JONES, R. N. In vitro activity of ceftiofur tested against clinical isolates of *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* including extended-spectrum beta-lactamase producing strains. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 15, n. 4, p. 271-275, 2000.

DHAMA, K.; RAJAGUNALAN, S.; CHAKRABORTY, S.; VERMA, A. K.; KUMAR, A.; TIWIRI, R.; KAPOOR, S. Food-borne Pathogens of Animal Origin-Diagnosis, Prevention, Control and Their Zoonotic Significance: A Review. **Pakistan Journal of Biological Sciences**, v. 16, n. 20, p. 1076-1085, 2013.

DOWD, S. E.; WOLCOTT, R. D.; SUN, Y.; MCKEEHAN, T.; SMITH, E.; RHOADS, D. Polymicrobial nature of chronic diabetic foot ulcer biofilm infections determined using bacterial tag encoded FLX amplicon pyrosequencing (bTEFAP). **PLoS One**, v. 3, n. 10, p. e3326, 2008.

DROBNIIEWSKI, F. A. *Bacillus cereus* and related species. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 6, n. 4, p. 324-338, 1993.

DUERDEN, B. I. Virulence factors in anaerobes. **Clinical Infectious Diseases**, v. 18, suppl. 4, p. S253-S259, 1994.

DUNCAN, K. O.; SMITH, T. L. Primary cutaneous infection with *Bacillus megaterium* mimicking cutaneous anthrax. **Journal of the American Academy of Dermatology**, v. 65, n. 2, p. 60-61, 2011.

EDGAR, R. C. MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. **Nucleic Acids Research**, v. 32, n. 5, p. 1792-1797, 2004.

EGUALE, T.; BIRUNGI, J.; ASRAT, D.; NJAHIRA, M. N.; NJUGUNA, J.; GEBREYES, W. A.; GUNN, J. S.; DJIKENG, A.; ENGIDAWORK, E. Genetic markers associated with resistance to beta-lactam and quinolone antimicrobials in non-typhoidal *Salmonella* isolates from humans and animals in central Ethiopia. **Antimicrobial Resistance and Infection Control**, v. 6, p. 13, 2017.

EHLERT, K. Methicillin-Resistance in *Staphylococcus aureus* - Molecular Basis, Novel Targets and Antibiotic Therapy. **Current Pharmaceutical Design**, v. 5, n. 2, p. 45-55, 1999.

EHLING-SCHULZ, M.; FRICKER, M.; GRALLERT, H.; RIECK, P.; WAGNER, M.; SCHERER, S. Cereulide synthetase gene cluster from emetic *Bacillus cereus*: structure and location on a mega virulence plasmid related to *Bacillus anthracis* toxin plasmid pXO1. **BMC Microbiology**, v. 6, p. 20, 2006.

EHLING-SCHULZ, M.; VUKOV, N.; SCHULZ, A.; SHAHEEN, R.; ANDERSSON, M.; MÄRTLBAUER, E.; SCHERER, S. Identification and partial characterization of the non ribosomal peptide synthetase gene responsible for cereulide production in emetic *Bacillus cereus*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 71, n. 1, p. 105-113, 2005.

EHLING-SCHULZ, M.; FRICKER, M.; SCHERER, S. *Bacillus cereus*, the causative agent of an emetic type of food-borne illness. **Molecular Nutrition & Food Research**, v. 48, n. 7, p. 479-487, 2004.

ENDIMIANI, A.; HUJER, K. M.; HUJER, A. M.; BERTSCHY, I.; ROSSANO, A.; KOCH, C.; GERBER, V.; FRANCEY, T.; BONOMO, R. A.; PERRETEN, V. *Acinetobacter baumannii* isolates from pets and horses in Switzerland: molecular characterization and clinical data. **The Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 66, n. 10, p. 2248-2254, 2011.

ERB, A.; STURMER, T.; MARRE, R.; BRENNER, H. Prevalence of antibiotic resistance in *Escherichia coli*: Overview of geographical, temporal, and methodological variations. **European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases**, v. 26, n. 2, p. 83-90, 2007.

ERON, L. J. Targeting lurking pathogens in acute traumatic and chronic wounds. **The Journal of Emergency Medicine**, v.17, n.1, p.189-195, 1999.

EUROPEAN FOOD SAFETY AUTHORITY. Scientific opinion on guidance on the assessment of bacterial susceptibility to antimicrobials of human and veterinary importance. **EFSA Journal**, v. 10, n. 6, p. 2740, 2012. Disponível em: www.efsa.europa.eu/efsajournal

EWING, B.; GREEN, P. Basecalling of automated sequencer traces using phred. II. Error probabilities. **Genome Research**, v. 8, n. 3, p. 186-194, 1998.

FECTEAU, G.; VAN METRE, D. C.; PARÉ, J.; SMITH, B. P.; HIGGINS, R.; HOLMBERG, C. A.; JANG, S.; GUTERBOCK, W. Bacteriological culture of blood from critically ill neonatal calves. **The Canadian Veterinary Journal**, v. 38, n. 2, p. 95-100, 1997.

FERRER, M. S.; PALOMARES, R. Aerobic uterine isolates and antimicrobial susceptibility in mares with post-partum metritis. **Equine Veterinary Journal**, v. 50, n. 2, 202-207, 2017.

FLEMMING, K.; ACKERMANN, G. Prevalence of Enterotoxin Producing *Staphylococcus aureus* in Stools of Patients with Nosocomial Diarrhea. **Infection**, v. 35, n. 5, p. 356-358, 2007.

FOSTER, T. J. Immune evasion by staphylococci. **Nature Reviews. Microbiology**, v. 3, n. 12, p. 948-958, 2005.

FOSTER, T. J. The *Staphylococcus aureus* "superbug". **The Journal of Clinical Investigation**, v. 114, n. 12, p. 1693-1696, 2004.

FRANZ, C. M. A. P.; MUSCHOLL-SILBERHORN, A. B.; YOUSIF, N. M. K.; VANCANNEYT, M.; SWINGS, J.; HOLZAPFEL, W. H. Incidence of virulence factors and antibiotic resistance among enterococci isolated from food. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 67, n. 9, p. 4385-4389, 2001.

GAO, Z.; TSENG, C. H.; PEI, Z.; BLASER, M. J. Molecular analysis of human forearm superficial skin bacterial biota. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 104, n. 8, p. 2927-2932, 2007.

GORDON, D.; ABAJIAN, C.; GREEN, P. Consed: a graphical tool for sequence finishing. **Genome Research**, v. 8, n. 3, p. 195-202, 1998.

GOULD, I. M.; BAL, A. M. New antibiotic agents in the pipeline and how they can overcome microbial resistance. **Virulence**, v. 4, n. 2, p. 185-191, 2013.

GRANUM, P. E. *Bacillus cereus*. In: **Food Microbiology. Fundamentals and Frontiers**. 2. ed. (Doyle, M., Beuchat, L. and Montville, T., Eds.). ASM Press, Washington, DC, 2001, p. 373-381.

GREAVES, N. S.; ASHCROFT, K. J.; BAGUNEID, M.; BAYAT, A. Current understanding of molecular and cellular mechanisms in fibroplasia and angiogenesis during acute wound healing. **Journal of Dermatological Science**, v. 72, n. 3, p. 206-217, 2013.

GREEN, D. H.; WAKELEY, P. R.; PAGE, A.; BARNES, A.; BACCIGALUPI, L.; RICCA, E.; CUTTING, S. M. Characterization of two *Bacillus* probiotics. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 65, n. 9, p. 4288-4291, 1999.

GREEN, P. **PHRAD documentation**. Disponível em: <http://bozeman.mbt.washington.edu/phrap.docs/phrap.html>. 1996.

GRICE, E. A.; SEGRE, J. A. The skin microbiome. **Nature Reviews. Microbiology**, v. 9, n. 4, p. 244-253, 2011.

GUARDABASSI, L.; SCHWARZ, S.; LLOYD, D. H. Pet animals as reservoirs of antimicrobial-resistant bacteria. **The Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 54, n. 2, p. 321-332, 2004.

GUINEBRETIERE, M. H.; THOMPSON, F. L.; SOROKIN, A.; NORMAND, P.; DAWYNDT, P.; EHLING-SCHULZ, M.; Svensson, B.; Sanchis, V.; Nguyen-The, C.; Heyndrickx, M.; De Vos, P. Ecological diversification in the *Bacillus cereus* Group. **Environmental Microbiology**, v. 10, n. 4, p. 851-865, 2008.

GURLER, N.; OKSUZ, L.; MUFTUOGLU, M.; SARGIN, F. D.; BESISIK, S. K. *Bacillus cereus* catheter related bloodstream infection lymphoblastic leukemia, **Mediterranean Journal of Hematology and Infectious Diseases**, v. 4, n. 1, p. e2012004, 2012.

HARADA, K.; NIINA, A.; SHIMIZU, T.; MUKAI, Y.; KUWAJIMA, K.; MIYAMOTO, T.; KATAOKA, Y. Phenotypic and molecular characterization of antimicrobial resistance in *Proteus mirabilis* isolates from dogs. **Journal of Medical Microbiology**, v. 63, n. 11, p. 1561-1567, 2014.

HEALTH AND CONSUMER PROTECTION DIRECTORATE-GENERAL OF THE EUROPEAN COMMISSION. 2002. Opinion of the Scientific Committee on Animal Nutrition on the criteria for assessing the safety of microorganism resistant to antibiotics of human clinical and veterinary importance, p 1-10. Adopted July 2001, revised 18 April 2002. **Health and Consumer Protection Directorate**, European Commission, Brussels, Belgium.

HEGGERS, P. Defining infection in chronic wounds: methodology. **Journal of Wound Care**, v. 7, n. 9, p. 452-456, 1998.

HEUVELINK, A. E.; VAN HEERWAARDEN, C.; ZWARTKRUIS-NAHUIS, J. T. M.; VAN OOSTEROM, R.; EDINK, K.; VAN DUYNHOVEN, Y. T.; DE BOER, E. *Escherichia coli* O157 infection associated with a petting zoo. **Epidemiology and Infection**, v. 129, n. 2, p. 295-302, 2002.

HILL, K. E.; DAVIES, C. E.; WILSON, M. J.; STEPHENS, P.; HARDING, K. G.; THOMAS, D. W. Molecular analysis of the microflora in chronic venous leg ulceration. **Journal of Medical Microbiology**, v. 52, n.4, p. 365-369, 2003.

HIRAMATSU, K. Vancomycin-resistant *Staphylococcus aureus*: a new model of antibiotic resistance. **The Lancet. Infectious Diseases**, v. 1, n. 3, p. 147-155, 2001.

HOA, N. T.; BACCIGALUPI, L.; HUXHAM, A.; SMERTENKO, A.; VAN, P. H.; AMMENDOLA, S.; RICCA, E.; CUTTING, S. M. Characterization of *Bacillus* Species Used for Oral Bacteriotherapy and Bacterioprophylaxis of Gastrointestinal Disorders. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 66, n. 12, p. 5241-5247, 2000.

HOFFMANN, A. R.; PATTERSON, A. P.; DIESEL, A.; LAWHON, S. D.; LY, H. J.; STEPHENSON, C. E.; MANSELL, J.; STEINER, J. M.; DOWD, S. E.; OLIVRY, T.; SUCHODOLSKI, J. S. The skin microbiome in healthy and allergic dogs. **PLoS One**, v. 9, n. 1, p. e83197, 2014.

HUANG, J. M.; LA RAGIONE, R. M.; NUNEZ, A.; CUTTING, S. M. Immunostimulatory activity of *Bacillus* spores. **FEMS Immunology and Medical Microbiology**, v. 53, n. 2, p. 195-203, 2008.

IKEDA, T.; TAMATE, N.; YAMAGUCHI, K.; MAKINO, S. Mass Outbreak of Food Poisoning Disease Caused by Small Amounts of Staphylococcal Enterotoxins A and H. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 71, n. 5, p. 2793-2795, 2005.

IWATSUKI, K.; YAMASAKI, O.; MORIZANE, S.; OONO, T. Staphylococcal cutaneous infections: invasion, evasion and aggression. **Journal of Dermatological Science**, v. 42, n. 3, p. 203-214, 2006.

JACOBSEN, S. M.; SHIRTLIFF, M. E. *Proteus mirabilis* biofilms and catheter-associated urinary tract infections. **Virulence**, v. 2, n. 5, p. 460-465, 2011.

JARP, J. Classification of coagulase-negative staphylococci isolated from bovine clinical and subclinical mastitis. **Veterinary Microbiology**, v. 27, n. 2, p. 151-158, 1991.

JAY-RUSSELL, M.; HAKE, A. F.; BENGSON, Y.; THIPTARA, A.; NGUYEN, T. Prevalence and characterization of *Escherichia coli* and salmonella strains isolated from stray dog and coyote feces in a major leafy greens production region at the United States-Mexico Border. **PLoS One**, v. 9, n. 11, p. 1-14, 2014.

JEßBERGER, N.; KREY, V. M.; RADEMACHER, C.; BÖHM, M. E.; MOHR, A.K.; EHLING-SCHULZ, M.; SCHERER, S.; MÄRTLBAUER, E. From genome to toxicity: a combinatory approach highlights the complexity of enterotoxin production in *Bacillus cereus*. **Frontiers in Microbiology**, v. 6, p. 1-15, 2015.

JETT, B. D.; HUYCKE, M. M.; GILMORE, M. S. Virulence of enterococci. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 7, n. 4, p. 462-478, 1994.

KINGSLEY, A. The wound infection continuum and its application to clinical practice. **Ostomy/Wound Management**, v. 49, n. 7, p. 1-7, 2003.

KOCH, S.; HUFNAGEL, M.; THEILACKER, C.; HUEBNER, J. Enterococcal infections: host response, therapeutic, and prophylactic possibilities. **Vaccine**, v. 22, n. 7, p. 822-830, 2004.

KORTING, H. C.; SCHÖLLMANN, C.; WHITE, R. J. Management of minor acute cutaneous wounds: importance of wound healing in a moist environment, **Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology**, v. 25, n. 2, p. 130-137, 2011.

KROGH, H. V.; KRISTENSEN, S. A study of skin diseases in dogs and cats. VI. Microflora of the major canine pyodermas. **Nordisk Veterinaermedicin**, v. 33, n. 1, p. 17-22, 1981.

KÜHN, I.; IVERSEN, A.; BURMAN, L. G.; OLSSON-LILJEQUIST, B.; FRANKLIN, A.; FINN, M.; AARESTRUP, F.; SEYFARTH, A. M.; BLANCH, A. R.; VILANOVA, X.; TAYLOR, H.; CAPLIN, J.; MORENO, M. A.; DOMINGUEZ, L.; HERRERO, I. A.; MÖLLBY, R. Comparison of enterococcal populations in animals, humans, and the environment - a European study. **International Journal of Food Microbiology**, v. 88, n. 2-3, p. 133-145, 2003.

KWON, T.; CHO, S. Draft genome sequence of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157 NCCP15739, isolated in the Republic of Korea. **Genome Announcements**, v. 3, n. 3, p. e00522-15, 2015.

LAVIGNE, J. -P.; SOTTO, A.; DUNYACH-REMY, C.; LIPSKY, B. A. New Molecular Techniques to Study the Skin Microbiota of Diabetic Foot Ulcers. **Advances in Wound Care**, v. 4, n. 1, p. 38-49, 2015.

LER, S. G.; LEE, F.K.; GOPALAKRISHNAKONE, P. Trends in Detection of Warfare Agents. Detection Methods for Ricin, Staphylococcal Enterotoxin B and T-2 Toxin. **Journal of Chromatography. A.**, v. 1133, n. 1-2, p. 1-12, 2006.

LI, J.; CHEN, J.; KIRSNER, R. Pathophysiology of acute wound healing, **Clinics in Dermatology**, v. 25, n. 1, p. 9-18, 2007.

LIVERMORE, D. M.; WOODFORD, N. The beta-lactamase threat in *Enterobacteriaceae*, *Pseudomonas* and *Acinetobacter*. **Trends in Microbiology**, v. 14, n. 9, p. 413-420, 2006.

LIVERMORE, D. M. Beta-lactamases in laboratory and clinical resistance. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 8, n. 4, p. 557-584, 1995.

LLOYD, D. H. Reservoirs of antimicrobial resistance in pet animals. **Clinical Infectious Diseases**, v. 45, n. 2, p. S148-S152, 2007.

LÖFMARK, S.; EDLUND, C.; NORD, C. E. Metronidazole is still the drug of choice for treatment of anaerobic infections. **Clinical Infectious Diseases**, v. 50, n. 1, p. S16-S23, 2010.

LOWY, F. D. Staphylococcus aureus infections. **The New England Journal of Medicine**, v. 339, n. 8, p. 520-532, 1998.

LUCROY, M. D.; EDWARDS, B. F.; MADEWELL, B. R. Low-Intensity laser light-induced closure of a chronic wound in a dog. **Veterinary Surgery**, v. 28, n. 4, p. 292-295, 1999.

LUND, T.; DE BUYSER, M. -L.; GRANUM, P. E. A new cytotoxin from *Bacillus cereus* that may be cause necrotic enteritis. **Molecular Microbiology**, v. 38, n. 2, p. 254-261, 2000.

LUND, T.; GRANUM, P. E. Characterisation of a non-haemolytic enterotoxin complex from *Bacillus cereus* isolated after a foodborne outbreak. **FEMS Microbiology Letters**, v. 141, n. 2-3, p. 151-156, 1996.

MADEC, J. Y.; POIREL, L.; SARAS, E.; GOURGUECHON, A.; GIRLICH, D.; NORDMANN, P.; HAENNI, M. Non-ST131 *Escherichia coli* from cattle harbouring human-like *bla*CTX-M-15-carrying plasmids. **The Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 67, n. 3, p. 578-581, 2012.

MANZANO, M.; GIUSTO, C.; IACUMIN, L.; CANTONI, C.; COMI, G. A molecular method to detect *Bacillus cereus* from a coffee concentrate sample used in industrial preparations. **Journal of Applied Microbiology**, v. 95, n. 6, p. 1361-1366, 2003.

MANZUR, A.; TUBAU, F.; PUJOL, M.; CALATAYUD, L.; DOMINGUEZ, M. A.; PEÑA, C.; SORA, M.; GUDIOL, F.; ARIZA, J. Nosocomial outbreak due to extended-spectrum-beta-lactamase-producing *Enterobacter cloacae* in a cardiothoracic intensive care unit. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 45, n. 8, p. 2365-2369, 2007.

MARTIN, R.; MIQUEL, S.; LANGELLA, P.; BERMÚDEZ-HUMARÁN, L. G. The role of metagenomics in understanding the human microbiome in health and disease. **Virulence** v. 5, n. 3, p. 413-423, 2014.

MAY, E. R. Bacterial skin diseases: Current thoughts on pathogenesis and management. **Veterinary Clinics: Small Animal Practice**, v. 36, n. 1, p. 185-202, 2006.

MAZZA, P.; ZANI, F.; MARTELLI, P. Studies on the antibiotic resistance of *Bacillus subtilis* strains used in oral bacteriotherapy. **Bollettino Chimico Farmaceutico**, v. 131, n. 11, p. 401-408, 1992.

McDANIEL, T. K.; KAPER, J. B. A cloned pathogenicity island from enteropathogenic *Escherichia coli* confers the attaching and effacing phenotype on *E. coli* K12. **Molecular Microbiology**, v. 23, n. 2, p. 399-407, 1997.

McGUCKIN, M.; GOLDMAN, R.; BOLTON, L.; SALCIDO, R. The clinical relevance of microbiology in acute and chronic wounds. **Advances in Skin & Wound Care**, v. 16, n. 1, p. 12-23, 2003.

MENKE, N. B.; WARD, K. R.; WITTEN, T. M.; BONCHEV, D. G.; DIEGELMANN, R. F. Impaired wound healing. **Clinics in Dermatology**, v. 25, n. 1, p. 19-25, 2007.

MEYER, E.; GASTMEIER, P.; KOLA, A.; SCHWAB, F. Pet animals and foreign travel are risk factors for colonisation with extended-spectrum beta-lactamase-producing *Escherichia coli*. **Infection**, v. 40, n. 6, p. 685-687, 2012.

MEYERS, B.; SCHOEMAN, J. P.; GODDARD, A.; PICARD J. The bacteriology and antimicrobial susceptibility of infected and non- infected dog bite wounds: fifty cases. **Veterinary Microbiology**, v. 127, n. 3-4, p. 360-368, 2008.

MIZRAHI-MAN, O.; DAVENPORT, E. R.; GILAD, Y. Taxonomic classification of bacterial 16S rRNA genes using short sequencing reads: evaluation of effective study designs. **PLoS One**, v. 8, n. 1, p. 1-14, 2013.

MOHAWK, K.; O'BRIEN, A. Mouse models of *Escherichia coli* O157:H7 infection and shiga toxin injection. **Journal of Biomedicine and Biotechnology**, v. 2011, n. ID258185, p. 17, 2011.

MORANDI, S.; BRASCA, M.; ANDRIGHETTO, C.; LOMBARDI, A.; LODI, R. Phenotypic and genotypic characterization of *Staphylococcus aureus* strains from italian dairy products. **International Journal of Microbiology**, v. 2009, p. 501362:1-501362:7, 2009.

MORRIS, C. A.; CONWAY, H. D.; EVERALL, P. H. Food-Poisoning Due to Staphylococcal Enterotoxin E. **Lancet**, v. 2, n. 7791, p. 1375-1376, 1972.

MOURO, S.; VILELA, C. L.; NIZA, M. M. Clinical and bacteriological assessment of dog-to-dog bite wounds. **Veterinary Microbiology**, v. 144, n. 1-2, p. 127-132, 2010.

MTENGA, A. B.; KASSIM, N.; LEE, W. G.; SHIM, W. B.; YOON, Y.; CHUNG, D. H. Resistance of *Bacillus cereus* and its enterotoxin genes in ready-to-eat foods to γ -irradiation. **Food Science and Biotechnology**, v. 21, n. 2, p. 443-452, 2012.

MUNOZ-PRICE, L. S.; WEINSTEIN, R. A. Acinetobacter infection. **The New England Journal of Medicine**, v. 358, n. 12, p. 1271-1281, 2008.

MURAKAMI, K.; MINAMIDE, W.; WADA, K.; NAKAMURA, E.; TERAOKA, H.; WATANABE, S. Identification of methicillin-resistant strains of staphylococci by polymerase chain reaction. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 29, n. 10, p. 2240-2244, 1991.

NAM, H.; SEO, H. S.; BANG, J.; KIM, H.; BEUCHAT, L. R.; RYU, J. H. Efficacy of gaseous chlorine dioxide in inactivating *Bacillus cereus* spores attached to and in a biofilm on stainless steel. **International Journal of Food Microbiology**, v. 188, p. 122-127, 2014.

NERCESSIAN, O.; FOUQUET, Y.; PIERRE, C.; PRIEUR, D.; JEANTHON, C. Diversity of Bacteria and Archaea associated with a carbonate-rich metalliferous sediment sample from the Rainbow vent field on the Mid-Atlantic Ridge. **Environmental Microbiology**, v. 7, n. 5, p. 698-714, 2005.

NGAMWONGSATIT, P.; BUASRI, W.; PIANARIYANON, P.; PULSRIKARN, C.; OHBA, M.; ASSAVANIG, A.; PANBANGRED, W. Broad distribution of enterotoxin genes (hblCDA, nheABC, cytK, and entFM) among *Bacillus thuringiensis* and *Bacillus cereus* as shown by novel primers. **International Journal of Food Microbiology**, v. 121, n. 3, p. 352-356, 2008.

NILSSON, I. -M.; HARTFORD, O.; FOSTER, T.; TARKOWSKI, A. Alpha-Toxin and Gamma-Toxin Jointly Promote *Staphylococcus aureus* Virulence in Murine Septic Arthritis. **Infection and Immunity**, v. 67, n. 3, p. 1045-1049, 1999.

NOVERR, M. C.; HUFFNAGLE, G. B. The 'microflora hypothesis' of allergic diseases. **Clinical and Experimental Allergy**, v. 35, n. 12, p. 1511-1520, 2005.

OH, J.; BYRD, A. L.; DEMING, C.; CONLAN, S.; NISC COMPARATIVE SEQUENCING PROGRAM; KONG, H. H.; SEGRE, J. A. Biogeography and individuality shape function in the human skin metagenome. **Nature. International Journal of Science**, v. 514, p. 59-64, 2014.

OH, J.; CONLAN, S.; POLLEY, E. C.; SEGRE, J. A.; KONG, H. H. Shifts in human skin and nares microbiota of healthy children and adults. **Genome Medicine**, v. 4, n. 10, p. 77, 2012.

O'HARA, C. M.; BRENNER, F. W.; MILLER, J. M. Classification, identification, and clinical significance of *Proteus*, *Providencia*, and *Morganella*. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 13, n. 4, p. 534-546, 2000.

OMAR, B. N.; CASTRO, A.; LUCAS, R.; ABRIOUEL, H.; YOUSIF, N. M. K.; FRANZ, C. M.; HOLZAPFEL, W. H.; PEREZ-PULIDO, R.; MARTINEZ-CANÁMERO, M.; GÁLVEZ, A. Functional and safety aspects of enterococci isolated from different Spanish foods. **Systematic and Applied Microbiology**, v. 27, n.1, p. 118-130, 2004.

OSWALD, E.; SCHMIDT, H.; MORABITO, S.; KARCH, H.; MARCHES, O.; CAPRIOLI, A. Typing of intimin genes in human and animal enterohemorrhagic and enteropathogenic *Escherichia coli*: characterization of a new intimin variant. **Infection and Immunity**, v. 68, n. 1, p. 64-71, 2000.

OVINGTON, L. Bacterial Toxins and Wound Healing. **Ostomy/Wound Management**, v. 49, n. 7A, p. 8-12, 2003.

PAAUW, A.; CASPERS, M. P. M.; LEVERSTEIN-VAN HALL, M. A.; SCHUREN, F. H. J.; MONTIJN, R. C.; VERHOEF, J.; FLUIT, A. C. Identification of resistance and virulence factors in an epidemic *Enterobacter hormaechei* outbreak strain. **Microbiology**, v. 155, n.15, p. 1478-1488, 2009.

PANIAGUA-CONTRERAS, G.; SÁINZ-ESPUÑES, T.; MONROY-PÉREZ, E.; RODRÍGUEZ-MOCTEZUMA, J. R.; ARENAS-ARANDA, D.; NEGRETE-ABASCAL, E.; VACA, S. Virulence markers in *Staphylococcus aureus* strains isolated from hemodialysis catheters of mexican patients. **Advances in Microbiology**, v. 2, p. 476-487, 2012.

PAPADOGIANNAKIS, E.; PERIMENI, D.; VELONAKIS, E.; KONTOS, V.; VATOPOULOS, A. *Providencia stuartii* infection in a dog with severe skin ulceration and cellulitis. **The Journal of Small Animal Practice**, v. 48, n. 6, p. 343-345, 2007.

PATERSON, D. L. Resistance in gram-negative bacteria: Enterobacteriaceae. **The American Journal of Medicine**, v. 119, n. 6, p. S20-S28, 2006.

PATERSON, D. L.; HUJER, K. M.; HUJER, A. M.; YEISER, B.; BONOMO, M. D.; RICE, L. B.; BONOMO, R. A.; International Klebsiella Study Group. Extended-Spectrum beta-Lactamases in Klebsiella pneumoniae bloodstream isolates from seven countries: dominance and widespread prevalence of SHV- and CTX-M-type beta-lactamases. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 47, n. 11, p. 3554-3560, 2003.

PATERSON, D. L., MULAZIMOGLU, L., CASELLAS, J. M., KO, W. C., GOOSSENS, H., VON GOTTBURG, A., MOHAPATRA, S., TRENHOLME, G. M., KLUGMAN, K. P., MCCORMACK, J. G., YU, V. L. Epidemiology of ciprofloxacin resistance and its relationship to extended-spectrum beta-lactamase production in Klebsiella pneumonia isolates causing bacteremia. **Clinical Infectious Diseases**, v. 30, n. 3, p. 473-478, 2000.

PEDERSEN, K.; PEDERSEN, K.; JENSEN, H.; FINSTER, K.; JENSEN, V. F.; HEUER, O. E. Occurrence of antimicrobial resistance in bacteria from diagnostic samples from dogs. **The Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 60, n. 4, p. 775-781, 2007.

PELEG, A. Y.; SEIFERT, H.; PATERSON, D. L. *Acinetobacter baumannii*: emergence of a successful pathogen. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 21, n. 3, p. 538-582, 2008.

PETERSEN, A. D.; WALKER, R. D.; BOWMAN, M. M.; SCHOTT, H. C.; ROSSER, E. J. JR. Frequency of isolation and antimicrobial susceptibility patterns of *Staphylococcus intermedius* and *Pseudomonas aeruginosa* isolates from canine skin and ear samples over a 6-year period (1992-97). **Journal of the American Animal Hospital Association**, v. 38, n. 5, p. 407-413, 2002.

PINCHUK, I. V.; BESWICK, E. J.; REYES, V. E. Staphylococcal Enterotoxins. **Toxins** v. 2, n. 8, p. 2177-2197, 2010.

PODSCHUN, R.; ULLMANN, U. *Klebsiella* spp. as nosocomial pathogens: epidemiology, taxonomy, typing methods, and pathogenicity factors. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 11, n. 4, p. 589-603, 1998.

PRESCOTT, J. F.; HANNA, W. J.; REID-SMITH, R.; DROST, K. Antimicrobial drug use and resistance in dogs. **The Canadian Veterinary Journal**, v. 43, n. 2, p. 107-116, 2002.

PRICE, L. B.; LIU, C. M.; MELENDEZ, J. H.; FRANKEL, Y. M.; ENGELTHALER, D.; AZIZ, M.; BOWERS, J.; RATTRAY, R.; RAVEL, J.; KINGSLEY, C.; KEIM, P. S.; LAZARUS, G. S.; ZENILMAN, J. M. Community analysis of chronic wound bacteria using 16S rRNA gene-based pyrosequencing: impact of diabetes and antibiotics on chronic wound microbiota. **PLoS One**, v. 4, n. 7, p. e6462, 2009.

RHOADS, D. D.; COX, S. B.; REES, E. J.; SUN, Y.; WOLCOTT, R. D. Clinical identification of bacteria in human chronic wound infections: culturing vs. 16S ribosomal DNA sequencing. **BMC Infectious Diseases**, v. 12, p. 321, 2012.

RIBEIRO, V. B.; ZAVASCKI, A. P. NODARI, C. S.; SANDRI, A. M.; SILVA, M. P.; CAMPOS, J. C.; SAMPAIO, J. L. M.; BARTH, A. L. Detection of *blaKPC-2* in a carbapenem-resistant *Kluyvera georgiana*. **The Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 67, n. 11, p. 2776-2777, 2012.

ROBSON, M. C. Wound infection, a failure of wound healing caused by an imbalance of bacteria. **The Surgical Clinics of North America**, v. 77, n. 3, p. 637- 650, 1997.

RODAS, C.; MAMANI, R.; BLANCO, J.; BLANCO, J. E.; WIKLUND, G.; SVENNERHOLM, A. M.; SJÖLING, A.; INIGUEZ, V. Enterotoxins, colonization factors, serotypes and antimicrobial resistance of enterotoxigenic *Escherichia coli* (ETEC) strains isolated from hospitalized children with diarrhea in Bolivia. **The Brazilian Journal of Infectious Diseases**, v.15, n.2, p. 132-137, 2011.

RONQUIST, F.; HUELSENBECK, J. P., 2003. MrBayes 3: Bayesian phylogenetic inference under mixed models. **Bioinformatics**, v. 19, n. 12, p. 1572-1574, 2003.

RICHMOND, N. A.; MADERAL, A. D.; VIVAS, A. C. Evidence- based management of common chronic lower extremity ulcers. **Dermatologic Therapy**, v. 26, n. 3, p. 187-196, 2013.

RUBIN, J. E.; PITOUT, J. D. D. Extended-spectrum b-lactamase, carbapenemase and AmpC producing Enterobacteriaceae in companion animals. **Veterinary Microbiology**, v. 170, n. 1-2, p. 10-18, 2014.

RUBIN, J. E.; BALL, K. R.; CHIRINO-TREJO, M. Antimicrobial susceptibility of *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus pseudintermedius* isolated from various animals. **The Canadian Veterinary Journal**, v. 52, n. 2, p. 153-157, 2011.

RUDKIN, J. K.; MCLOUGHLIN, R. M.; PRESTON, A.; MASSEY, R. C. Bacterial toxins: Offensive, defensive, or something else altogether? **PLoS Pathogens**, v. 13, n. 9, p. e1006452, 2017.

RUSCHER, C.; LÜBKE-BECKER, A.; WLEKLINSKI, C. G.; SOBA, A.; WIELER, L. H.; WALTHER, B. Prevalence of methicillin-resistant *Staphylococcus pseudintermedius* isolated from clinical samples of companion animals and equidae. **Veterinary Microbiology**, v. 136, n. 1-2, p. 197-201, 2009.

SALYERS, A. A.; GUPTA, A.; WANG, Y. Human intestinal bacteria as reservoirs for antibiotic resistance genes. **Trends in Microbiology**, v. 12, n. 9, p. 412-416, 2004.

SARRIA, J. C.; VIDAL, A. M.; KIMBROUGH, R. C. III. Infections caused by *Kluyvera* species in humans. **Clinical Infectious Diseases**, v. 33, n. 7, p. e69-e74, 2001.

SASAKI, T.; TSUBAKISHITA, S.; TANAKA, Y.; SAKUSABE, A.; OHTSUKA, M.; HIROTAKI, S.; Kawakami, T.; Fukata, T.; HIRAMATSU, K. Multiplex-PCR Method for Species Identification of Coagulase-Positive *Staphylococci*. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 48, n. 3, p. 765-769, 2010.

SCALLAN, E.; HOEKSTRA, R. M.; ANGULO, F. J.; TAUXE, R. V.; WIDDOWSON, M. -A.; ROY, S. L.; JONES, J. L.; GRIFFIN, P. M. Foodborne Illness Acquired in the United States-Major Pathogens. **Emerging Infectious Diseases**, v. 17, n. 1, p. 7-15, 2011.

SCHMITZ, F. J.; MACKENZIE, C. R.; GEISEL, R.; WAGNER, S.; IDEL, H.; VERHOEF, J.; HADDING, U.; HEINZ, H. P. Enterotoxin and toxic shock syndrome toxin-1 production of methicillin resistant and methicillin sensitive *Staphylococcus aureus* strains. **European Journal of Epidemiology**, v. 13, n. 6, p. 699-708, 1997.

SCHULTZ, G. S.; SIBBALD, R. G.; FALANGA, V.; AYELLO, E. A.; DOWSETT, C.; HARDING, K.; ROMANELLI, M.; STACEY, M. C.; TEOT, L.; VANSCHIEDT, W. Wound bed preparation: a systematic approach to wound management. **Wound Repair and Regeneration**, v. 11, suppl.1, p. S1-S28, 2003.

SCOTT, D. W.; MILLER, W. H.; GRIFFIN, C. E. **Bacterial skin diseases. Muller and Kirk's Small Animal Dermatology**, 6th edn. Philadelphia, PA: W.B. Saunders. p. 274-335, 2001.

SEKI, M.; GOTOH, K.; NAKAMURA, S.; AKEDA, Y.; YOSHII, T.; MIYAGUCHI, S.; INOHARA H.; HORII, T.; OISHI, K.; IIDA, T.; TOMONO, K. Fatal sepsis caused by an unusual *Klebsiella* species that was misidentified by an automated identification system. **Journal of Medical Microbiology**, v. 62, n. 5, 801-803, 2013.

SEN, C. K.; GORDILLO, G. M.; ROY, S.; KIRSNER, R.; LAMBERT, L.; HUNT, T. K.; GOTTRUP, F.; GURTNER, G. C.; LONGAKER, M. T. Human skin wounds: a major and snowballing threat to public health and the economy. **Wound Repair and Regeneration**, v. 17, n. 6, p. 763-771, 2009.

SENESI, S.; CELANDRONI, F.; TAVANTI, A.; GHELARDI, E. Molecular characterization and identification of *Bacillus clausii* strains marketed for use in oral bacteriotherapy. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 67, n. 2, p. 834-839, 2001.

SEOL, B.; NAGLIC, T.; MADIC, J.; BEDEKOVIĆ, M. In vitro antimicrobial susceptibility of 183 *Pseudomonas aeruginosa* strains isolated from dogs to selected antipseudomonal agents. **Journal of Veterinary Medicine. B, Infectious Diseases and Veterinary Public Health**, v. 49, n. 4, p. 188-92, 2002.

SEYEDJAVADI, S. S.; GOUDARZI, M.; SABZEHALI, F. Relation between *bla*_{TEM}, *bla*_{SHV} and *bla*_{CTX-M} genes and acute urinary tract infections. **Journal of Acute Disease**, v. 5, n. 1, p. 71-76, 2016.

SIBBALD, R. G.; ORSTED, H.; SCHULTZ, G. S.; COUTTS, P.; KEAST, D. Preparing the wound bed 2003: focus on infection and inflammation. **Ostomy/ Wound Management**, v. 49, n. 11, p. 24-51, 2003.

SORUM, H.; SUNDE, M. Resistance to antibiotics in the normal flora of animals. **Veterinary Research**, v. 32, n. 3-4, p. 227-241, 2001.

SOUZA-POLLO, A.; LACERDA, L. C. C.; CARBONI, R. C. D.; AMARAL, L. A. Epidemiologia molecular e diversidade genética de microrganismos. In: BASTOS, C. R.; DESIDERIO, J. A.; LEMOS, M. V. F.; AUGUSTO, M. L. V. **Tópicos Especiais em Genética Aplicada**. 1. ed. Jaboticabal: Funep, 2016. cap. 5, p. 41-52.

SPELLBERG, B.; GILBERT, D. N. The future of antibiotics and resistance: a tribute to a career of leadership by John Bartlett. **Clinical Infectious Diseases**, v. 59, suppl. 2, p. S71-S75, 2014.

SRINIVASAN, R.; KARAOZ, U.; VOLEGOVA, M.; MACKICHAN, J.; KATO-MAEDA, M.; MILLER, S.; NADARAJAN, R.; BRODIE, E. L.; LYNCH, S. V. Use of 16S rRNA gene for identification of a broad range of clinically relevant bacterial pathogens. **PLoS One**, v. 10, n.2, p. 1-22, 2015.

STENFORS ARNESEN, L. P.; FAGERLUND, A.; GRANUM, P. E. From soil to gut: *Bacillus cereus* and its food poisoning toxins. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 32, n. 4, p. 579-606, 2008.

STEPHENS, P.; WALL, I. B.; WILSON, M. J.; HILL, K. E.; DAVIES, C. E.; HILL, C. M.; HARDING, K. G.; THOMAS, D. W. Anaerobic cocci populating the deep tissues of chronic wounds impair cellular wound healing responses in vitro. **The British Journal of Dermatology**, v. 148, n. 3, p. 456-466, 2003.

STOCK, I.; WIEDEMANN, B. Natural antibiotic susceptibility of *Klebsiella pneumoniae*, *K. oxytoca*, *K. planticola*, *K. ornithinolytica* and *K. terrigena* strains. **Journal of Medical Microbiology**, v. 50, n. 5, p. 396-406, 2001.

STÖVER, B. C.; MÜLLER, K. F. TreeGraph 2: Combining and visualizing evidence from different phylogenetic analyses. **BMC Bioinformatics**, v. 11, p. 7, 2010.

SWAIM, S. F.; HENDERSON, R. A.; PIDGEON, R. S. **Small Animal Wound Management**. Lea & Febiger, p. 255, 1990.

TALLMAN, P.; MUSCARE, E.; CARSON, P.; EAGLSTEIN, W. H.; FALANGA, V. Initial rate of healing predicts complete healing of venous ulcers. **Archives of Dermatology**, v. 133, n. 10, p. 1231-1234, 1997.

TATARA, R.; NAGAI, T.; SUZUKI M.; FUJIWARA, S.; NORIZUKI, M.; MUROI, K.; OZAWA, K. Sepsis and meningoenophalitis caused by *Bacillus cereus* in a patient with myelodysplastic syndrome. **Internal Medicine**, v. 52, n. 17, p. 1987-1990, 2013.

THAENTHANE, S.; WONG, A. C. L.; PANBANGRED, W. Phenotypic and genotypic comparisons reveal a broad distribution and heterogeneity of hemolysin BL genes among *Bacillus cereus* isolates. **International Journal of Food Microbiology**, v. 105, n. 2, p. 203-212, 2005.

THOMPSON, M. F.; LITSTER, A. L.; PLATELL, J. L.; TROTT, D. J. Canine bacterial urinary tract infections: New developments in old pathogens. **The Veterinary Journal**, v. 190, n. 1, p. 22-27, 2011.

TIWARI, R.; CHAKRABORTY, S.; DHAMA, K.; RAJAGUNALAN, S.; SINGH, S. V. Antibiotic resistance - an emerging health problem: causes, worries, challenges and solutions – a review. **Internacional Journal of Current Research**, v. 5, n. 7, p. 1880-1892, 2013.

TORRES, S.; CLAYTON, J. B.; DANZEISEN, J. L.; WARD, T.; HUANG, H.; KNIGHTS, D.; JOHNSON, T. J. Diverse bacterial communities exist on canine skin and are impacted by cohabitation and time. **PeerJ**, v. 5, p. e3075, 2017.

URUMOVA, V.; CHAPRAZOV, T. S.; LYUTSKANOV, M.; BORISOV, I. Microbiological analyses of canine infected wounds. **Revue de Médecine Vétérinaire**, v. 163, n. 4, p. 201-205, 2012.

VARTOUKIAN, S. R.; PALMER, R. M.; WADE, W. G. Strategies for culture of 'unculturable' bacteria. **FEMS Microbiology Letters**, v. 309, n. 1, p. 1-7, 2010.

VENTOLA, C. L. The Antibiotic Resistance Crisis: Part 1: Causes and Threats. **Pharmacy and Therapeutics**, v. 40, n. 4, p. 277-283, 2015.

VERGIS, E. N.; SHANKAR, N.; CHOW, J. W.; HAYDEN, M. K.; SNYDMAN, D. R.; ZERVOS, M. J.; LINDEN, P. K.; WAGENER, M. M.; MUDER, R. R. Association between the presence of enterococcal virulence factors gelatinase, hemolysin, and enterococcal surface protein and mortality among patients with bacteremia due to *Enterococcus faecalis*. **Clinical Infectious Disease**, v. 35, n. 5, p. 570-575, 2002.

VINCZE, S.; STAMM, I.; KOPP, P. A.; HERMES, J.; ADLHOCH, C.; SEMMLER, T.; WIELER, L. H.; LÜBKE-BECKER, A.; WALTHER, B. Alarming Proportions of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) in Wound Samples from Companion Animals, Germany 2010-2012. **PLoS One**, v. 9, n. 1, p. e85656, 2014.

WALKER-YORK-MOORE, L.; MOORE, S. C.; FOX, E. M. Characterization of Enterotoxigenic *Bacillus cereus sensu lato* and *Staphylococcus aureus* Isolates and Associated Enterotoxin Production Dynamics in Milk or Meat-Based Broth. **Toxins**, v. 9, n. 7, p. 225, 2017.

WALL, I. B.; DAVIES, C. E.; HILL, K. E.; WILSON, M. J.; STEPHENS, P.; HARDING, K. G.; THOMAS, D. W. Potential role of anaerobic cocci in impaired human wound healing. **Wound Repair and Regeneration**, v. 10, n. 6, p. 346-353, 2002.

WALTHER, B.; HERMES, J.; CUNY, C.; WIELER, L. H.; VINCZE, S.; ABOU ELNAGA, Y.; STAMM, I.; KOPP, P. A.; KOHN, B.; WITTE, W.; JANSEN, A.; CONRATHS, F. J.; SEMMLER, T.; ECKMANNS, T.; LÜBKE-BECKER, A. Sharing more than friendship nasal colonization with coagulase-positive staphylococci (CPS) and co-habitation aspects of dogs and their owners. **PLoS One**, v. 7, n. 4, p. e35197, 2012.

WANKE, I.; STEFFEN, H.; CHRIST, C.; KRISMER, B.; GOTZ, F.; PESCHEL, A.; SCHALLER, M.; SCHITTEK, B. Skin commensals amplify the innate immune response to pathogens by activation of distinct signaling pathways. **The Journal of Investigative Dermatology**, v. 131, n. 2, p. 382-390, 2011.

WAYNE, A.; MCCARTHY, R.; LINDENMAYER, J. Therapeutic antibiotic use patterns in dogs: Observations from a veterinary teaching hospital. **The Journal of Small Animal Practice**, v. 52, n. 6, p. 310-318, 2011.

WEESE, J. S. Antimicrobial resistance in companion animals. **Animal Health Research Reviews**, v. 9, n. 2, p. 169-176, 2008.

WIJMAN, J. G.; DE LEEUW, P. P.; MOEZELAAR, R.; ZWIETERING, M. H.; ABEE, T. Air-liquid interface biofilms of *Bacillus cereus*: formation, sporulation, and dispersion. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 73, n. 5, p. 1481-1488, 2007.

WILGUS, T. A. Growth factor–extracellular matrix interactions regulate wound repair. **Advances in Wound Care**, v.1, n. 16, p. 249-254, 2012.

WITTE, W. Ecological impact of antibiotic use in animals on different complex microflora: environment. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 14, n. 4, p. 321-325, 2000.

WIE, S-H. Clinical significance of *Providencia* bacteremia or bacteriuria. **The Korean Journal of Internal Medicine**, v. 30, n. 2, 167-169, 2015.

WILSON, W. D.; MADIGAN, J. E. Comparison of bacteriologic culture of blood and necropsy specimens for determining the cause of foal septicemia: 47 cases. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 195, n. 12, 1759-1763, 1989.

WINDAHL, U.; BENGTSSON, B.; NYMAN, A. N.; HOLST, B. S. The distribution of pathogens and their antimicrobial susceptibility patterns among canine surgical wound infections in Sweden in relation to different risk factors. **Acta Veterinaria Scandinavica**, v. 57, n. 1, p. 11, 2015.

WOO, P. C.; LAU, S. K.; TENG, J. L.; TSE, H.; YUEN, K. Y. Then and now: use of 16S rRNA gene sequencing for bacterial identification and discovery of novel bacteria in clinical microbiology laboratories. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 14, n. 10, p. 908-934, 2008.

WOODFORD, N. Biological counterstrike: antibiotic resistance mechanisms of Gram-positive cocci. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 11, Suppl 3, p. 2-21, 2005.

YE, Y.; LI, J. B.; YE, D. Q.; JIANG, Z. J. Enterobacter bacteremia: clinical features, risk factors for multiresistance and mortality in a Chinese University Hospital. **Infection**, v. 34, n. 5, p. 252-257, 2006.

YOH, M.; MATSUYAMA, J.; OHNISHI, M.; TAKAGI, K.; MIYAGI, H.; MORI, K.; PARK, K. S.; ONO, T.; HONDA, T. Importance of *Providencia* species as a major cause of travellers' diarrhoea. **Journal of Medical Microbiology**, v. 54, n. 11, p. 1077-1082, 2005.

ZAMANKHAN MALAYERI, H.; JAMSHIDI, S.; ZAHRAEI SALEHI, T. Identification and antimicrobial susceptibility patterns of bacteria causing otitis externa in dogs. **Veterinary Research Communications**, v. 34, n. 5, p. 435-444, 2010.

Anexo 1. Oligonucleotídeos iniciadores utilizados para identificar espécies de *Staphylococcus* ssp., toxinas de *Staphylococcus aureus*, a espécie *Bacillus cereus* e suas toxinas e enterotoxinas de *Escherichia coli*.

| Espécie/gene | Oligonucleotídeo/ Sequência (5' → 3') | Tamanho (pb) | Ref. |
|------------------------------|--|--------------|------|
| <i>Staphylococcus aureus</i> | auF3 - TCGCTTGCTATGATTGTGG aunucR - GCCAATGTTCTACCATAGC | 359 | |
| <i>S. intermedius</i> | inF CATGTCATATTATTGCGAATGA inR3 AGGACCATCACCATTGACATATTGAAACC | 430 | |
| <i>S. schleiferi</i> | schF AATGGCTACAATGATAATCACTAA schR CATATCTGTCTTTTCGGCGCG | 526 | |
| <i>S. delphini group A</i> | deaF TGAAGGCATATTGTAGAACAA deaR CGRTACTTTTCGTTAGGTCTG | 661 | 1 |
| <i>S. delphini group B</i> | debF GGAAGRITTCGTTTTTCCTAGAC debR4 TATGCGATTCAAGAACTGA | 1035 | |
| <i>S. pseudointermedius</i> | pseF2 TRGGCAGTAGGATTCGTTAA pseR5 CTTTTGTGCTYCMTTTTGG | 926 | |
| <i>S. hyicus</i> | hyF1 CATTATATGATTTGAACGTG hyR1 GAATCAATATCGTAAAGTTGC | 793 | |
| <i>S. aureus/sea</i> | TTGCAGGGAACAGCTTTAGGCAATC TGGTGTACCACCCGCACATTGA | 252 | |
| <i>S. aureus/seb</i> | GACATGATGCCTGCACCAGGAGA AACAAATCGTTAAAAACGGCGACACAG | 355 | |
| <i>S. aureus/sec</i> | CCCTACGCCAGATGAGTTGCACA CGCCTGGTGCAGGCATCATATC | 602 | |
| <i>S. aureus/sed</i> | GAAAGTGAGCAAGTTGGATAGATTGCGGCTAG CCGCGCTGTATTTTTCTCCGAGAG | 830 | |
| <i>S. aureus/see</i> | TGCCCTAACGTTGACAACAAGTCCA TCCGTGTAATAATGCCTTGCCTGAA | 532 | 2 |
| <i>S. aureus/seg</i> | TGCTCAACCCGATCCTAAATTAGACGA CCTCTTCCTTCAACAGGTGGAGACG | 117 | |
| <i>S. aureus/seh</i> | CATTCACATCATATGCGAAAGCAGAAG GCACCAATCACCTTTTCTGTGC | 358 | |
| <i>S. aureus/sei</i> | TGGAGGGGCCACTTTATCAGGA TCCATATTCTTTGCCTTACCAGTG | 220 | |
| <i>S. aureus/sej</i> | CTCCCTGACGTTAACTACTAATAACCC TATGGTGGAGTAACACTGCATCAAAA | 432 | |

| Espécie/gene | Oligonucleotídeo/ Sequência (5' → 3') | Tamanho (pb) | Ref. |
|-------------------------------|--|--------------|------|
| <i>S. aureus/tst</i> | AGCCCTGCTTTTACAAAAGGGGAAAA CCAATAACCACCCGTTTTATCGCTTG | 306 | |
| <i>S. aureus/eta</i> | CGCTGCGGACATTCTACATGG TACATGCCCGCCACTTGCTTGT | 676 | |
| <i>S. aureus/etb</i> | GAAGCAGCCAAAAACCCATCGAA TGTTGTCCGCCTTTACCACTGTGAA | 419 | 2 |
| <i>S. aureus/pvl</i> | TGCCAGACAATGAATTACCCCATC TCTGCCATATGGTCCCAACCA | 306 | |
| <i>S. aureus/hlg</i> | TTGGCTGGGGAGTTGAAGCACA CGCCTGCCAGTAGAAGCCATT | 894 | |
| <i>Bacillus cereus</i> | BCFW1 GTTTCTGGTGGTTTACATGG BCRW1 CAACGTATGATTTAATTCCACC | 352 | 3 |
| <i>B. cereus/hblD</i> | GAAACAGGGTCTCATATTCT CTGCATCTTTATGAATATCA | 487 | 4 |
| <i>B. cereus/hblA</i> | GCAAATCTATGAATGCCTA GCATCTGTTTCGTAATGTTTT | 884 | |
| <i>B. cereus/hblC</i> | CCTATCAATACTCTCGCAA TTTCCTTTGTTATACGCTGC | 695 | |
| <i>B. cereus/cytK</i> | CGACGTCACAAGTTGTAACA CGTGTGTAATACCCAGTT | 565 | |
| <i>B. cereus/nheA</i> | TAAGGAGGGGCAAACAGAAG TGAATGCGAAGAGCTGCTTC | 759 | 5 |
| <i>B. cereus/nheB</i> | CAAGCTCCAGTTCATGCGG GATCCCATTGTGTACCATTG | 935 | |
| <i>B. cereus/nheC</i> | ACATCCTTTTGCAGCAGAAC CCACCAGCAATGACCATATC | 618 | |
| <i>B. cereus/entFM</i> | GTTTCGTTTCAGGTGCTGGTAC AGCTGGGCCTGTACGTAATT | 486 | |
| <i>B. cereus/bceT</i> | GACTACATTCACGATTACGCAGAA CTATGCTGACGAGCTACATCCATA | 303 | 6 |
| <i>Escherichia coli/ eaeA</i> | AGGCTTCGTCACAGTTG CCATCGTCACCAGAGGA | 570 | |
| <i>E. coli/ stx1</i> | AGAGCGATGTTACGGTTTTG TTGCCCCCAGAGTGGATG | 388 | 7 |
| <i>E. coli/stx2</i> | TGGGTTTTTCTTCGGTATC GACATTCTGGTTGACTCTCTT | 807 | |

¹ SASAKI et al., 2010; ² PANIAGUA-CONTRERAS et al., 2012; ³ MANZANO et al., 2003; ⁴ THAENTHANE; WONG; PANBANGRED, 2005; ⁵ NGAMWONGSATIT et al., 2008; ⁶ MTEGA et al., 2012; ⁷ CHINA; PIRSON; MAINIL, 1996

Anexo 2. Oligonucleotídeos utilizados para identificação de genes da β -lactamase em enterobactérias (Dallenne et al., 2010).

| PCR | Gene Alvo | Oligonucleotídeo/ sequência 5' → 3' | Tamanho (pb) |
|---|---|---|--------------|
| Multiplex I TEM, SHV e OXA-1- like | Variantes TEM incluindo TEM-1 e TEM-2 | MultiTSO-T_for CATTCCGTGTGCGCCTTATTC MultiTSO-T_rev CGTTCATCCATAGTTGCCTGAC | 800 |
| | Variantes SHV incluindo SHV-1 | MultiTSO-T_for AGCCGCTTGAGCAAATTAAC MultiTSO-T_rev ATCCCGCAGATAAATCACCCAC | 713 |
| | OXA-1, OXA-4 e OXA-30 | MultiTSO-T_for GGCACCAGATTCAACTTTCAAG MultiTSO-T_rev GACCCCAAGTTTCCTGTAAGTG | 564 |
| Multiplex II CTX-M grupo 1, grupo 2 e grupo 9 | Variantes CTX-M grupo 1 incluindo CTX-M-1, CTX-M- 3 e CTX-M-15 | MultiCTXMGp1_for TTAGGAARTGTGCCGCTGYA MultiCTXMGp1-2_rev CGATATCGTTGGTGGTRCCAT | 688 |
| | Variantes CTX-M grupo 2 incluindo CTX-M-2 | MultiCTXMGp2_for CGTTAACGGCACGATGAC MultiCTXMGp1-2_rev CGATATCGTTGGTGGTRCCAT | 404 |
| | Variantes CTX-M grupo 9 incluindo CTX-M-9 e CTX- M-14 | MultiCTXMGp9_for TCAAGCCTGCCGATCTGGT MultiCTXMGp9_rev TGATTCTCGCCGCTGAAG | 561 |
| CTX-M grupo 8/25 | CTX-M-8, CTX-M- 25, CTX-M-26 e CTX-M-39 a CTX- M-41 | CTX-Mg8/25_for AACRCRCAGACGCTCTAC Mg8/25_rev TCGAGCCGGAASGTGTAT | 326 |