

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “Júlio de Mesquita Filho”
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA
CAMPUS DE BOTUCATU – SP

**RESISTÊNCIA *IN VITRO* AOS ANTIMICROBIANOS E
MICROBIOTA BUCAL DE CÃES DIAGNOSTICADA POR
MICROBIOMA E ESPECTROMETRIA DE MASSAS**

FÁBIO VINÍCIUS RAMOS PORTILHO

Botucatu – SP

Abril, 2020

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “Júlio de Mesquita Filho”
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA
CAMPUS DE BOTUCATU – SP

**RESISTÊNCIA *IN VITRO* AOS ANTIMICROBIANOS E
MICROBIOTA BUCAL DE CÃES DIAGNOSTICADA POR
MICROBIOMA E ESPECTROMETRIA DE MASSAS**

FÁBIO VINÍCIUS RAMOS PORTILHO

Dissertação apresentada junto ao Programa de Pós-Graduação em Medicina
Veterinária para obtenção do título de Mestre

Orientador: Prof. Associado Márcio Garcia Ribeiro
Departamento de Produção Animal e Medicina Veterinária Preventiva
FMVZ-UNESP/Botucatu, SP
Área de concentração: Saúde Animal, Saúde Pública Veterinária e Segurança Alimentar

Botucatu – SP

Abril, 2020

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CÂMPUS DE BOTUCATU - UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: ROSEMEIRE APARECIDA VICENTE-CRB 8/5651

Portilho, Fábio Vinícius Ramos.

Resistência in vitro aos antimicrobianos e microbiota bucal de cães diagnosticada por microbioma e espectrometria de massas / Fábio Vinícius Ramos Portilho.
- Botucatu, 2020

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia

Orientador: Márcio Garcia Ribeiro

Capes: 50502000

1. Anti-infecciosos. 2. Boca - Doenças. 3. Microbiota. 4. Cães. 5. Espectrometria de massa. 6. Técnicas in vitro.

Palavras-chave: Cavidade oral; MALDI-TOF; Mordida de cães; Sequenciamento em larga escala.

Fábio Vinícius Ramos Portilho

**RESISTÊNCIA *IN VITRO* AOS ANTIMICROBIANOS E
MICROBIOTA BUCAL DE CÃES DIAGNOSTICADA POR
MICROBIOMA E ESPECTROMETRIA DE MASSAS**

COMISSÃO EXAMINADORA

Prof. Associado Márcio Garcia Ribeiro

Presidente e Orientador

Departamento de Produção Animal e Medicina Veterinária Preventiva

FMVZ - UNESP - Botucatu, SP

Prof. Titular Helio Langoni

Membro

Departamento de Produção Animal e Medicina Veterinária Preventiva

FMVZ - UNESP - Botucatu, SP

Prof. Adjunto Marconi Rodrigues de Farias

Membro

Departamento de Medicina Veterinária

Escola de Ciências da Vida - Pontifícia Universidade Católica do Paraná (PUCPR)

Data da defesa: 24 de abril de 2020.

AGRADECIMENTOS

À minha família, em especial meus pais, Marcos e Eliane, por nunca terem deixado de me acompanhar de perto e por sempre me darem suporte em quaisquer circunstâncias. O amor incondicional e apoio de vocês em prol do meu crescimento pessoal e profissional foram fundamentais para a construção dos valores e caráter que tenho hoje. Esta conquista também é de vocês.

Ao meu orientador, Márcio Garcia Ribeiro, por toda dedicação e ajuda durante estes 4 anos de orientação. Obrigado pela confiança em meu potencial e por ser um exemplo de orientador e profissional a ser seguido. Agradeço por todas as conversas e trocas de experiências, que foram fundamentais para meu engrandecimento pessoal e profissional. A você, toda minha admiração.

A todos os amigos e companheiros de laboratório e residência, em especial André, Carolina Lechinski, Lorryne, Joyce, Lucieny e Isabelle. A presença, ajuda e companhia de vocês ao longo destes anos trouxeram leveza ao ambiente trabalho e fizeram com que tudo fosse mais fácil. A todos vocês, meu carinho eterno.

Ao Fernando Paganini que, além de técnico de laboratório e exemplo de pessoa e profissional, se mostrou um grande amigo. Agradeço muito por todo conhecimento compartilhado e por ter sempre acreditado em meu potencial, desde a época dos estágios curriculares. A você, toda minha admiração e respeito.

À minha querida amiga e atual residente, Beatriz, por me lembrar diariamente o significado da expressão “amizade verdadeira”. Agradeço imensamente, não apenas por toda ajuda na parte prática da execução desta pesquisa, mas por todo carinho e apoio que tem me dado ao longo desta etapa.

A todos os amigos, veterinários ou não, que Botucatu colocou em minha vida. Vocês me trouxeram, ao longo destes 9 anos, as melhores e mais diversas experiências de vida que serão levadas para a eternidade.

Aos servidores e docentes do Departamento de Produção Animal e Medicina Veterinária Preventiva da FMVZ/UNESP, Botucatu, em especial ao professor José Carlos de Figueiredo Pantoja, por tamanha dedicação em despertar meu interesse no mundo da microbiologia e da pesquisa durante a iniciação científica na graduação, e aos professores Antonio Carlos Paes e Jane Megid que, juntos com meu orientador Márcio Garcia Ribeiro, me despertaram o amor pelo mundo das doenças infecciosas dos animais. Vocês serão lembrados para sempre com muito respeito e carinho, além de servirem de inspiração para mim e para gerações futuras.

Aos colegas responsáveis pelos laboratórios e serviços colaboradores desta pesquisa, professores Maria de Lourdes R. S. da Cunha, Sandra de Moraes Gimenes Bosco e Marcos Veiga dos Santos e pós graduandos Alana Lucena, Carlos Fidelis e Nathália Teixeira, pela dedicação e auxílio em todas as etapas do projeto. À Angélica, funcionária do laboratório Neoprospecta, por tamanha simpatia, comprometimento e atenção desde o primeiro contato que tivemos por e-mail.

A todos os servidores do Hospital Veterinário da FMVZ/UNESP, Botucatu, e do Programa de Pós Graduação em Medicina Veterinária da mesma instituição, pela oportunidade de aprendizado ao longo destes anos.

Ao apoio financeiro do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP; processo 2018/07345-7).

Aos tutores e animais que participaram desta pesquisa.

E ao meu querido companheiro, Juliano Nóbrega, pela participação ativa em cada etapa desta pesquisa, desde a escrita do pré-projeto. Agradeço imensamente pela companhia e carinho que me serviram de porto seguro ao longo destes anos. Obrigado.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Frequência de micro-organismos de origem bacteriana obtidos da cavidade oral de 100 cães hígidos, diagnosticados por técnicas microbiológicas ¹ e espectrometria de massas (MALDI-TOF) ² . Botucatu, SP, 2020.	21
Tabela 2. Eficácia de antimicrobianos no teste de sensibilidade microbiana <i>in vitro</i> , método de difusão de discos, em 213 bactérias isoladas de cavidade oral de 100 cães hígidos. Botucatu, SP, 2020.	25
Tabela 3. Perfil de sensibilidade <i>in vitro</i> aos antimicrobianos dos principais grupos de bactérias isoladas da cavidade bucal de 100 cães hígidos. Botucatu, SP, 2020.	26

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1. Gel de eletroforese para detecção do gene *mecA* em isolados de estafilococos coagulase-positivos obtidos da cavidade bucal de cães. Botucatu, SP, 2020. 27
- Figura 2. Número absoluto de sequenciamentos dos gêneros bacterianos mais frequentes obtidos na técnica de microbioma em 20 amostras de cavidade oral de cães hígidios. Botucatu, SP, 2020. 29
- Figura 3. Gêneros bacterianos mais frequentes identificados por sequenciamento em larga escala (microbioma) em 20 amostras de cavidade oral de cães hígidios. Botucatu, SP, 2020. 30

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

α = Alfa

β = Beta

μg = Microgramas

μL = Microlitros

ATCC = *American Type Culture Collection*

CEUA = Comitê de Ética no Uso de Animais

CFMV = Conselho Federal de Medicina Veterinária

CO_2 = Dióxido de Carbono (Gás Carbônico)

EUA = Estados Unidos da América

FMVZ = Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia

IBGE = Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística

MALDI-TOF MS = *Matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry*

MG = Minas Gerais

mg = Miligramas

mL = Mililitros

MS = Ministério da Saúde

MRS = *Methicillin-resistant Staphylococcus*

MRSA = *Methicillin-resistant Staphylococcus aureus*

MRSP = *Methicillin-resistant Staphylococcus pseudintermedius*

pb = Pares de bases

PCR = *Polymerase chain reaction* (Reação em cadeia da polimerase)

pH = Potencial hidrogeniônico

rpm = Rotações por minuto

SC = Santa Catarina

SCC_{mec} = *Staphylococcal cassette chromosome mec*

SP = São Paulo

U = Unidades

UNESP = Universidade Estadual Paulista

USP = Universidade de São Paulo

$^{\circ}\text{C}$ = Graus Celsius

% = Porcentagem

SUMÁRIO

RESUMO	iii
ABSTRACT	v
1. INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVAS.....	1
2. REVISÃO DA LITERATURA.....	3
2.1 Aspectos da relação entre os cães e seus tutores.....	3
2.2 Implicações dos acidentes por mordeduras de cães	5
2.3 Micro-organismos mais frequentes na cavidade bucal de cães.....	6
2.3.1 <i>Pasteurella multocida</i>	6
2.3.2 Estafilococos e estreptococos.....	7
2.3.3 Outros patógenos.....	7
2.4 Aspectos do diagnóstico molecular da microbiota oral de cães.....	8
2.4.1 Espectrometria de massas (MALDI-TOF MS)	8
2.4.2 Microbioma.....	9
2.5 Aspectos do tratamento de humanos agredidos por mordeduras de cães	10
2.6 Considerações sobre a multirresistência aos antimicrobianos	11
2.7 <i>S. aureus</i> meticilina-resistentes	13
3. OBJETIVOS	14
4. MATERIAL E MÉTODOS	15
4.1 Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA).....	15
4.2 Animais e colheita de amostras.....	15
4.3 Cultivo microbiológico e fúngico	16
4.4 Isolamento seletivo de <i>Pasteurella</i> spp.....	16
4.5 Isolamento seletivo de <i>S. aureus</i> e caracterização de isolados meticilina-resistentes (gene <i>mecA</i>).....	16
4.6 <i>Matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry</i> – MALDI-TOF.....	18
4.7 Perfil de sensibilidade microbiana <i>in vitro</i>	18
4.8 Microbioma	19
4.9 Estoque de micro-organismos	19
4.10 Análise estatística.....	20
5. RESULTADOS	20
5.1 Dados epidemiológicos dos cães amostrados	20
5.2 Identificação microbiológica.....	21
5.2.1 <i>Pasteurella</i> spp.....	22
5.2.2 <i>Staphylococcus</i> spp.	23
5.2.3 Enterobactérias.....	23
5.2.4 Demais micro-organismos de origem bacteriana	23
5.2.5 Fungos e leveduras.....	23
5.2.6 Anaeróbios	24
5.3 Teste de sensibilidade microbiana <i>in vitro</i>	24
5.4 Microbioma	28
5.5 Análise Estatística	31
6. DISCUSSÃO.....	31
7. CONCLUSÕES.....	37
8. REFERÊNCIAS	39
ANEXO – QUESTIONÁRIO EPIDEMIOLÓGICO	48
TRABALHO CIENTÍFICO.....	49
SÚMULA CURRICULAR	Erro! Indicador não definido.

PORTILHO, F.V.R. Resistência *in vitro* aos antimicrobianos e microbiota bucal de cães diagnosticada por microbioma e espectrometria de massas. Botucatu, 2020. 60p. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Campus de Botucatu, Universidade Estadual Paulista - UNESP.

RESUMO

O estreitamento da relação entre tutores e animais de companhia, nas últimas décadas, aumentou consideravelmente o risco de transmissão de patógenos dos animais para os humanos. A microbiota da cavidade oral de animais de companhia é polimicrobiana e estes agentes podem potencialmente infectar humanos pelas mordeduras ou contato direto com mucosas ou feridas de pele. No entanto, são escassas as informações sobre a identificação destes micro-organismos por técnicas moleculares (microbioma, proteômica). Ainda, o perfil de sensibilidade microbiana *in vitro* da microbiota bacteriana bucal de cães e a etiologia dos agentes envolvidos em mordeduras em humanos não são completamente elucidados, posto que muitos cães são errantes e evadem após a agressão. Com efeito, o presente estudo investigou a presença de agentes de origem bacteriana e fúngica na cavidade oral de 100 cães hígidos por técnicas de cultivo microbiano convencional, sequenciamento genético em larga escala (microbioma) e espectrometria de massas (MALDI-TOF MS), bem como investigou o perfil de sensibilidade/resistência *in vitro* dos isolados. Foram identificados 213 micro-organismos de origem bacteriana e 20 de origem fúngica. Os agentes bacterianos mais prevalentes no diagnóstico microbiológico e espectrometria de massas foram *Staphylococcus pseudintermedius* (40/100=40%), *Streptococcus* α -hemolítico (37/100=37%) e *Pasteurella stomatis* (22/100=22%). O gênero de fungo mais prevalente foi *Aspergillus* (10/100=10%). Imipenem (207/213=97,2%), ceftiofur (196/213=92%) e amoxicilina/ácido clavulânico (194/213=91,1%) foram os antimicrobianos mais eficazes, enquanto a maior resistência dos isolados foi observada com o uso de sulfametoxazol/trimetoprim (77/213=36,1%), penicilina (75/213=35,2%) e azitromicina (48/213=22,5%). Multirresistência bacteriana foi identificada em 18,8% dos isolados (40/213), além da detecção do gene de resistência *mecA* em três isolados (3/49=6,1%) de estafilococos coagulase-positivos, sendo um *S. aureus*. e dois *S. pseudintermedius*. No sequenciamento em larga escala foram identificados predominantemente os gêneros *Porphyromonas* (32,5%), *Moraxella* (16,3%), *Fusobacterium* (12,8%) e *Conchiformibius* (9,5%), seguidos em menor frequência por *Bergeyella* (5%), *Campylobacter* (3,8%) e *Capnocytophaga* (3,4%). Alta complexidade de micro-organismos foi identificada na microbiota oral de cães aparentemente hígidos,

incluindo agentes de potencial zoonótico. Ainda, os isolados revelaram alta multirresistência aos antimicrobianos convencionais, sendo um problema emergente em saúde pública. No geral, a natureza polimicrobiana da microbiota oral de cães e a multirresistência dos patógenos aos antimicrobianos convencionais reforçam o risco potencial de lesões contaminadas causadas por mordeduras de cães em humanos e a necessidade de tratamento dessas lesões com base na identificação etiológica e perfil de sensibilidade antimicrobiana dos isolados.

Palavras-chave: cavidade oral, mordida de cães, sequenciamento em larga escala, MALDI-TOF.

PORTILHO, F.V.R. *In vitro* antimicrobial resistance and oral microbiota of dogs diagnosed by microbiome and mass spectrometry. Botucatu, 2020. 60p. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Campus de Botucatu, Universidade Estadual Paulista - UNESP.

ABSTRACT

The close relationship between humans and companion animals in recent decades has strongly increased the risk of transmission of pathogens from pets-to-humans. The microbiota of the oral cavity from companion animals is polymicrobial and these agents may potentially infect humans through bites or by direct contact with mucous membranes or cutaneous lesions. Nonetheless, the identification of these microorganisms by molecular techniques (microbiome, proteomics) is scarce. Besides, the *in vitro* microbial susceptibility pattern of oral bacterial microbiota from dogs and the etiology of agents involved in human bites are not fully understood, since many dogs are homeless and/or evade after aggression. The present study investigated the presence of bacterial and fungal agents in the oral cavity of 100 healthy dogs based on conventional microbiological culture, large-scale DNA sequencing (microbiome), and matrix-assisted laser desorption ionization time of flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS). *In vitro* antimicrobial susceptibility profile of the isolates was assessed as well. A total of 213 bacterial and 20 fungal microorganisms were identified. The most prevalent bacterial agents diagnosed by microbiological culture and mass spectrometry were *Staphylococcus pseudintermedius* (40/100=40%), α -hemolytic *Streptococcus* (37/100=37%), and *Pasteurella stomatis* (22/100=22%), whereas the most common genus of fungi was *Aspergillus* (10/100=10%). Imipenem (207/213=97.2%), ceftiofur (196/213=92%), and amoxicillin/clavulanic acid (194/213=91.1%) were the most effective antimicrobials. Conversely, the highest resistance of isolates was observed to sulfamethoxazole/trimethoprim (77/213=36.1%), penicillin (75/213=35.2%), and azithromycin (48/213=22.5%). Multidrug resistance was identified in 18.8% of the bacterial isolates (40/213), in addition to the detection of the resistance gene *mecA* in three isolates of coagulase-positive staphylococci (3/49=6.1%) (one *S. aureus* and two *S. pseudintermedius*). In large-scale sequencing, the most predominant genera were *Porphyromonas* (32.5%), *Moraxella* (16.3%), *Fusobacterium* (12.8%), and *Conchiformibius* (9.5%). Less frequently, there were identified *Bergeyella* spp. (5%), *Campylobacter* spp. (3.8%), and *Capnocytophaga* spp. (3.4%). High complexity of agents was identified in oral microbiota of apparently healthy dogs, including pathogens with zoonotic potential. Also, isolates revealed a high multidrug resistance to

conventional antimicrobials, an emergent public health issue. Overall, the polymicrobial nature of oral microbiota of dogs and multi-resistance of the agents to conventional drugs highlights the potential risk of contaminated lesions caused by bites from dogs-to-humans, and need for treatment of these lesions based on etiology identification with a combination of methods, and antimicrobial susceptibility pattern.

Key-words: oral cavity, dog bites, large scale sequencing, MALDI-TOF.

1. INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVAS

Dados do Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE), divulgados pelo Conselho Federal de Medicina Veterinária (CFMV), estimaram, em 2015, população de 52 milhões de cães no Brasil, excluindo os errantes, indicando que a população canina no país possa atingir 70 milhões de animais. Em adição, é cada vez mais estreita a relação entre os tutores e seus animais de estimação, o que favorece a transmissão de patógenos dos cães para os humanos, inclusive por mordeduras (OEHLER et al., 2009).

Em geral, a raiva e o tétano representam as principais preocupações nos casos de acidentes em humanos após mordeduras de cães (KNOBEL et al., 2005). Com efeito, nos humanos agredidos realiza-se, quase que exclusivamente, o protocolo antirrábico e antitetânico (CAPELLAN e HOLLANDER, 2003; MEGID e ITO, 2016).

A cavidade oral dos cães é uma das regiões corpóreas com maior diversidade de micro-organismos devido aos hábitos alimentares e de lambedura desta espécie animal, bem como pela falta de higienização bucal (TRABULSI e SAMPAIO, 2005). Apesar da pluralidade de micro-organismos que habitam a cavidade oral dos cães, incluindo de potencial zoonótico, a microbiota bucal desta espécie não tem sido objeto frequente de estudos, embora esteja diretamente relacionada com a conduta terapêutica de agressões em humanos decorrentes de mordeduras. Neste contexto, bactérias aeróbias e anaeróbias, por vezes de potencial zoonótico, já foram identificadas na microbiota bucal de cães aparentemente sadios, sem histórico de morder seus tutores ou contactantes (BRAGA et al., 2005; MEYERS et al., 2008). Nos Estados Unidos da América (EUA), Oehler et al. (2009) identificaram similaridade entre os micro-organismos isolados a partir de suabes de mucosa oral de cães e de feridas por mordedura em humanos, o que sugere possível transmissão de agentes entre os animais e tutores.

Oliveira (2013) relatou a ocorrência de 6.707 casos de agressões por cães na cidade de Belo Horizonte, MG, entre 2007 e 2011. Em virtude da complexidade de micro-organismos, principalmente de origem bacteriana, encontrados na cavidade oral dos cães, as feridas provocadas por suas mordeduras nos humanos são consideradas policontaminadas, fato que dificulta sobremaneira o tratamento (LIN e PATIL, 2015). Cerca de 20% dos acidentes em humanos por mordeduras de cães apresentam complicações por infecções de origem bacteriana, principalmente nos casos com elevada laceração da pele íntegra (WOLFF, 1998). Em casos de lacerações graves ou mordeduras que acometem vários grupos musculares, são referidas infecções

34 secundárias como endocardite, meningite, abscesso cerebral e sepse, notadamente em
35 indivíduos imunocomprometidos (BROOK, 2003).

36 Paradoxalmente, são escassos os estudos visando investigar a microbiota oral de
37 origem bacteriana e/ou fúngica de cães saudáveis utilizando técnicas moleculares,
38 tampouco o perfil de sensibilidade/multirresistência de bactérias isoladas da microbiota
39 bucal de cães, os quais ficam praticamente restritos a relatos de casos de cultivo
40 microbiológico de lesões em pacientes humanos agredidos por mordeduras (BAILIE et
41 al., 1978; OEHLER et al., 2009). Estudos da microbiota bucal de cães, somados ao
42 perfil de sensibilidade *in vitro*, podem nortear os tratamentos em humanos agredidos por
43 mordeduras de cães, particularmente por animais errantes ou que evadem após agredir
44 os indivíduos. Neste contexto, em Portugal, Lemsaddek et al. (2016) identificaram em
45 cães com periodontite, o predomínio de *Enterococcus faecalis* resistente ao
46 cloranfenicol, eritromicina, estreptomicina e tetraciclina no teste de sensibilidade
47 microbiana *in vitro*.

48 O refinamento das técnicas de biologia molecular possibilitou, nas últimas
49 décadas, o diagnóstico microbiológico com maior sensibilidade, especificidade e em
50 tempo reduzido. Mais recentemente, a espectrometria de massas e o sequenciamento de
51 micro-organismos em larga escala (microbioma) têm despontado como métodos
52 promissores para a identificação da microbiota em diferentes habitats dos micro-
53 organismos, estimulando o desenvolvimento de estudos como o projeto microbioma
54 terrestre e o microbioma oceânico, que investigam a complexidade, a ecologia e os
55 biomas em escala mundial (GILBERT et al., 2010, 2014; THOMPSON et al., 2017). Em
56 humanos, o uso do microbioma em cavidade gastrointestinal, oronasal e cutânea é
57 promissor nas áreas de medicina preventiva e do coletivo, que estimulou o projeto
58 microbioma humano (URSELL et al., 2012). Ainda, o conhecimento dos microbiomas
59 tem sido objeto de pesquisa em ambientes hospitalares. No entanto, em animais
60 domésticos, o reconhecimento do microbioma em mucosas/conjuntiva e suas aplicações
61 em saúde ainda são incipientes. Neste contexto, não foi encontrado na literatura
62 consultada nenhum estudo com o microbioma da mucosa oral de cães no Brasil. Com
63 efeito, o presente estudo pretende investigar a microbiota oral de 100 cães saudáveis,
64 inclusive patógenos com potencial zoonótico, utilizando exame microbiológico
65 convencional, espectrometria de massas e microbioma, bem como o perfil de
66 sensibilidade *in vitro* dos isolados.

67 2. REVISÃO DA LITERATURA

68 2.1 Aspectos da relação entre os cães e seus tutores

69 A história da domesticação dos animais remonta há mais de 15.000 anos quando,
70 pela primeira vez, os humanos domesticaram o lobo cinzento (*Canis lupus*), ancestral
71 direto dos cães domésticos (*Canis familiaris*) (FREEDMAN et al., 2014). Graças ao
72 sucesso desta prática e à pressão seletiva exercida sobre as espécies ao longo de
73 décadas, é comum possuir, em dias atuais, animais de companhia nos domicílios
74 (MAATEN et al., 2016).

75 O Brasil possui a segunda maior população de cães e gatos do mundo estimados
76 em 52 e 22 milhões de animais, respectivamente, superado apenas pelos EUA que
77 possuem, aproximadamente, 75 milhões de cães e 88 milhões de gatos domiciliados
78 (OEHLER et al., 2009). Em 2016, o mercado *pet* brasileiro atingiu faturamento da
79 ordem de 20 bilhões de reais (POLI, 2016), considerado um dos mercados mais
80 promissores no país (MAATEN et al., 2016). Tal investimento no mercado *pet* reforça o
81 fato de que o vínculo homem-animal tem mudado notavelmente ao longo das últimas
82 décadas. Os humanos desenvolveram relações de afeto e companheirismo com seus
83 animais de estimação, que passaram a desempenhar papel fundamental na manutenção
84 da saúde mental e física de seus tutores sendo, inclusive, referidos popularmente como
85 “membros das famílias” nos domicílios (ARAHORI et al., 2017).

86 Nos EUA, Chomel e Sun (2011) relataram a existência de animais de estimação
87 em 61% das residências, dos quais 39% são cães. No entanto, dado preocupante deste
88 mesmo estudo nos EUA reside no fato de que 50% dos proprietários afirmaram dormir
89 com seus animais de estimação na mesma cama. Resultados semelhantes foram
90 encontrados no estudo de Overgaauw et al. (2009), na Holanda, no qual 50% das
91 pessoas permitiam lambeduras de seus cães na face, 60% dos animais frequentavam o
92 quarto do tutor e 18% compartilhavam a mesma cama. Na cidade de São Paulo, Brasil,
93 foi estimada a existência de, aproximadamente, um cão para cada quatro pessoas nos
94 domicílios (CANATTO et al., 2012). Este mesmo estudo apontou que 81,5% destes
95 tutores possuem os cães como animais de companhia.

96 O estreitamento entre as famílias e seus animais de estimação, bem como
97 possíveis hábitos promíscuos na criação dos animais, requerem atenção para os
98 possíveis riscos que esta relação representa, como transtornos comportamentais nos

animais de companhia (TATIBANA e COSTA-VAL, 2009) ou até mesmo a transmissão de enfermidades comuns entre os animais e os humanos, conhecidas como zoonoses (MAATEN et al., 2016). Devido à grande diversidade de micro-organismos presentes na cavidade oral dos cães, bem como os hábitos alimentares e de lambedura, ou ainda pela falta de higienização bucal, os ataques por mordedura de cães representam importante forma de transmissão de patógenos para os humanos (TRABULSI e SAMPAIO, 2005).

Os acidentes por mordidas de cães ocorrem com maior frequência em crianças entre 5 e 9 anos de idade, principalmente do sexo masculino (HON et al., 2007). Os locais mais frequentemente atingidos são as extremidades do corpo como mãos, pés, braços e pernas. Particularmente nas crianças, o rosto e pescoço também são comumente acometidos (TALAN et al., 1999; HAN et al., 2012).

Estimativas realizadas nos EUA e Europa referiram que os acidentes por mordeduras de cães e gatos correspondem a aproximadamente 1% das emergências médico-hospitalares atendidas anualmente, gerando custo superior a 100 milhões de dólares/ano nos EUA (DIRE, 1992; WEISS et al., 1998). Em 2001, mais de 350.000 pessoas foram atendidas nos setores de emergências nos EUA decorrentes de acidentes com cães (OEHLER et al., 2009). Com efeito, é possível que o número de agressões por mordeduras de cães em humanos seja superior ao estimado nos estudos ou registros das Unidades de Saúde e hospitais ocorrendo, certamente, subnotificação destes acidentes na população (WEISS et al., 1998).

Pit bull terriers, rottweilers e pastores alemães estão entre as raças de cães com maior índice de envolvimento em acidentes por mordedura em humanos (SHULER et al., 2008). No Brasil, segundo o Ministério da Saúde (MS), em 2010 ocorreram 619 internações de pacientes decorrentes de ataques de cães, dos quais 413 (67%) foram na região Sudeste (OLIVEIRA, 2013). Em Franca, SP, foram registradas 983 agressões por mordedura de cães entre 2005 e 2009 (NASCIF JUNIOR et al., 2012). Durante o período entre 2000 e 2009 foram registrados 4.149 atendimentos para profilaxia antirrábica no município de Jaboticabal, SP (NUNES, 2012). Já no estado de Minas Gerais, Oliveira (2013) relatou a ocorrência de 6.707 casos de agressões por cães na cidade de Belo Horizonte entre 2007 e 2011.

130 2.2 Implicações dos acidentes por mordeduras de cães

131 É notório que o vírus da raiva e o tétano representam as maiores preocupações
132 nos casos de acidentes em humanos após mordeduras de cães (KNOBEL et al., 2005).
133 Apesar de passível de prevenção, a raiva permanece como causa preocupante de óbito
134 em praticamente 100% dos casos, particularmente em países em desenvolvimento,
135 representando desafio constante para os profissionais de saúde (FRIAS et al., 2011).

136 O protocolo antirrábico comumente adotado após acidentes por mordedura de
137 cães inclui, ao critério do médico responsável, a higienização do local da ferida com
138 água corrente e sabão, além do uso de vacinas e/ou soro antirrábico, dependendo dos
139 fatores citados anteriormente (MEGID e ITO, 2016). Além do protocolo antirrábico, são
140 necessárias medidas de higienização local com peróxido de hidrogênio e uso de vacinas
141 e/ou soro antitetânico nos pacientes agredidos por cães (CAPELLAN e HOLLANDER,
142 2003).

143 A grande diversidade de micro-organismos, principalmente de origem
144 bacteriana, encontrada na cavidade oral dos cães, torna as feridas provocadas por
145 mordeduras altamente contaminadas (LIN e PATIL, 2015), exigindo cuidados especiais
146 e tratamento com antimicrobianos de amplo espectro de ação (OEHLER et al., 2009).
147 Em 1978, estudo com amostras de secreções orais de cães conduzido em Manhattan,
148 EUA, observou predomínio de isolamento de *Pasteurella multocida*, *Staphylococcus*
149 *aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, estreptococos do grupo D, *Corynebacterium* sp.,
150 *Neisseria* sp., e *Moraxella* sp., reforçando a presença de agentes potencialmente
151 infectantes para humanos na microbiota oral de cães (BAILIE et al., 1978).

152 Talan et al. (1999) identificaram, nos EUA, bactérias dos gêneros *Pasteurella*,
153 *Streptococcus*, *Fusobacterium* e *Capnocytophaga* em feridas de humanos causadas por
154 mordedura de cães, ressaltando a necessidade de cuidados especiais e antibioticoterapia
155 nos pacientes. No mesmo estudo, os autores salientaram para os riscos de infecções em
156 humanos, agredidos por cães, por *S. aureus* resistentes à metilicina (MRSA).

157 No Brasil, Santin et al. (2013) isolaram leveduras da cavidade oral de cães sem
158 manifestações clínicas, exceto halitose. Os principais micro-organismos encontrados
159 foram *Malassezia pachydermatis*, *Rhodotorula* sp., *Candida albicans*, *Candida*
160 *catenulata*, *Candida famata*, *Candida guilliermondii*, *Candida parapsilosis*, *Candida*
161 *intermedia*, *Trichosporon asahii*, *Trichosporon mucoides* e *Cryptococcus albidus*. É
162 possível notar que os micro-organismos identificados nas lesões cutâneas de humanos

163 após a mordedura de cães são similares aos encontrados na microbiota oral normal dos
164 animais (OEHLER et al., 2009). A inoculação traumática dos micro-organismos no
165 tecido cutâneo e subcutâneo propicia condições locais de multiplicação destes agentes,
166 inflamação local e, ocasionalmente, de disseminação linfo-hemática para outros órgãos
167 e tecidos (BROOK, 2003; ZAMBORI et al., 2013). Apesar da expressiva população de
168 cães no Brasil, são incipientes ou praticamente inexistentes estudos com a microbiota
169 oral de cães.

170 **2.3 Micro-organismos mais frequentes na cavidade bucal de cães**

171 **2.3.1 *Pasteurella multocida***

172 Descrita há mais de 125 anos por Louis Pasteur como o agente etiológico da
173 cólera das aves, *Pasteurella multocida* (*P. multocida*) foi posteriormente relacionada a
174 outras enfermidades em animais de produção, como septicemia hemorrágica dos
175 bovinos e rinite atrófica dos suínos, causando grandes prejuízos econômicos para
176 produtores rurais (HARPER et al., 2006).

177 As espécies pertencentes ao gênero *Pasteurella* são, comumente, patógenos
178 oportunistas. A transmissão entre os animais ocorre predominantemente por via
179 aerógena. No entanto, para os humanos, a transmissão curiosamente ocorre secundária a
180 mordedura de animais de companhia e, menos frequentemente, pelo contato com
181 secreções nasais dos animais, uma vez que podem ser encontradas como habitantes
182 normais da cavidade oronasal de cães e gatos (HARPER et al., 2006; DENDLE e
183 LOOKE, 2008; SALERNO e PAES, 2016).

184 Rempe et al. (2009) referiram, nos EUA, o isolamento de *P. multocida* em 50%
185 das amostras de feridas de humanos causadas por mordeduras de cães e em 75% das
186 amostras de acidentes com gatos. Outra importante forma de transmissão do patógeno é
187 representada pela lambedura de animais em feridas cutâneas e mucosas de humanos
188 (KAWASHIMA et al., 2010).

189 Animais domésticos com pasteurelose podem ser assintomáticos ou apresentar
190 abscessos cutâneos e em órgãos. No entanto, a principal manifestação nos animais é
191 representada por sinais respiratórios que podem variar, nos casos mais leves, desde
192 espirros, exsudações serosas e rinite, e pneumonia e septicemia nos casos mais graves
193 (WILSON e HO, 2013).

194 Velez et al. (2010) relataram, nos EUA, que a taxa de mortalidade da
 195 pasteurelose em humanos é bem menor quando comparada aos animais. Quando
 196 adquirem a doença pela mordedura de cães, os sinais mais comuns nos humanos são
 197 edema, celulite e exsudato purulento ou sanguinolento no local da agressão.
 198 Ocasionalmente, são referidas complicações graves como osteomielite, endocardite e
 199 meningite, causadas pela disseminação sistêmica do agente a partir da lesão cutânea
 200 primária (WILSON e HO, 2013).

201 **2.3.2 Estafilococos e estreptococos**

202 Espécies de *Staphylococcus* sp. e *Streptococcus* sp. são frequentemente isoladas
 203 de feridas em humanos provocadas por mordeduras de cães, causando celulite e
 204 linfangite (TALAN et al., 1999). As espécies de estreptococos isoladas mais
 205 frequentemente são *S. mitis*, *S. mutans* e *S. pyogenes*, enquanto as espécies mais comuns
 206 de estafilococos são *S. aureus*, *S. epidermidis* e *S. warneri* (ABRAHAMIAN e
 207 GOLDSTEIN, 2011).

208 **2.3.3 Outros patógenos**

209 Grande variedade de micro-organismos de origem bacteriana e fúngica tem sido
 210 identificada na microbiota bucal de cães, incluindo actinomicetos, enterobactérias,
 211 *Bacillus* spp. e *Micrococcus* spp. (BAILIE et al., 1978; TALAN et al., 1999;
 212 KAWASHIMA et al., 2010; ABRAHAMIAN e GOLDSTEIN, 2011). No entanto, tem-
 213 se observado pouca atenção na identificação de micro-organismos de origem fúngica
 214 (SANTIN et al., 2013) e bactérias microaerófilas e anaeróbicas (ABRAHAMIAN e
 215 GOLDSTEIN, 2011). Neste contexto, *Capnocytophaga canimorsus* foi isolada pela
 216 primeira vez do sangue e do líquido de um paciente mordido por cão em 1976 e ficou
 217 conhecida, entre as décadas de 1980 e 1990, como o “micro-organismo das mordidas de
 218 cães” (LION et al., 1996), causando desde celulite (OEHLER et al., 2009) até
 219 complicações como meningite e endocardite em pacientes debilitados (MEYER, et al.,
 220 2008).

221 Abscessos ou lesões causadas pela mordedura de cães em humanos propiciam
 222 também a multiplicação de bactérias anaeróbicas, com predomínio de espécies de
 223 *Fusobacterium*. A multiplicação de bactérias aeróbicas nas lesões após a mordedura dos
 224 cães, que consomem o oxigênio local no tecido afetado, pode favorecer a multiplicação

secundária de organismos anaeróbicos, posto que ambos estão presentes na microbiota oral de cães saudáveis (ABRAHAMIAN e GOLDSTEIN, 2011). Entretanto, devido ao maior tempo de incubação e condições específicas para o isolamento *in vitro*, os micro-organismos anaeróbicos são, provavelmente, negligenciados ou subdiagnosticados nas lesões em pacientes agredidos por mordeduras de cães (TALAN et al., 1999).

2.4 Aspectos do diagnóstico molecular da microbiota oral de cães

A maioria dos estudos envolvendo o diagnóstico da microbiota oral de cães hígidos tem sido conduzida com técnicas microbiológicas convencionais (BRAGA et al., 2005; SANTIN et al., 2013; ZAMBORI et al., 2013). No entanto, o refinamento das técnicas de biologia molecular, como o sequenciamento total, proteômica e sequenciamento em larga escala, tem possibilitado o diagnóstico mais acurado de micro-organismos, a identificação de populações microbianas em ambientes terrestres e aquáticos, bem como em mucosas e conjuntivas de humanos e animais.

2.4.1 Espectrometria de massas (MALDI-TOF MS)

Matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS) é uma técnica analítica que se fundamenta na ionização de compostos químicos sob a forma de moléculas carregadas, cuja proporção de massa por carga e espectro de massa podem ser aferidos. Primordialmente foi utilizada em ensaios químicos. No entanto, na década de 1980, o desenvolvimento de ionização por dessorção a laser assistida por matriz (MALDI) possibilitou maior aplicabilidade da técnica em grandes moléculas biológicas como as proteínas (SINGHAL et al., 2015).

Na Bélgica, Magnette et al. (2016) utilizaram a espectrometria de massas para confirmar o diagnóstico fenotípico e molecular de isolados de *Capnocytophaga canimorsus* e *C. cynodegmi* obtidos da cavidade oral de cães e de feridas de humanos agredidos por mordedura. A técnica vem sendo bastante empregada, também, no diagnóstico de agentes causadores de mastite em vacas leiteiras em vários países (NONNEMANN et al., 2019), inclusive no Brasil (BARRERO et al., 2010; GONÇALVES et al., 2014).

2.4.2 Microbioma

Os microbiomas são reconhecidos como populações complexas de micro-organismos e têm estimulado o desenvolvimento de projetos em escala global, como os projetos microbioma terrestre e oceânico (GILBERT et al., 2010, 2014; THOMPSON et al., 2017), além do projeto microbioma humano (URSELL et al., 2012). O diagnóstico molecular em larga escala vem suprir a deficiência de métodos convencionais de cultivo que não obtém sucesso no isolamento de certos micro-organismos, que requerem exigências específicas, incluindo nutrientes, tensão de oxigênio e CO₂, temperatura e pH. Os projetos de microbiomas são um esforço científico mundial e despontam como promissores para a identificação e produção de atlas da microbiota terrestre, em diferentes habitats terrestres e oceânico, visando identificar a complexidade microbiana, a ecologia e os biomas em escala global (THOMPSON et al., 2017). O projeto microbioma humano tem se proposto a estudar populações de micro-organismos na cavidade gastrointestinal, oronasal e cutânea (nas superfícies corporais). Muitas bactérias, fungos, vírus e pequenos eucariotos não são nocivos em condições normais de equilíbrio populacional na pele, em mucosas e conjuntivas de humanos e animais e, por vezes, são fundamentais para a manutenção da saúde, evitando a multiplicação desordenada de patógenos. Este projeto vislumbra perspectivas promissoras de medicina preventiva, do coletivo ou mesmo personalizada, a partir do conhecimento da microbiota dos indivíduos, bem como de ambientes hospitalares (AFSHINNEKOO et al., 2015; THOMPSON et al., 2017).

Em animais domésticos, o reconhecimento do microbioma em mucosas/conjuntiva e suas aplicações em saúde animal ainda são incipientes. O microbioma já foi utilizado, nos EUA (OIKONOMOU et al., 2012; QUIGLEY et al., 2013; OIKONOMOU et al., 2014) e na Índia (BHATT et al., 2012) para a identificação de populações de micro-organismos em amostras de leite de vacas saudáveis e com mastite. Ainda, foi utilizado para identificação de micro-organismos em amostras de fezes de cães na Inglaterra (HAND et al., 2013) e na cavidade oral de cães nos EUA (ISAIAH et al., 2017) e no Canadá (STURGEON et al., 2013). No Brasil, a técnica foi utilizada no estudo de amostras de leite caprino (LEON, 2018), assim como do conteúdo uterino de vacas recém paridas (MACHADO et al., 2012). No entanto, não foi encontrado nenhum estudo com o microbioma da mucosa oral de cães do país.

285 2.5 Aspectos do tratamento de humanos agredidos por mordeduras de cães

286 As principais medidas recomendadas para humanos após acidentes por
287 mordeduras de cães, em se tratando de profilaxia contra a raiva e tétano, incluem
288 lavagem rigorosa do local acometido com água e sabão, uso de peróxido de hidrogênio
289 e o uso de vacinas e/ou soro antirrábicos e antitetânicos, ao critério do médico
290 responsável pelo paciente, tendo em vista o histórico vacinal da vítima e do animal, o
291 local e gravidade da lesão e a presença ou não do cão agressor no domicílio
292 (CAPELLAN e HOLLANDER, 2003; MEGID e ITO, 2016).

293 Posto que as mordeduras são classificadas como infecções polimicrobianas, as
294 feridas mais graves são tratadas, quase que indistintamente, com antimicrobianos de
295 amplo espectro, visando evitar complicações locais ou por disseminação dos patógenos
296 (ABRAHAMIAN e GOLDSTEIN, 2011; LIN e PATIL, 2015). No entanto, por vezes, o
297 tratamento não tem respaldo de testes de sensibilidade *in vitro* dos isolados. Neste
298 contexto, o uso não racional de antimicrobianos em animais e humanos, sem testes
299 prévios de sensibilidade *in vitro*, pode aumentar a pressão seletiva para bactérias
300 multirresistentes, que é considerada preocupação de ordem mundial (GIGUÈRE et al.,
301 2010), principalmente no contexto de Saúde Única (*One Health*) (RIBEIRO et al., 2015;
302 PEÑA et al., 2016).

303 A amoxicilina com ácido clavulânico é a associação de antimicrobianos mais
304 indicada para pacientes com feridas contaminadas por mordedura de cães
305 (GOUNGEON et al., 2007; OEHLER et al., 2009). Para pacientes alérgicos às
306 penicilinas, recomenda-se a associação de doxiciclina com metronidazol (OEHLER et
307 al., 2009). Alternativamente, Gougeon et al. (2007) sugeriram, na França, o uso de
308 clindamicina, tetraciclina ou cloranfenicol. No entanto, Oehler et al. (2009), nos EUA,
309 observaram resistência *in vitro* de isolados de *P. multocida* diante da clindamicina.
310 Outros antimicrobianos que se mostraram ineficazes *in vitro* em isolados de *P.*
311 *multocida* obtidos de lesões em humanos nos EUA, após mordeduras de cães, foram
312 eritromicina e cefalexina (WILSON e HO, 2013).

313 Nos casos de infecções por *S. aureus* meticilina-resistentes foi recomendado o
314 uso de doxiciclina ou sulfametoxazol/trimetoprim (MORGAN e PALMER, 2007). Para
315 gestantes, as cefalosporinas de terceira geração como a ceftriaxona e cefpodoxima
316 constituem as opções mais seguras (OEHLER et al., 2009).

317 **2.6 Considerações sobre a multirresistência aos antimicrobianos**

318 A ocorrência de bactérias multirresistentes aos antimicrobianos representa um
319 dos problemas mais preocupantes em saúde pública e animal (GIGUÈRE et al., 2010).
320 O conhecimento do fenômeno de resistência dos micro-organismos a agentes químicos
321 e físicos remonta desde a era microbiana. Após o advento do uso clínico das
322 sulfonamidas em 1933 e, posteriormente, da penicilina em 1941, foi especulado que a
323 resistência das bactérias aos antimicrobianos poderia ocorrer de forma natural ou
324 adquirida. Ao descobrir a penicilina em 1929, Alexander Fleming também observou,
325 paralelamente, a resistência natural de micro-organismos ao fármaco (TAVARES,
326 2007).

327 A resistência aos antimicrobianos é um fenômeno genético relacionado à
328 presença de genes no micro-organismo que codificam diferentes mecanismos
329 bioquímicos capazes de impedir a ação bacteriostática ou bactericida do antimicrobiano
330 (TAVARES, 2007; ANDRADE e GIUFFRIDA, 2008). O desenvolvimento de
331 resistência pelos micro-organismos pode ocorrer via cromossomal (como resultado de
332 mutações espontâneas) ou pela transferência de material genético, por plasmídeos e
333 outros elementos móveis, de uma bactéria para outra, por transdução (transferência de
334 genes por bacteriófagos), transformação (incorporação de DNA liberado por outra
335 bactéria), conjugação (transferência de elementos genéticos por ponte citoplasmática),
336 integrons e transposons (material genético móvel) (GIGUÈRE et al., 2010). Os
337 plasmídeos são segmentos de DNA extra-cromossomal capazes de se replicarem
338 independente do cromossoma bacteriano, contendo informações genéticas para a
339 produção de toxinas, uso de substratos, produção de fatores de colonização e de
340 resistência aos antimicrobianos, estes últimos denominados também plasmídeos de
341 resistência (fator R). Os transposons são pequenos fragmentos de DNA capazes de se
342 movimentar entre as bactérias (plasmídeos, cromossomos ou bacteriófagos), podendo
343 conter genes de resistência aos antimicrobianos (TAVARES, 2007; ANDRADE e
344 GIUFFRIDA, 2008; GIGUÈRE et al., 2010).

345 A resistência de uma bactéria a um determinado antimicrobiano pode gerar
346 também resistência cruzada aos fármacos da mesma classe. Ainda, bactérias não
347 patogênicas ou comensais podem adquirir resistência aos antimicrobianos que
348 habitualmente seriam eficazes diante destes organismos (QUINN et al., 2011). Outros
349 mecanismos de resistência bacteriana aos antimicrobianos são representados por

350 diminuição da permeabilidade da parede celular bacteriana, produção de enzimas que
351 inativam o fármaco, transporte ativo do fármaco para fora da bactéria, desenvolvimento
352 de vias metabólicas alternativas e alteração de receptor da bactéria para o
353 antimicrobiano (ANDRADE e GIUFFRIDA, 2008).

354 O aumento da ocorrência de linhagens multidroga resistentes coincide com a
355 ampla utilização de diferentes grupos de antimicrobianos, notadamente a partir da
356 década de 1960, no tratamento de diversas manifestações clínicas em humanos e em
357 animais, com o uso industrial de fármacos na conservação de alimentos e na medicina
358 experimental (TAVARES, 2007). Na medicina, a ocorrência de micro-organismos
359 multirresistentes é notória em ambientes hospitalares. Já na medicina veterinária,
360 particularmente em animais de produção, o uso por décadas de antimicrobianos como
361 “promotores do crescimento” de aves e suínos (SAWANT et al., 2007; ANDRADE e
362 GIUFFRIDA, 2008; SOBESTIANSKY e BARCELLOS, 2012), na profilaxia de
363 doenças específicas em animais como na terapia da vaca seca (SANTOS e FONSECA,
364 2007), ou mesmo estimulado pelo apelo comercial de certos fármacos, provavelmente
365 favoreceu o aumento da pressão seletiva para isolados multirresistentes (RIBEIRO,
366 2008).

367 O uso indevido ou não racional dos antimicrobianos (subdoses, superdoses,
368 tempo de tratamento insuficiente, tratamento sem o respaldo de testes de sensibilidade
369 *in vitro*, descontinuidade do tratamento) pode aumentar a pressão de seleção para
370 bactérias com resistência intrínseca ou adquirida aos antimicrobianos (TAVARES,
371 2007; RIBEIRO, 2008). Nesses casos, a população bacteriana resistente multiplica-se
372 desordenadamente e a resistência aos fármacos pode ser transmitida para micro-
373 organismos da mesma espécie e, por vezes, até para outros gêneros de bactérias
374 (TAVARES, 2007; ANDRADE e GIUFFRIDA, 2008, GIGUÈRE et al., 2010).

375 O uso de antimicrobianos em infecções bacterianas em animais e em humanos
376 deveria ser realizado com base em testes *in vitro* de sensibilidade dos isolados. O
377 tratamento respaldado em testes de sensibilidade microbiana *in vitro* favorece a tomada
378 de decisão na escolha do fármaco de eleição para uma determinada infecção, aumenta as
379 taxas de cura e evita o uso em isolados não sensíveis. Paralelamente, possibilita também
380 monitorar a ocorrência de multirresistência bacteriana. No entanto, nem sempre a
381 sensibilidade *in vitro* assegura a eficácia *in vivo* em todas as situações de tratamento,
382 posto que vários fatores intrínsecos aos micro-organismos, aos fármacos, ao local de
383 infecção, ao tipo de reação inflamatória, a evolução do caso, a precocidade do

384 tratamento e a espécie animal, contribuem para o sucesso do tratamento (ANDRADE e
385 GIUFFRIDA, 2008; RIBEIRO, 2008; GIGUÈRE et al., 2010).

386 Em animais com sinais graves de doenças que necessitam de tratamento
387 imediato, por questões econômicas, ou mesmo logísticas (dificuldade de acesso a
388 laboratórios e pessoal capacitado), nem sempre é possível realizar os testes de
389 sensibilidade *in vitro* previamente à instituição do tratamento (ANDRADE e
390 GIUFFRIDA, 2008). Assim, na prática médica veterinária, na impossibilidade de
391 realização de testes *in vitro* de sensibilidade aos antimicrobianos, a escolha do fármaco
392 para o tratamento recai, por vezes, na experiência do profissional em casos pregressos,
393 na avaliação da relação custo/benefício, ou mesmo no apelo comercial de certos
394 produtos. O conjunto destes fatores pode resultar em baixa eficácia terapêutica, uso
395 indevido ou não racional de fármacos e consequente aumento da pressão de seleção para
396 bactérias multirresistentes (RIBEIRO, 2008).

397 **2.7 *S. aureus* meticilina-resistentes**

398 Em diferentes países tem-se destacado a emergência de estafilococos meticilina-
399 resistentes (do inglês, meticilin-resistant *Staphylococcus* - MRS) nos animais e humanos
400 (KING et al., 2006). A meticilina foi introduzida na rotina médica em 1959,
401 representando fármaco de escolha no tratamento das infecções estafilocócicas
402 (MARTINS e CUNHA, 2007). O primeiro relato de *S. aureus* resistente à meticilina
403 data de 1961 (FITZGERALD et al., 2001). A resistência à meticilina é codificada pelo
404 gene *mecA*, localizado em uma ilha de patogenicidade denominada *Staphylococcal*
405 *Cassette Chromosome* (SCC*mec*), elemento genético móvel que pode ser transmitido
406 entre diferentes espécies de estafilococos (MANDELL et al., 2005; ROZGONYI et al.,
407 2007). O gene *mecA* codifica uma proteína ligadora de penicilina alternativa - PBP
408 (PBP'2 ou PBP2a) com baixa afinidade à oxacilina e a outros antimicrobianos do grupo
409 dos β -lactâmicos, reconhecido como um dos principais mecanismos de resistência
410 destas bactérias (MANDELL et al., 2005). A dificuldade de tratamento dos pacientes
411 infectados por *Staphylococcus* meticilina-resistentes (MRS) determina longos períodos
412 de hospitalização, gastos com internações e altos índices de mortalidade (ROZGONYI
413 et al., 2007). Neste contexto, Oehler et al. (2009) relataram, nos EUA, casos de
414 septicemia em pacientes humanos como complicação de infecções por mordidas de cães
415 causadas por *S. aureus* meticilina-resistentes ou MRSA (do inglês, meticilin-resistant

416 *Staphylococcus aureus*), salientando grande preocupação dos profissionais de saúde
417 com as dificuldades de tratamento antimicrobiano nesses pacientes.

418 Considerando a grande população de cães no Brasil e o estreito contato dos
419 tutores com os animais de companhia, a complexidade da microbiota oral de cães
420 contendo agentes potencialmente infectantes para humanos, o reduzido número de
421 estudos envolvendo a microbiota oral de cães saudáveis utilizando técnicas moleculares de
422 vanguarda (microbioma e espectrometria de massas) e a emergência da multirresistência
423 bacteriana aos antimicrobianos; o presente estudo investigou a microbiota oral
424 bacteriana e fúngica de 100 cães hígidos utilizando técnicas microbiológicas
425 convencionais e moleculares (sequenciamento em larga escala e MALDI-TOF MS),
426 bem como o perfil *in vitro* de sensibilidade bacteriana dos isolados aos antimicrobianos.
427

428 3. OBJETIVOS

429 **Geral:**

430 ✓ Investigar a microbiota de origem bacteriana e fúngica da cavidade oral de cães
431 hígidos e o perfil de sensibilidade bacteriana *in vitro* dos isolados.

432

433 **Específicos:**

434 ✓ Investigar a microbiota bucal dos cães por métodos tradicionais de cultivo
435 microbiano e por métodos moleculares (MALDI-TOF e sequenciamento em larga
436 escala - microbioma);

437 ✓ Avaliar o perfil de sensibilidade/resistência *in vitro* dos isolados de origem
438 bacteriana diante dos principais antimicrobianos utilizados em cães e/ou no tratamento
439 de humanos agredidos por mordeduras;

440 ✓ Investigar a ocorrência de multirresistência dos isolados bacterianos aos
441 antimicrobianos, incluindo *S. aureus* meticilina-resistentes.

442 4. MATERIAL E MÉTODOS

443 4.1 Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA)

444 O presente estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética no Uso de Animais
445 (CEUA) da FMVZ-UNESP/Botucatu, SP, protocolo número 0077/2018. Todos os
446 tutores (proprietários) que permitiram a colheita de material dos cães assinaram termo
447 de “Consentimento livre e esclarecido”, para conhecimento dos procedimentos de
448 colheita, bem como responderam ao questionário epidemiológico (Anexo).

449 4.2 Animais e colheita de amostras

450 Foram colhidas amostras bucais de cães aparentemente hígidos do município de
451 Botucatu, SP. O cálculo do tamanho amostral foi realizado com base na prevalência de
452 20% de isolamento de *Pasteurella multocida* da cavidade oral de cães hígidos, com
453 nível de confiança de 95% e erro absoluto de 5% (THRUSFIELD, 2007), que estimou
454 amostragem mínima de 100 cães necessários para o estudo.

455 Os cães foram submetidos à colheita, em triplicata, de suabes de cavidade oral
456 (um para estoque e dois para os cultivos microbiológicos) utilizando contenção física.
457 As colheitas foram realizadas nos domicílios dos tutores, friccionando-se os suabes
458 esterilizados contra os dentes, gengiva, língua, mucosa jugal e palato duro dos animais.
459 Em seguida, dois suabes foram armazenados em meio de transporte Stuart e um em
460 microtubo com solução salina estéril, mantidos em refrigeração (4-8°C), e
461 encaminhados imediatamente ao Laboratório de Microbiologia, do Departamento de
462 Produção Animal e Medicina Veterinária Preventiva da FMVZ-UNESP/Botucatu, SP,
463 para a realização de exames microbiológicos. O suabe destinado ao estoque foi
464 congelado a -20°C.

465 Dados de idade, raça, gênero, tipo de alimentação (ração ou comida caseira),
466 comportamento (dócil ou agressivo), profilaxia contra raiva, hábitos de convívio com os
467 tutores e histórico de mordeduras dos tutores ou contactantes dos animais foram obtidos
468 junto aos proprietários (Anexo).

469 Os critérios adotados para inclusão dos animais no estudo foram: 1) ausência de
470 administração de antimicrobianos, por qualquer via, nos últimos 30 dias (tomando-se
471 como base a data da colheita); 2) ausência de doença periodontal grave; 3) ausência de
472 qualquer enfermidade sistêmica e tegumentar concomitante.

4.3 Cultivo microbiológico e fúngico

Todas as amostras foram cultivadas simultaneamente em condições de aerobiose e microaerofilia (5% de CO₂) no meio de ágar sangue (Oxoid®, São Paulo, Brasil) acrescido de sangue ovino (5-7%), mantidas por 72 horas, a 37°C e, em aerobiose, no meio seletivo de MacConkey (Oxoid®, São Paulo, Brasil), nas mesmas condições supracitadas. Ainda, as amostras foram cultivadas em ágar sangue em condições de anaerobiose, a 37°C, mantidas por quatro dias em estufa, bem como cultivadas no ágar Sabouraud (Oxoid®, São Paulo, Brasil) acrescido de cloranfenicol (25mg/500mL), mantidas em estufa a 37°C, por 10 dias. Os micro-organismos isolados em condições de aerobiose e microaerofilia foram classificados de acordo com características morfotintoriais e bioquímicas (QUINN et al., 2011).

Os micro-organismos de origem fúngica foram encaminhados ao Laboratório de Micologia, do Instituto de Biociências da UNESP/Botucatu, SP, para identificação de gênero por técnicas microbiológicas (LACAZ et al., 2002; ZAITZ et al., 1998).

Colônias suspeitas de clostrídios isoladas em condições de anaerobiose foram encaminhadas para o Laboratório de Anaeróbios da Universidade Federal de Minas Gerais visando a identificação fenotípica do gênero *Clostridium* sp. (QUINN et al., 2011; MEGID et al., 2016) e de espécies com base na técnica de MALDI-TOF, segundo as recomendações do fabricante (Bruker e Daltonics, EUA).

4.4 Isolamento seletivo de *Pasteurella* spp.

Todas as amostras de suabes de cavidade oral dos cães foram submetidas ao cultivo seletivo do gênero *Pasteurella* no meio de ágar sangue ovino contendo 6µg de vancomicina (VIANA et al., 2007).

4.5 Isolamento seletivo de *S. aureus* e caracterização de isolados meticilina-resistentes (gene *mecA*)

Todas as amostras de suabes orais foram semeadas no meio de ágar de ovo-telurito-glicina-piruvato (BD Baird-Parker Agar®, Heidelberg, Alemanha) acrescido de gema de ovo com telurito de potássio (EY Tellurite Enrichment, Difco™, Heidelberg, Alemanha) e mantidas em condições de aerobiose a 37°C, por 48 horas, com vistas ao isolamento de estafilococos. A detecção do gene *mecA* foi realizada no Laboratório de

503 Microbiologia do Instituto de Biociências da UNESP/Botucatu, SP, conforme descrito
504 por Murakami et al. (1991).

505 O ácido nucléico total foi extraído de colônias de *Staphylococcus* spp. cultivadas
506 em ágar sangue, inoculadas individualmente em caldo infusão cérebro e coração (BHI)
507 e incubadas a 37°C por 24 horas. Para a extração foi utilizado o Kit Illustra (GE
508 *Healthcare*, Buckinghamshire, Reino Unido) que consiste na digestão inicial das células
509 de estafilococos com lisozima (10 mg/ml) e proteinase K (20 mg/mL). A seguir, 500 µL
510 da solução de extração foi adicionada à mistura e centrifugada a 5.000 x g por 1 minuto.
511 Em seguida, o sobrenadante foi transferido para a coluna GFX e centrifugado a 5.000 x
512 g por 1 minuto. O líquido coletado foi descartado e 500 µL de solução de extração foi
513 adicionado novamente à coluna. Após a centrifugação e descarte do líquido coletado,
514 500 µL da solução de lavagem foi adicionada à coluna, submetida à centrifugação a
515 14.000 rpm por 3 minutos. A coluna foi transferida para um tubo de 1,5 mL e 200 µL de
516 água Milli Q aquecida a 70°C foram utilizados para a eluição. As amostras foram
517 centrifugadas novamente a 5000 x g por 1 minuto e a coluna de GFX desprezada. O
518 DNA extraído foi estocado em temperatura de congelamento a -20°C.

519 As reações de PCR para a detecção do gene *mecA* foram realizadas em tubos de
520 microcentrífuga de 0,2 mL em volumes totais de 25 µL contendo 10 pmol de cada
521 *primer* (*primer mecA1* = 5' AAA ATC GAT GGT AAA GGT TGGC, 533pb e *primer*
522 *mecA2* = 5' AGT TCT GCA GTA CCG GAT TTGC), 2,5U de Taq DNA polimerase,
523 200µM de desoxirribonucleotídeos trifosfatados, 20 mM de Tris-HCl (pH 8,4), 0,75mM
524 de MgCl₂ e 3µL de DNA MasterCycler™ gradient (Eppendorf, Hamburgo, Alemanha)
525 empregando as seguintes condições: 40 ciclos de desnaturação a 94°C por 30 segundos,
526 anelamento dos *primers* a 55°C por 30 segundos e extensão a 72°C por um minuto. Em
527 todas as reações foram utilizadas linhagens de referência, como controle positivo (*S.*
528 *aureus* ATCC 33591) e negativo (*S. aureus* ATCC 25923).

529 A eficiência das amplificações foi confirmada pela eletroforese em gel de
530 agarose 2% preparada em tampão Tris-Borato-EDTA (TBE) 0,5M. Como padrão foi
531 utilizado marcador de peso molecular de 100 pb. O DNA foi corado com *Syber-safe* e,
532 posteriormente, fotografado sob transiluminação ultravioleta.

533

534 **4.6 Matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry –** 535 **MALDI-TOF**

536 Todos os isolados compatíveis com estafilococos e pasteurula foram submetidos
537 à espectrometria de massas no laboratório de Pesquisa de Qualidade do Leite
538 (QUALILEITE) do Departamento de Nutrição e Produção Animal da FMVZ–
539 USP/Pirassununga, SP. Para tanto, entre 3 e 4 colônias recém isoladas (24 a 48h) em
540 ágar sangue foram submetidas à extração com 20-40µL de ácido fórmico (70%) e
541 centrifugadas, visando a lise bacteriana e liberação de proteínas (predominantemente de
542 origem ribossomal) e formação de íons, necessários para a identificação dos espectros
543 bacterianos. Após 15 minutos, foi adicionado em cada amostra 20-40µL de acetomil
544 (100% P.A.) na mesma proporção do ácido fórmico (1:1) e centrifugado. Em seguida,
545 1µL da solução de cada amostra foi adicionada em placas específicas contendo 96 poços
546 (Bruker e Daltonics™, Bremen, Alemanha) e mantidas por alguns minutos para secar
547 em temperatura ambiente. Os poços com as amostras secas foram cobertos com 1µL de
548 solução matriz (ácido 2-ciano-4-hidroxicinâmico diluído a 50% de acetomil e 2,5% de
549 ácido trifluoracético). As placas foram dispostas no receptáculo do equipamento
550 MALDI-TOF MS™ (Bruker e Daltonics™, Bremen, Alemanha), operado com 337-nm
551 de laser. Os dados dos espectros foram analisados entre 2.000-20.000m/z, usando o
552 *software FlexControl 3.3*. A caracterização em nível de espécie dos micro-organismos
553 foi considerada somente para isolados com espectros ≥ 2.0 (BARREIRO et al., 2010;
554 GONÇALVES et al., 2014).

555 **4.7 Perfil de sensibilidade microbiana *in vitro***

556 Os isolados de origem bacteriana foram submetidos ao teste de sensibilidade
557 microbiana *in vitro*, pelo método de difusão com discos, com suspensões equivalentes à
558 turbidez 0,5 da escala de *McFarland*, segundo as recomendações do *Clinical*
559 *Laboratory Standards Institute - CLSI* (CLSI, 2015; 2019). Foram utilizados 12
560 antimicrobianos pertencentes a seis grupos (classes) indicados para o tratamento de
561 diferentes afecções de origem bacteriana em cães (GREENE, 2012) e/ou recomendados
562 para humanos agredidos por mordeduras de cães (OEHLER et al., 2009), conforme
563 segue: 1) penicilinas e derivados beta lactâmicos (penicilina, 10UI; ceftriaxona, 30µg;
564 ceftiofur, 30µg; amoxicilina/ácido clavulânico, 30µg; imipenem, 10µg); 2) macrolídeos
565 (azitromicina, 15µg); 3) fluoroquinolonas (enrofloxacino, 5µg; ciprofloxacino, 10µg;

566 levofloxacin, 5µg); 4) aminoglicosídeos (gentamicina, 10µg); 5) anfenicóis
567 (cloranfenicol, 30µg) e 6) sulfonamidas (sulfametoxazol/trimetoprim, 25µg). Foram
568 considerados multirresistentes os isolados de origem bacteriana que apresentaram
569 resistência simultânea a três ou mais classes diferentes de antimicrobianos
570 (MAGIORAKOS et al., 2012).

571 4.8 Microbioma

572 O sequenciamento genético em larga escala (microbioma) foi realizado em 20
573 cães selecionados aleatoriamente (um a cada cinco), do total de 100 cães amostrados no
574 estudo. As amostras para microbioma foram colhidas com suabes e tubos apropriados
575 cedidos pelo fabricante, armazenados em temperatura ambiente após a colheita e
576 enviadas ao laboratório Neopropecta - *Microbiome Technologies*[®], Florianópolis, SC,
577 em até 30 dias pós-colheita.

578 O sequenciamento foi realizado em duas etapas de PCR. Foram escolhidos os
579 *primers* V3-V4 do gene 16S rRNA com as seguintes condições: os primeiros *primers* de
580 PCR continham as sequências baseadas no adaptador de estrutura TruSeq (Illumina,
581 Inc., San Diego, EUA) e permitiram a segunda PCR com sequências de indexação. As
582 reações foram realizadas em triplicata utilizando Platinum Taq (Invitrogen, Foster,
583 EUA), com as condições: 95°C por 5 minutos, 25 ciclos a 95°C por 45 segundos, 55°C
584 por 30 segundos e 72°C por 2 minutos (PCR1); 95°C por 5 minutos, 10 ciclos a 95°C
585 por 45 segundos, 66°C por 30 segundos e 72°C por 2 minutos (PCR2). Para comparação
586 foi usado o protocolo Illumina 16S (Illumina Technical Note 15044223 Rev. B).

587 A reação final de PCR foi lavada usando esferas AMPureXP (Beckman Coulter,
588 Brea, EUA) e as amostras foram agrupadas nas bibliotecas de sequenciamento para
589 quantificação. As amplificações foram realizadas com Picogreen dsDNA (Invitrogen,
590 Foster, EUA) e, em seguida, as bibliotecas agrupadas foram diluídas para quantificação
591 precisa de qPCR utilizando o KAPA *Library Quantification Kit* para plataformas
592 Illumina (KAPA Biosystems, Woburn, EUA). As bibliotecas foram sequenciadas em
593 sistema MiSeq com *primers* fornecidos no kit.

594 4.9 Estoque de micro-organismos

595 Todos os isolados de origem bacteriana foram estocados em temperatura
596 ambiente (25°C) em meio de Lignières em tubos de vidro com tampa de borracha, ou

congelados a -80°C em meio de BHI contendo glicerol (10%). Os isolados de origem fúngica foram mantidos em temperatura ambiente (25°C), em repiques mensais em ágar Sabouraud com cloranfenicol.

4.10 Análise estatística

A associação entre a ocorrência dos diferentes micro-organismos, multirresistência aos antimicrobianos e os dados epidemiológicos dos animais (idade, raça, gênero, tipo de alimentação, comportamento, histórico de mordeduras dos tutores ou contactantes dos animais) foi avaliada pelo teste de Qui-quadrado (Exato de Fisher), considerando significante valores de $p < 0,05$ (TRIOLA, 2005).

5. RESULTADOS

5.1 Dados epidemiológicos dos cães amostrados

Do total de cães amostrados, 57% (57/100) não possuíam raça definida. Dos 43% (43/100) restantes, as raças mais frequentes foram: border collie (6/100 = 6%), poodle (5/100 = 5%), shih-tzu (5/100 = 5%) e blue heeler (4/100 = 4%).

A idade dos animais variou entre 6 meses e 16 anos, com média de 5,9 anos. Entre os cães amostrados, 43% (43/100) tinham idade inferior a cinco anos, 39% (39/100) entre 5 e 9 anos e 18% (18/100) idade igual ou superior a 10 anos. Do total, 57% (57/100) eram fêmeas e 43% (43/100) machos.

No tocante à alimentação, 80% (80/100) eram alimentados exclusivamente com ração e 20% (20/100) com ração e comida caseira. Do total, 97% (97/100) foram considerados dóceis pelos proprietários e somente 3% (3/100) relatados como agressivos.

Em relação à profilaxia ao vírus rábico, 94% (94/100) eram vacinados anualmente. Quando questionados sobre o histórico de agressões dos animais, 80% dos tutores (proprietários) (80/100) afirmaram que nunca houve qualquer tipo de ataque por mordedura envolvendo seus animais, enquanto 7% (7/100) relataram episódios de agressões a outros animais, 6% (6/100) a pessoas desconhecidas, 3% (3/100) a pessoas de convívio comum, 2% (2/100) aos próprios tutores e 2% (2/100) ao médico veterinário do animal. Do total, 15% (15/100) tinham contato frequente com crianças.

A maioria dos cães (77/100 = 77%) tinha acesso livre a todos os ambientes do domicílio, incluindo o quarto do tutor, embora apenas 26% (26/100) tinham o hábito de compartilhar a cama com algum morador da casa.

Quando questionados sobre a higienização bucal dos seus animais, 89% dos proprietários (89/100) afirmaram nunca terem realizado qualquer procedimento de higienização, enquanto 5% (5/100) realizavam a cada 15 dias, 4% (4/100) uma vez por semana e 2% (2/100) duas vezes por semana.

5.2 Identificação microbiológica

Foram identificados 213 isolados bacterianos. A frequência dos micro-organismos de origem bacteriana isolados dos 100 cães amostrados está sumariada na Tabela 1. Os principais micro-organismos identificados por métodos fenotípicos e/ou espectrometria de massas foram: *Staphylococcus pseudintermedius* (40/213 = 18,78%), *Streptococcus* α -hemolítico (37/213 = 17,37%), *Pasteurella stomatis* (22/213 = 10,33%), *Staphylococcus* spp. (coagulase-negativos) (18/213 = 8,45%), *Pasteurella canis* (16/213 = 7,51%), *Pseudomonas* spp. (12/213 = 5,63%), *Escherichia coli* (11/213 = 5,16%), *Neisseria animaloris* (10/213 = 4,69%) e *Neisseria zoodegmatis* (10/231 = 4,69%) (Tabela 1).

TABELA 1. Frequência de micro-organismos de origem bacteriana obtidos da cavidade oral de 100 cães hígidos, diagnosticados por técnicas microbiológicas¹ e espectrometria de massas (MALDI-TOF)². Botucatu, SP, 2020.

Micro-organismos	N	%
<i>Staphylococcus pseudintermedius</i> ²	40	18,78%
<i>Streptococcus</i> α -hemolítico ¹	37	17,37%
<i>Pasteurella stomatis</i> ²	22	10,33%
<i>Staphylococcus</i> spp. ¹	18	8,45%
<i>Pasteurella canis</i> ²	16	7,51%
<i>Pseudomonas</i> spp. ¹	12	5,63%
<i>Escherichia coli</i> ¹	11	5,16%
<i>Neisseria animaloris</i> ²	10	4,69%
<i>Neisseria zoodegmatis</i> ²	10	4,69%
<i>Staphylococcus intermedius</i> ²	6	2,82%
<i>Enterobacter cloacae</i> ¹	4	1,88%

TABELA 1 (continuação). Frequência de micro-organismos de origem bacteriana obtidos da cavidade oral de 100 cães hígidos, diagnosticados por técnicas microbiológicas¹ e espectrometria de massas (MALDI-TOF)². Botucatu, SP, 2020.

<i>Micrococcus</i> spp. ¹	4	1,88%
<i>Rothia nasimurium</i> ²	4	1,88%
<i>Klebsiella pneumoniae</i> ¹	3	1,41%
<i>Pasteurella multocida</i> ²	3	1,41%
<i>Staphylococcus aureus</i> ²	3	1,41%
<i>Enterobacter aerogenes</i> ¹	2	0,94%
<i>Pasteurella dagmatis</i> ²	2	0,94%
<i>Proteus mirabilis</i> ¹	2	0,94%
<i>Chryseobacterium gleum</i> ²	1	0,47%
<i>Chryseobacterium indologenes</i> ²	1	0,47%
<i>Citrobacter freundii</i> ¹	1	0,47%
<i>Neisseria weaveri</i> ²	1	0,47%
Total Geral	213	100,00%

MALDI-TOF MS = Matrix Assisted Laser Desorption Ionization – Time of Flight Mass Spectrometry; N = Número de isolados; % = Frequência dos isolados

5.2.1 *Pasteurella* spp.

Foram isoladas colônias compatíveis com o gênero *Pasteurella* de 60% (60/100) das amostras de cavidade oral. Em quatro amostras foram isolados dois tipos diferentes de colônias, perfazendo 64 isolados de *Pasteurella* sp. MALDI-TOF revelou que *P. stomatis* foi a espécie mais frequente (22/64 = 34,4%) entre as colônias compatíveis microbiologicamente com pasteurelas, seguida de *P. canis* (16/64 = 25%), *P. multocida* (3/64 = 4,7%) e *Pasteurella dagmatis* (2/64 = 3,1%). Os demais isolados foram identificados como bactérias do gênero *Neisseria* (21/64 = 32,8%), incluindo *N. animaloris* (10/64 = 15,6%), *N. zoodegmatis* (10/64 = 15,6%) e *N. weaveri* (1/64 = 1,6%). A prevalência de bactérias do gênero *Pasteurella* foi de 42% (42/100), posto que em uma amostra de cavidade oral foram identificadas duas espécies distintas; enquanto o gênero *Neisseria* foi isolado em 19% (19/100) das amostras, pois duas amostras revelaram duas espécies diferentes.

693 **5.2.2 *Staphylococcus* spp.**

694 Colônias típicas de estafilococos foram isoladas em 66% (66/100) das amostras.
 695 Destas, uma amostra apresentou dois tipos diferentes de colônias, totalizando 67
 696 isolados, que foram submetidos a testes bioquímicos (coagulase, Manitol Salt Agar,
 697 DNase e trealose). Os isolados coagulase-positivos (49/67 = 73,1%) foram
 698 encaminhados para diagnóstico por MALDI-TOF MS e os coagulase-negativos (18/67
 699 = 26,9%) classificados como *Staphylococcus* spp. MALDI-TOF revelou predomínio de
 700 *S. pseudintermedius* (40/49 = 81,6%), seguido em menor frequência de *S. intermedius*
 701 (6/49 = 12,3%) e *S. aureus* (3/49 = 6,1%).

702 **5.2.3 Enterobactérias**

703 Foram isoladas enterobactérias em 21% (21/100) das amostras. Destas, duas
 704 amostras apresentaram isolamento de duas espécies diferentes de enterobactérias,
 705 perfazendo 23 isolados. A espécie mais frequente foi *Escherichia coli* (11/23 = 47,8%),
 706 seguida de *Enterobacter cloacae* (4/23 = 17,4%), *Klebsiella pneumoniae* (3/23 = 13%),
 707 *Enterobacter aerogenes* (2/23 = 8,7%), *Proteus mirabilis* (2/23 = 8,7%) e *Citrobacter*
 708 *freundii* (1/23 = 4,4%).

709 **5.2.4 Demais micro-organismos de origem bacteriana**

710 Outros agentes de origem bacteriana isolados nos cães amostrados foram:
 711 *Streptococcus* α -hemolítico (37/100 = 37%), *Pseudomonas* spp. (12/100 = 12%),
 712 *Micrococcus* spp. (4/100 = 4%), *Rothia nasimurium* (4/100 = 4%), *Chryseobacterium*
 713 *indologenes* (1/100 = 1%) e *Chryseobacterium gleum* (1/100 = 1%).

714 **5.2.5 Fungos e leveduras**

715 Micro-organismos de origem fúngica e leveduras foram isolados em 19% das
 716 amostras (19/100), das quais uma apresentou duas colônias distintas, totalizando 20
 717 isolados. O gênero mais prevalente foi *Aspergillus* (10/100 = 10%), seguido de
 718 *Malassezia pachydermatis* (4/100 = 4%). Em menor frequência foram identificados
 719 *Bipolaris* sp. (1/100 = 1%), *Curvularia* sp. (1/100 = 1%), *Fusarium* sp. (1/100 = 1%),
 720 *Nigrospora* sp. (1/100 = 1%), *Scopulariopsis* sp. (1/100 = 1%) e *Trichoderma* sp.
 721 (1/100 = 1%).

5.2.6 Anaeróbios

Os cultivos microbiológicos em anaerobiose não revelaram nenhuma colônia compatível com clostrídios ou anaeróbios estritos.

5.3 Teste de sensibilidade microbiana *in vitro*

Os antimicrobianos mais efetivos diante dos isolados foram imipenem (207/213 = 97,2%), ceftiofur (196/213 = 92%) e amoxicilina/ácido clavulânico (194/213 = 91,1%). Em contraste, os isolados apresentaram maior resistência para sulfametoxazol/trimetoprim (77/213 = 36,1%), penicilina (75/213 = 35,2%) e azitromicina (48/213 = 22,5%) (Tabela 2).

O perfil de sensibilidade microbiana dos principais grupos de bactérias identificadas nos cães amostrados está sumariado na Tabela 3. Imipenem e amoxicilina/ácido clavulânico foram os fármacos mais efetivos diante dos principais grupos de bactérias identificados, exceto enterobactérias, que as cefalosporinas mostraram melhor eficácia. Em geral, os micro-organismos dos gêneros *Pasteurella* e *Neisseria* mostraram pouca resistência diante dos antimicrobianos utilizados. Em contraste, isolados do gênero *Staphylococcus* revelaram resistência, em frequência variável, a vários antimicrobianos testados (Tabela 3).

Foi identificada multirresistência bacteriana em 19,2% dos isolados (41/213). A multirresistência ocorreu com maior frequência em *Staphylococcus pseudintermedius* (19/41 = 46,3%), seguido de *Pseudomonas* spp. (10/41 = 24,4%), *Escherichia coli* (4/41 = 9,7%) e *Staphylococcus* spp. (4/41 = 9,7%), particularmente para os antimicrobianos sulfametoxazol/trimetoprim, penicilina, azitromicina e cloranfenicol.

O gene de resistência à meticilina (*mecA*) foi detectado em 6,1% (3/49) dos isolados de estafilococos coagulase-positivos, dos quais um *S. aureus* e dois *S. pseudintermedius* (Figuras 1A-E).

754 TABELA 2. Eficácia de antimicrobianos no teste de sensibilidade microbiana *in vitro*,
 755 método de difusão de discos, em 213 bactérias isoladas de cavidade oral de 100 cães
 756 hípidos. Botucatu, SP, 2020.

Antimicrobiano	Sensibilidade		
	S (%)	PS (%)	R (%)
Imipenem	207 (97,2)	6 (2,8)	0
Ceftiofur	196 (92)	8 (3,8)	9 (4,2)
Amoxicilina/ácido clavulânico	194 (91,1)	3 (1,4)	16 (7,5)
Levofloxacino	189 (88,7)	8 (3,8)	16 (7,5)
Ceftriaxona	187 (87,8)	12 (5,6)	14 (6,6)
Gentamicina	183 (85,9)	12 (5,6)	18 (8,5)
Cloranfenicol	178 (83,6)	9 (4,2)	26 (12,2)
Ciprofloxacino	174 (81,7)	20 (9,4)	19 (8,9)
Enrofloxacino	171 (80,3)	26 (12,2)	16 (7,5)
Azitromicina	160 (75,1)	5 (2,4)	48 (22,5)
Penicilina	138 (64,8)	0	75 (35,2)
Sulfametoxazol/trimetoprim	132 (62)	4 (1,9)	77 (36,1)

757

758 S = número de isolados sensíveis; PS = número de isolados parcialmente sensíveis; R = número
 759 de isolados resistentes; % = porcentagem

760 TABELA 3: Perfil de sensibilidade *in vitro* aos antimicrobianos dos principais grupos de bactérias isoladas da cavidade bucal de 100 cães
 761 hígidos. Botucatu, SP, 2020.

Antimicrobiano	Micro-organismos																	
	Staphylococcus sp. (n=67)			Pasteurella sp. (n=43)			Streptococcus α -hemolítico (n=37)			Neisseria sp. (n=21)			Enterobactérias (n=23)			Outros (n=22)		
	S	PS	R	S	PS	R	S	PS	R	S	PS	R	S	PS	R	S	PS	R
Imipenem	67 (100%)	0	0	43 (100%)	0	0	37 (100%)	0	0	21 (100%)	0	0	17 (73,9%)	6 (26,1%)	0	22 (100%)	0	0
Ceftiofur	66 (98,5%)	0	1 (1,5%)	43 (100%)	0	0	37 (100%)	0	0	21 (100%)	0	0	20 (87%)	3 (13%)	0	9 (40,9%)	5 (22,7%)	8 (36,4%)
Amoxicilina/ácido clavulânico	66 (98,5%)	0	1 (1,5%)	43 (100%)	0	0	37 (100%)	0	0	21 (100%)	0	0	19 (82,6%)	2 (8,7%)	2 (8,7%)	8 (36,4%)	1 (4,5%)	13 (59,1%)
Ceftriaxona	64 (95,5%)	1 (1,5%)	2 (3%)	43 (100%)	0	0	32 (86,5%)	1 (2,7%)	4 (10,8%)	21 (100%)	0	0	16 (69,6%)	3 (13%)	4 (17,4%)	11 (50%)	7 (31,8%)	4 (18,2%)
Levofloxacino	51 (76,1%)	2 (3%)	14 (20,9%)	43 (100%)	0	0	36 (97,3%)	0	1 (2,7%)	21 (100%)	0	0	18 (78,2%)	4 (17,4%)	1 (4,4%)	20 (90,9%)	2 (9,1%)	0
Gentamicina	54 (80,6%)	4 (6%)	9 (13,4%)	41 (95,4%)	2 (4,6%)	0	28 (75,7%)	3 (8,1%)	6 (16,2%)	21 (100%)	0	0	20 (87%)	3 (13%)	0	19 (86,4%)	0	3 (13,6%)
Cloranfenicol	52 (77,6%)	0	15 (22,4%)	43 (100%)	0	0	35 (94,6%)	2 (5,4%)	0	21 (100%)	0	0	21 (91,3%)	2 (8,7%)	0	6 (27,3%)	5 (22,7%)	11 (50%)
Ciprofloxacino	51 (76,1%)	1 (1,5%)	15 (22,4%)	42 (97,7%)	1 (2,3%)	0	26 (70,3%)	11 (29,7%)	0	21 (100%)	0	0	13 (56,5%)	6 (26,1%)	4 (17,4%)	21 (95,5%)	1 (4,5%)	0
Enrofloxacino	48 (71,6%)	6 (9%)	13 (19,4%)	42 (97,7%)	1 (2,3%)	0	28 (75,7%)	8 (21,6%)	1 (2,7%)	18 (85,7%)	3 (14,3%)	0	19 (82,6%)	3 (13%)	1 (4,4%)	16 (72,7%)	5 (22,8%)	1 (4,5%)
Azitromicina	37 (55,2%)	0	30 (44,8%)	43 (100%)	0	0	30 (81,1%)	3 (8,1%)	4 (10,8%)	21 (100%)	0	0	15 (65,2%)	0	8 (34,8%)	14 (63,6%)	2 (9,1%)	6 (27,3%)
Penicilina	30 (44,8%)	0	37 (55,2%)	42 (97,7%)	0	1 (2,3%)	36 (97,3%)	0	1 (2,7%)	21 (100%)	0	0	0	0	23 (100%)	9 (40,9%)	0	13 (59,1%)
Sulfametoxazol/ trimetoprim	37 (55,2%)	1 (1,5%)	29 (43,3%)	26 (60,5%)	0	17 (39,5%)	20 (54,1%)	1 (2,7%)	16 (43,2%)	20 (95,2%)	1 (4,8%)	0	18 (78,2%)	1 (4,4%)	4 (17,4%)	11 (50%)	0	11 (50%)

762

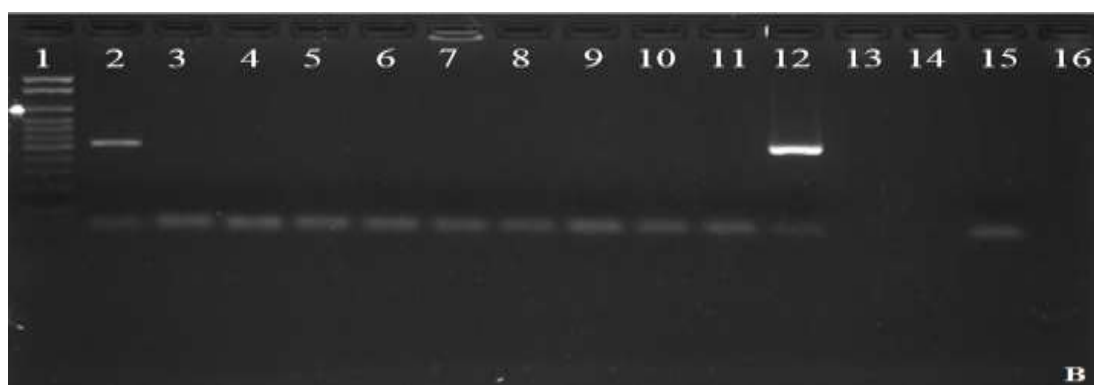
763 *Staphylococcus* sp. = *S. aureus*, *S. intermedius*, *S. pseudintermedius* e estafilococos coagulase-negativos; *Pasteurella* sp. = *P. canis*, *P. dagmatis*, *P. multocida* e *P. stomatis*;
 764 *Neisseria* sp. = *N. animaloris*, *N. weaveri* e *N. zoodegmatis*; Enterobactérias = *Citrobacter freundii*, *Enterobacter aerogenes*, *E. cloacae*, *Escherichia coli*, *Klebsiella*
 765 *pneumoniae* e *Proteus mirabilis*; Outros = *Chryseobacterium gleum*, *C. indologenes*, *Micrococcus* sp., *Pseudomonas* sp. e *Rothia nasimurium*.

766



767

768 FIGURA 1A: Gel de eletroforese para detecção do gene *mecA* em isolados de estafilococos
 769 coagulase-positivos obtidos da cavidade bucal de cães. **Canaleta 1:** Ladder 100 pb; **canaleta 2:** USA300
 770 (Controle +); **canaleta 3:** isolado 6; **canaleta 4:** isolado 39; **canaleta 5:** isolado 79; **canaleta 6:** isolado 19; **canaleta**
 771 **7:** isolado 21; **canaleta 8:** isolado 22; **canaleta 9:** isolado 29; **canaleta 10:** isolado 30; **canaleta 11:** isolado 31;
 772 **canaleta 12:** isolado 32; **canaleta 13:** isolado 37; **canaleta 14:** isolado 38; **canaleta 15:** MW2 (Controle +); **canaleta**
 773 **16:** controle negativo.



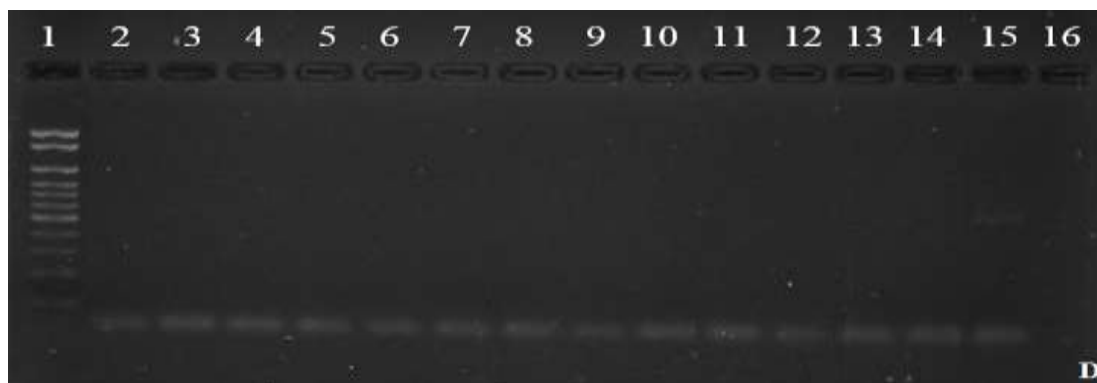
774

775 FIGURA 1B: Gel de eletroforese para detecção do gene *mecA* em isolados de estafilococos
 776 coagulase-positivos obtidos da cavidade bucal de cães. **Canaleta 1:** Ladder 100 pb; **canaleta 2:** USA300
 777 (Controle +); **canaleta 3:** isolado 51; **canaleta 4:** isolado 64; **canaleta 5:** isolado 69; **canaleta 6:** isolado 2; **canaleta**
 778 **7:** isolado 36; **canaleta 8:** isolado 41; **canaleta 9:** isolado 71; **canaleta 10:** isolado 74; **canaleta 11:** isolado 81;
 779 **canaleta 12:** MW2 (Controle +); **canaletas 13 e 14:** vazias; **canaleta 15:** controle negativo; **canaleta 16:** vazia.



780

781 FIGURA 1C: Gel de eletroforese para detecção do gene *mecA* em isolados de estafilococos
 782 coagulase-positivos obtidos da cavidade bucal de cães. **Canaleta 1:** Ladder 100 pb; **canaleta 2:** controle
 783 negativo; **canaleta 3:** USA300 (Controle +); **canaleta 4:** MW2 (Controle +); **canaleta 5:** isolado 9; **canaleta 6:**
 784 isolado 13; **canaleta 7:** isolado 14; **canaleta 8:** isolado 16; **canaleta 9:** isolado 17; **canaleta 10:** isolado 23; **canaleta**
 785 **11:** isolado 24; **canaleta 12:** isolado 25; **canaleta 13:** isolado 27; **canaleta 14:** isolado 33; **canaleta 15:** isolado 35;
 786 **canaleta 16:** vazia.



787

788 FIGURA 1D: Gel de eletroforese para detecção do gene *mecA* em isolados de estafilococos
 789 coagulase-positivos obtidos da cavidade bucal de cães. **Canaleta 1:** Ladder 100 pb; **canaleta 2:**
 790 isolado 43; **canaleta 3:** isolado 57; **canaleta 4:** isolado 61; **canaleta 5:** isolado 65; **canaleta 6:** isolado 70;
 791 **canaleta 7:** isolado 75; **canaleta 8:** isolado 77; **canaleta 9:** isolado 78; **canaleta 10:** isolado 83; **canaleta 11:**
 792 isolado 84; **canaleta 12:** isolado 86; **canaleta 13:** isolado 89; **canaleta 14:** isolado 92; **canaleta 15:** isolado
 793 93; **canaleta 16:** vazia.



794

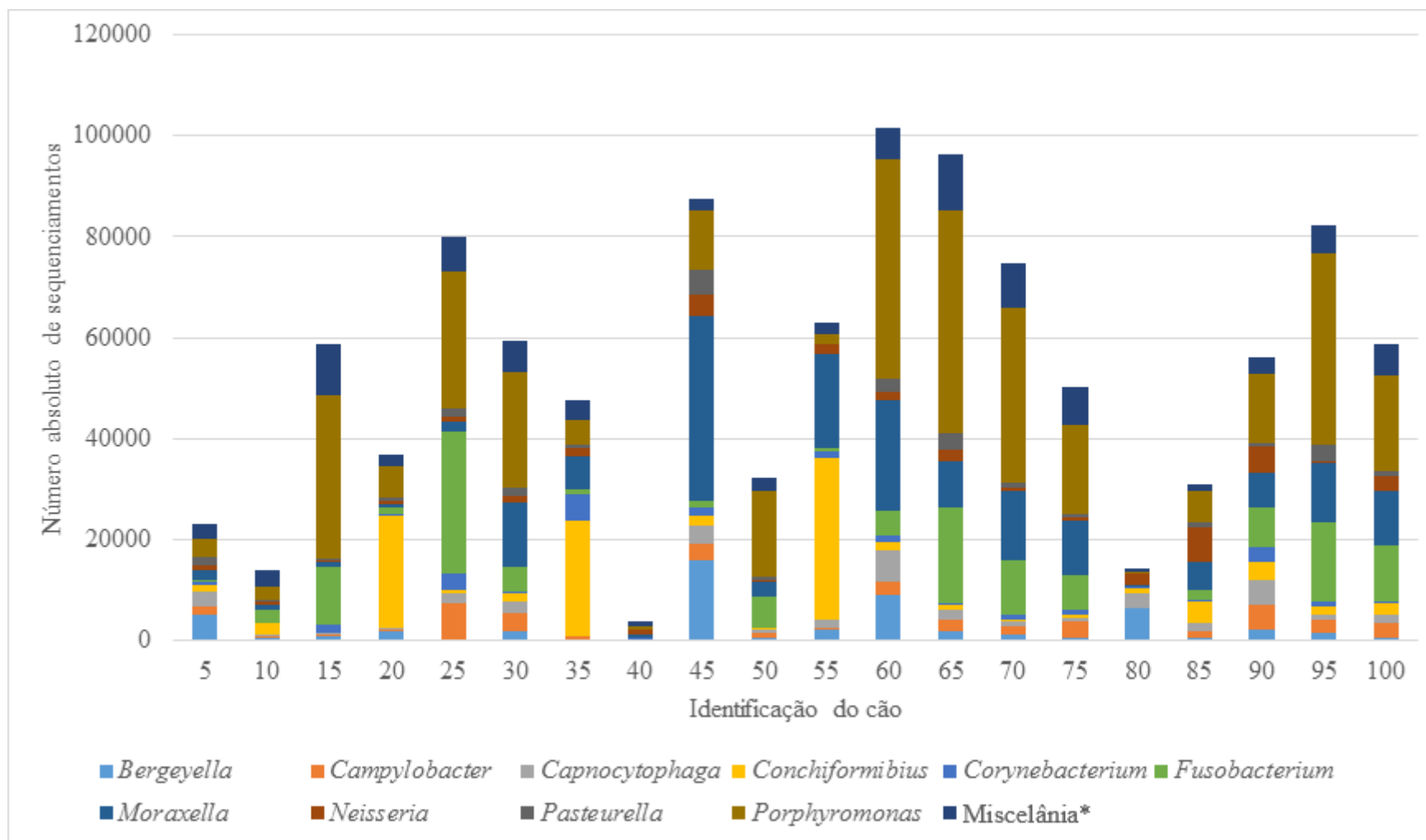
795 FIGURA 1E: Gel de eletroforese para detecção do gene *mecA* em isolados de estafilococos
 796 coagulase-positivos obtidos da cavidade bucal de cães. **Canaleta 1:** Ladder 100 pb; **canaleta 2:**
 797 USA300 (Controle +); **canaleta 3:** controle negativo; **canaleta 4:** isolado 42; **canaleta 5:** isolado 60;
 798 **canaleta 6:** isolado 93 (repetição); **canaleta 7:** 97.

799

800 5.4 Microbioma

801 Os resultados do sequenciamento em larga escala em 20 amostras da cavidade
 802 oral apresentam, além de todas as espécies de micro-organismos caracterizadas, o
 803 número total de sequenciamentos em cada amostra, que variou entre 3.794 e 101.622,
 804 com média de 53.562 sequenciamentos/amostra. As Figuras 2 e 3 ilustram os micro-
 805 organismos de origem bacteriana identificados com maior frequência de
 806 sequenciamentos nos 20 cães hígidos amostrados, que incluiu os gêneros *Bergeyella*,
 807 *Campylobacter*, *Capnocytophaga*, *Conchiformibius*, *Corynebacterium*, *Fusobacterium*,
 808 *Moraxella*, *Neisseria*, *Pasteurella* e *Porphyromonas*.

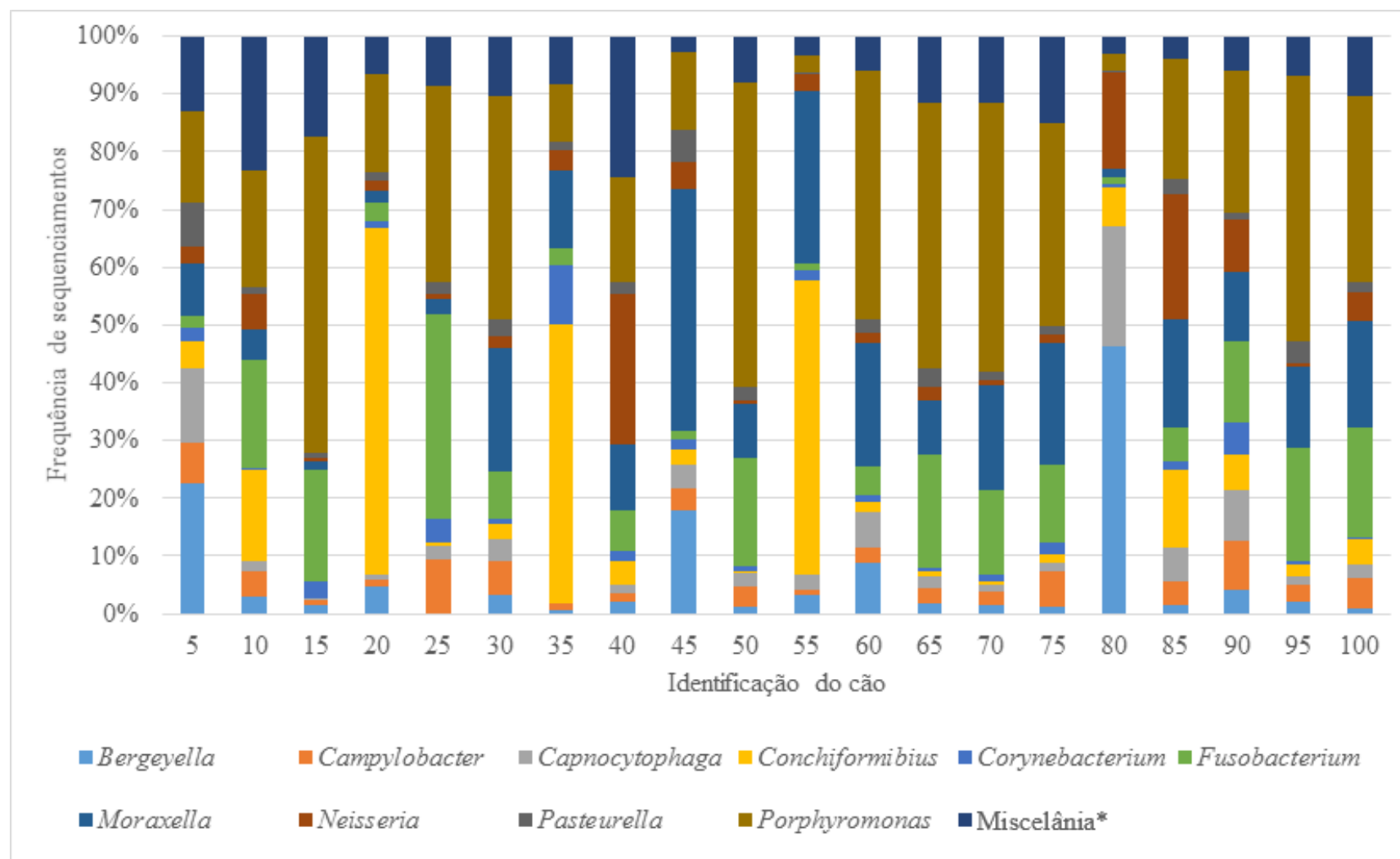
809



810

811 FIGURA 2: Número absoluto de sequenciamentos dos gêneros bacterianos mais frequentes obtidos na técnica de microbioma em 20 amostras de
 812 cavidade oral de cães hípidos. Botucatu, SP, 2020.

813 *Miscelânia = *Peptostreptococcus* spp., *Pseudomonas* spp., *Rothia* spp., *Serratia* spp., *Staphylococcus* spp., *Streptococcus* spp., entre outros.



814

815 FIGURA 3: Gêneros bacterianos mais frequentes identificados por sequenciamento em larga escala (microbioma) em 20 amostras de cavidade
 816 oral de cães hígidos. Botucatu, SP, 2020.

817 *Miscelânia = *Peptostreptococcus* spp., *Pseudomonas* spp., *Rothia* spp., *Serratia* spp., *Staphylococcus* spp., *Streptococcus* spp., entre outros.

818 5.5 Análise Estatística

819 Não foi encontrada associação estatística entre a identificação microbiológica ou
820 por técnicas moleculares dos isolados, a multirresistência e os dados epidemiológicos
821 dos animais ($p>0,05$).

823 6. DISCUSSÃO

824 O presente estudo identificou grande complexidade de micro-organismos de
825 origem bacteriana e fúngica na cavidade oral de 100 cães aparentemente hígidos
826 utilizando técnicas microbiológicas convencionais e moleculares de vanguarda
827 (espectrometria de massas e sequenciamento genético em larga escala), bem como
828 revelou elevada multirresistência dos isolados (19,2%) aos antimicrobianos. A
829 identificação de vários patógenos de potencial zoonótico, multirresistentes, na
830 microbiota bucal reforça o risco que acidentes por mordedura de cães representam para
831 os humanos, em virtude do contato estreito entre os *pets* e tutores.

832 O isolamento de vários tipos de colônias bacterianas nos meios de cultura
833 convencionais exigiu o uso de meios seletivos para certos gêneros de patógenos de
834 interesse, como *Pasteurella* e *Staphylococcus*. Para a caracterização em nível de espécie
835 destes micro-organismos foi utilizada a espectrometria de massas (MALDI-TOF), que
836 possibilitou a identificação de espécies até então pouco relatadas na literatura como
837 habitantes normais da cavidade oral de cães.

838 Entre as espécies do gênero *Pasteurella*, *P. multocida* e *P. canis* têm sido
839 descritas como predominantes na microbiota bucal de cães em estudos no Brasil
840 (BRAGA et al., 2005; FERREIRA et al., 2016) e em países como EUA (BAILIE et al.,
841 1978) e Eslovênia (SRECNIK et al., 2019). No entanto, a espectrometria de massas nos
842 100 cães estudados revelou maior prevalência de *P. stomatis*, raramente descrita na
843 literatura consultada. Apesar da baixa prevalência, a identificação de *P. multocida* na
844 cavidade oral de cães merece atenção no tocante ao risco zoonótico decorrente de
845 acidentes por mordedura de cães, uma vez que esta espécie já foi descrita em várias
846 complicações em humanos agredidos ou com contato próximo com animais. Neste
847 contexto, caso de meningite por *P. multocida* foi registrado em criança de sete semanas
848 de idade, na Inglaterra, após entrar em contato com a mão de outra pessoa lambida por
849 cão (WADE et al., 1999). Na França, em paciente adulto imunocompetente, sem

850 histórico de mordedura ou lambedura de cães, foi diagnosticada meningite causada por
851 *P. multocida* de linhagem similar ao isolado obtido da boca de seu cão, cujo diagnóstico
852 foi firmado por espectrometria de massas (BARDOU et al., 2015). Septicemia por *P.*
853 *multocida* também foi descrita na China em paciente idoso, imunocomprometido, após
854 lambedura em ferida aberta por cão doméstico (CHANG et al., 2007). A mesma
855 complicação clínica foi descrita, na Colômbia, em paciente com hábito de compartilhar
856 a comida com o cão (NAVARRO-NAVAJAS et al., 2019).

857 Assim como o gênero *Pasteurella*, as espécies pertencentes ao gênero *Neisseria*
858 como *N. zoodegmatis* e *N. animaloris* são habitantes comuns da cavidade oral de cães.
859 Estes micro-organismos têm sido descritos causando sinais pulmonares brandos em cães
860 e complicações clínicas em diferentes órgãos em humanos. Estudo retrospectivo na
861 Suécia, em 2013, relatou 13 pacientes humanos com idade média de 56 anos, cujas
862 secreções de feridas causadas por mordedura foram submetidas a cultivos
863 microbiológicos, que resultaram na identificação de *N. zoodegmatis* e *N. animaloris*
864 (HEYDECKE et al., 2013). A maioria dos pacientes apresentou sinais locais na região
865 da ferida, embora um tenha apresentado evolução para septicemia. Curiosamente, *N.*
866 *zoodegmatis* e *N. animaloris* foram as espécies de *Neisseria* mais prevalentes no
867 presente estudo, identificadas por espectrometria de massas (MALDI-TOF), alertando
868 para o potencial zoonótico destes agentes presentes na microbiota cavidade bucal de
869 cães hígidos.

870 Para o isolamento de estafilococos foi utilizado o meio de ágar ovo-telurito-
871 glicina-piruvato. As colônias negras, com duplo halo de lipólise, foram preliminarmente
872 classificadas como *S. aureus* após triagem bioquímica. No entanto, a análise por
873 espectrometria de massas identificou a grande maioria destes isolados como *S.*
874 *pseudintermedius* seguido, em menor frequência, por *S. intermedius* e *S. aureus*. A
875 mesma dificuldade de classificação foi relatada por Chuang et al. (2010), na China,
876 quando descreveram caso de septicemia causada por *S. pseudintermedius* em criança de
877 6 anos de idade com uso contínuo de cateter intravenoso para infusão de medicamentos
878 e histórico de contato recente com dois cães. De modo similar, Börjesson et al. (2015)
879 revelaram, em estudo na Suécia, que aproximadamente 13% das colônias de *S.*
880 *pseudintermedius* eram classificadas equivocadamente como *S. aureus*, sugerindo a
881 adoção de técnicas moleculares para diferenciação destas espécies.

882 *S. pseudintermedius* pertence ao grupo do *Staphylococcus intermedius* (SIG) e,
883 apesar de ser habitante comum da pele e mucosas de cães (WEESE, 2013; PIEREZAN

et al., 2016), tem o potencial de colonizar o organismo humano (KMIECIAK e SZEWCZYK, 2018). No entanto, devido à similaridade bioquímica com outras espécies, provavelmente tem sido subdiagnosticado ou subestimado como agente primário de infecções em humanos agredidos por mordeduras ou por contato estreito com cães. Neste contexto, *S. pseudintermedius* foi relatado, na França, em caso de endocardite em paciente que fazia uso de marca-passo (RIEGEL et al., 2011). Na Espanha, estudo de quatro casos de infecções de feridas em humanos causadas por *S. pseudintermedius* revelou que dois pacientes apresentavam isolados com padrões idênticos no perfil eletroforético e na sensibilidade microbiana *in vitro*, quando comparados aos isolados obtidos dos respectivos cães domésticos (LOZANO et al., 2017), indicando provável transmissão zoonótica de *S. pseudintermedius* dos cães para os tutores.

A prevalência de enterobactérias foi relativamente baixa na cavidade bucal entre os 100 cães amostrados, resultado que era esperado, em virtude da origem fecal destes micro-organismos. No entanto, o isolamento de espécies como *Escherichia coli* e *Klebsiella pneumoniae* pode encontrar justificativa no hábito de coprofagia de cães jovens ou mesmo de lambedura, que poderiam favorecer a presença transitória de enterobactérias na cavidade bucal. Ainda, faz-se importante mencionar o risco de infecções graves em humanos por estes agentes, como relatado em 2018, na Espanha, em idosa que evoluiu para óbito após desenvolver púrpura hemorrágica fulminante secundária à mordida de cão. Esta paciente apresentou extensas áreas de necrose cutânea e isolamento, em hemocultura, de *E. coli* e *Staphylococcus warneri* (RUIZ et al., 2018). Apesar de, na literatura consultada, não ser descrito nenhum caso de septicemia em humanos por *K. pneumoniae* secundária à mordida de cão, é conhecido que este agente comumente apresenta multirresistência aos antimicrobianos convencionais. Com efeito, a identificação de *K. pneumoniae* na mucosa oral de cães hígidos nos animais amostrados e em estudos similares (KASEMPIMOLPORN et al., 2003) alerta para o risco de infecções graves por este patógeno após mordedura de cães.

Streptococcus α-hemolítico foi identificado em 37% das amostras de cavidade bucal dos cães do presente estudo. Resultado similar foi obtido em estudo retrospectivo realizado entre 1995 e 1996, em 18 departamentos de emergências nos Estados Unidos, que revelou prevalência de 46% de estreptococos hemolíticos em feridas de humanos agredidos por cães denotando, também, o potencial zoonótico deste grupo de patógenos (TALAN et al., 1999).

918 *Pseudomonas* spp. foi identificado em baixa prevalência na microbiota oral dos
919 100 cães amostrados. No entanto, a presença deste patógeno na microbiota bucal de
920 cães hígidos alerta para a necessidade de abordagem terapêutica adequada das lesões
921 por mordedura de cães, visto que espécies do gênero *Pseudomonas*, particularmente *P.*
922 *aeruginosa*, têm sido relacionadas a graves infecções nosocomiais com elevada
923 resistência aos antimicrobianos convencionais, como as cefalosporinas (LANDMAN et
924 al., 2007).

925 *Chryseobacterium indologenes* e *C. gleum*, pertencentes ao antigo gênero
926 *Flavobacterium*, são patógenos descritos em graves infecções hospitalares em humanos,
927 particularmente em pacientes imunossuprimidos e, principalmente, com histórico de uso
928 de cateter e traqueotubos, considerados como agentes emergentes nos Estados Unidos
929 (MUKERJI et al., 2016). Apesar de comumente apresentar baixa patogenicidade em
930 indivíduos imunocompetentes, *C. indologenes* já foi descrito como agente causal de
931 septicemia em paciente na Índia sem histórico de hospitalização, assim como
932 procedimentos invasivos ou comorbidades imunossupressoras (BARUAH et al., 2016).
933 Apesar de baixa prevalência no presente estudo, a identificação de duas espécies deste
934 gênero na cavidade oral de cães hígidos indica risco de transmissão destes patógenos
935 entre cães e humanos.

936 *Aspergillus* spp. são micro-organismos fúngicos saprófitos descritos em
937 processos de sinusite e otite em cães, podendo desenvolver complicações no sistema
938 nervoso central (GOODALE et al., 2016; BENTLEY et al., 2018). No presente estudo,
939 isolados de *Aspergillus* spp. foram identificados na microbiota bucal de 10 (10%) cães.
940 No entanto, não foi encontrado na literatura consultada nenhum caso de identificação de
941 *Aspergillus* spp. na cavidade oral de cães hígidos, fato que dificultou confrontar este
942 achado com estudos similares. *Malassezia pachydermatis* foi a única levedura
943 identificada na cavidade oral dos 100 cães, em apenas 4% dos animais amostrados. Em
944 contraste, outros estudos no Brasil revelam o isolamento do mesmo agente em mais de
945 30% das amostras de suabes orais de cães (BRITO et al., 2009; SANTIN et al., 2013).

946 O fenômeno de resistência bacteriana é uma preocupação emergente, de ordem
947 mundial, e um dos problemas mais preocupantes no contexto atual de Saúde Única (*One*
948 *Health*) (CDC, 2013; WHO, 2014; McEWEN e COLLIGNON, 2018). No presente
949 estudo, os antimicrobianos mais efetivos diante dos isolados foram imipenem, ceftiofur
950 e amoxicilina/ácido clavulânico. Os dois últimos têm sido indicados para o tratamento
951 de infecções bucais de cães e, também, de feridas em humanos causadas por mordedura

de cães (MEYERS et al., 2008; OEHLER et al., 2009). Com efeito, na impossibilidade de realização de cultivo microbiológico e perfil de sensibilidade *in vitro*, estes fármacos podem ser considerados opções de tratamento para pacientes humanos agredidos por cães, particularmente animais errantes ou que evadem após a agressão. Apesar da alta sensibilidade dos isolados diante dos fármacos supracitados, tem-se ressaltado a importância da associação de antimicrobianos nos tratamentos, uma vez que as lesões causadas por mordedura de cães são consideradas polimicrobianas (MEYERS et al., 2008). Em contraste, alta resistência dos isolados de origem bacteriana foi observada para sulfametoxazol/trimetoprim (36,1%) e penicilina (35,2%), que pode ser justificada pelo uso contínuo destes fármacos, em medicina veterinária, há mais de 40 anos (ZAMBORI et al., 2013; BEAN e WIGMORE, 2016). A identificação de isolados bacterianos multirresistentes nas amostras de cavidade oral de cães do presente estudo reforça o risco de transmissão de bactérias resistentes para os humanos, a partir da microbiota bucal de cães. Ainda, fortalece a recomendação que o tratamento de feridas em humanos causadas por mordedura de cães deve ser respaldado em testes de sensibilidade *in vitro* dos isolados aos principais antimicrobianos.

A identificação do gene *mecA* em um isolado de *Staphylococcus aureus* e dois isolados de *S. pseudintermedius* obtidos de amostras de secreção oral dos 100 cães amostrados indica o risco de transmissão de bactérias resistentes entre cães e humanos. O gene de resistência *mecA* já foi descrito em isolados de *S. aureus* em espécimes clínicos provenientes de cães de países como Suécia (WIPF e PERRETEN, 2016), China (HUANG e CHOU, 2019), Polônia (KIZERWETTER-SWIDA et al., 2019) e Egito (FARGHALI et al., 2019). Além disso, Fessler et al. (2018) relataram a ocorrência de *S. aureus* e *S. pseudintermedius* meticilina-resistentes (MRSA e MRSP, respectivamente) em funcionários de hospital veterinário na Alemanha. De forma semelhante, Worthing et al. (2018) identificaram, na Austrália, ambas as espécies supracitadas carreando o gene *mecA* em cães, tutores e veterinários em dois hospitais veterinários, enaltecendo o risco de transmissão destes agentes resistentes entre cães e humanos no exercício da medicina veterinária ou secundário às infecções nosocomiais.

As 20 amostras de secreção oral de cães do presente estudo submetidas ao sequenciamento genético em larga escala (microbioma) revelaram grande complexidade de micro-organismos de origem bacteriana. No entanto, apenas 20% do total de 100 amostras de cães foram submetidas a esta técnica de última geração, o que pode ser considerado uma limitação do presente estudo.

Os gêneros *Pasteurella* e *Neisseria* foram detectados entre os 10 micro-organismos com maior número de sequenciamento em larga escala entre todas as amostras, bem como também foram identificados no cultivo microbiológico e por espectrometria de massas. O gênero *Neisseria* foi descrito em alta frequência utilizando sequenciamento genético em larga escala em amostras da cavidade oral de quatro cães e de seus tutores na Coréia do Sul (OH et al., 2015). Em contraste, tanto no presente estudo como no conduzido Oh et al. (2015), foi obtida elevada quantidade de sequenciamento dos gêneros *Fusobacterium* e *Porphyromonas*, bactérias anaeróbias estritas, que não foram isoladas utilizando técnicas de cultivo microbiológico convencionais. Assim, é lícito afirmar que o sequenciamento genético em larga escala é eficaz na identificação de populações de micro-organismos anaeróbios estritos na microbiota da cavidade oral de cães.

Em todas as 20 amostras submetidas ao microbioma foi identificado também elevado número de sequenciamentos de *Bergeyella* spp., habitante normal do trato respiratório superior e cavidade oral de cães (MURAMATSU et al., 2019). Digno de nota que este micro-organismo já foi isolado em casos de septicemia na China, em pacientes humanos sem histórico de mordedura de cães (LIN et al., 2007; CHEN et al., 2017), e na Espanha, em paciente agredido por mordedura (MONTEJO et al., 2001), ratificando o potencial zoonótico do patógeno.

Espécies do gênero *Capnocytophaga* também foram sequenciadas em alta quantidade nas 20 amostras de cavidade oral dos cães amostrados submetidas ao microbioma. O primeiro relato de identificação de *Capnocytophaga canimorsus* na saliva de cães foi realizado nos EUA (BAILIE et al., 1978). Após esta descrição, vários casos de infecções graves em humanos foram atribuídos a este patógeno após mordedura de cães. Neste contexto, na República Tcheca, paciente idoso apresentou meningite purulenta por *C. canimorsus* secundária à mordedura de cão (PRASIL et al., 2020). No Reino Unido, tutora idosa foi acometida por endocardite causada por *C. canimorsus* após ser arranhada por seu cão (SQUIRE e HETHERINGTON, 2020). Estudo retrospectivo envolvendo 484 casos de infecções em humanos por *C. canimorsus*, entre 1990 e 2014, revelou que em 60% houve histórico de mordedura e, em 27%, arranhões, lambidas ou outro tipo de contato com cães, com taxa de mortalidade de 26% (BUTLER, 2015). Assim, é possível inferir que as infecções em humanos por *C. canimorsus* são umas das mais preocupantes em ferimentos decorrentes

1019 de mordeduras, arranhões ou lambeduras de cães, posto a alta frequência e a gravidade
1020 dos sinais clínicos nos pacientes.

1021 Entre os demais agentes sequenciados com maior frequência no microbioma
1022 foram identificados *Campylobacter* spp., *Corynebacterium* spp. e *Moraxella* spp., já
1023 previamente descritos em secreções de feridas causadas por mordedura de cães nos
1024 EUA (TALAN et al., 1999; MERRIAM et al., 2003), Alemanha (FUNKE et al., 2010)
1025 e Reino Unido (BYGOTT et al., 2008).

1026 Curiosamente, não houve isolamento microbiológico, tampouco sequenciamento
1027 em larga escala de espécies pertencentes ao gênero *Clostridium*. Em contraste, Griffin e
1028 Holt (2001), nos EUA, identificaram *Clostridium* spp. em amostras de feridas humanas
1029 causadas por mordedura de cães, alertando que o diagnóstico de agentes anaeróbios
1030 deve ser contemplado na ocasião de lesões cutâneas em humanos, após a mordedura de
1031 cães.

1032 No presente estudo foi possível inferir a pluralidade de micro-organismos, por
1033 vezes de potencial zoonótico, na microbiota bucal de cães hígidos, bem como a elevada
1034 multirresistência de certos agentes bacterianos aos antimicrobianos convencionais. O
1035 conjunto destes achados alerta para a necessidade de evitar o contato estreito ou, por
1036 vezes, promíscuo com a cavidade bucal de cães, bem como nortear os tratamentos de
1037 humanos agredidos por mordeduras com respaldo na identificação dos patógenos nas
1038 lesões e em testes de sensibilidade microbiana *in vitro* dos isolados.

1039

1040 7. CONCLUSÕES

1041 ✓ Estafilococos, estreptococos e pasteurela foram os principais grupos de micro-
1042 organismos identificados por cultivo microbiológico e espectrometria de massas,
1043 reforçando a presença desses agentes na cavidade bucal de cães hígidos;

1044 ✓ O sequenciamento genético em larga escala revelou grande diversidade de
1045 bactérias aeróbias e anaeróbias na cavidade oral de cães hígidos, incluindo agentes não
1046 isolados em meios de cultura convencionais, confirmando a validade do microbioma
1047 para o estudo de humores orgânicos que contemplam populações de micro-organismos;

1048 ✓ Imipenem, amoxicilina/ácido clavulânico e cefalosporinas (ceftiofur e
1049 ceftriaxona) foram os antimicrobianos mais efetivos diante dos isolados, representando
1050 fármacos que podem ser indicados para infecções bucais em cães e, ocasionalmente, em

1051 humanos agredidos por mordeduras, na impossibilidade de isolamento do agente e
1052 testes de sensibilidade *in vitro*, particularmente nos casos de cães errantes ou que
1053 evadem após a agressão;

1054 ✓ Os isolados bacterianos apresentaram cerca de 20% de multirresistência,
1055 particularmente para sulfametoxazol/trimetoprim e penicilina, provavelmente pelo uso
1056 contínuo ou não racional, há décadas, destes antimicrobianos no tratamento de
1057 diferentes afecções de cães, que pode aumentar a pressão seletiva para bactérias
1058 resistentes;

1059 ✓ Grande complexidade de agentes foi identificada na microbiota bucal dos cães,
1060 incluindo patógenos já relatados em infecções em humanos pós-mordeduras, como
1061 *Pasteurella* sp., *Staphylococcus* sp. e *Capnocytophaga* sp., alertando para a necessidade
1062 de se evitar contato direto com a cavidade bucal dos animais e considerar as mordeduras
1063 de cães como lesões polimicrobianas e altamente contaminadas, bem como o risco de
1064 transmissão para os humanos de micro-organismos potencialmente zoonóticos,
1065 secundário às mordeduras de cães.

1066

1067

1068 **8. REFERÊNCIAS**

- 1069 ABRAHAMIAN, F.M.; GOLDSTEIN, E.J.C. Microbiology of Animal Bite Wound
1070 Infections. *Clinical Microbiology Reviews*, v.24, n.2, p.231-246, 2011.
- 1071 AFSHINNEKOO, E.; MEYDAN, C.; CHOWDHURY, S.; JAROUDI, D.; BOYER, C;
1072 BERNSTEIN, N.; MARTIZ, J.M.; REEVES, D.; GANDARA, J.;
1073 CHHANGAWALA, S.; AHSANUDDIN, S.; SIMMONS, A.; NESSEL, T.;
1074 SUNDARESH, B.; PEREIRA, E.; JORGENSEN, E.; KOLOKOTRONIS, S.O.;
1075 KIRCHBERGER, N.; GARCIA, I.; GANDARA, D.; DHANRAJ, S.; NAWRIN, T.;
1076 SALETOR, Y.; ALEXANDER, N.; VIJAY, P.; HÉNAFF, E.M.; ZUMBO, P.;
1077 WALSH, M.; O'MULLAN, G.D.; TIGHE, S.; DUDLEY, J.T., DUNAIF, A.;
1078 ENNIS, S.; O'HALLORAN, E.; MAGALHAES, T.R.; BOONE, B.; JONES, A.L.;
1079 MUTH, T.R.; PAOLANTONIO, K.S.; ALTER, E.; SCHADT, E.E.; GARBARINO,
1080 J.; PRILL, R.J.; CARLTON, J.M.; LEVY, S.; MASON, C.E. Geospatial Resolution
1081 of Human and Bacterial Diversity with City-Scale Metagenomics. *Cell Systems*, v.1,
1082 n.1, p.72-78, 2015.
- 1083 ANDRADE, S.F.; GIUFFRIDA, R. Quimioterápicos Antimicrobianos e Antibióticos.
1084 In: *Manual de Terapêutica Veterinária*. São Paulo: Roca, 2008. p.26-72.
- 1085 ARAHORI, M.; KUROSHIMA, H.; HORI, Y.; TAKAGI, S.; CHIJIWA, H.; FUJITA,
1086 K. Owners' view of their pets' emotions, intellect, and mutual relationship: Cats and
1087 dogs compared. *Behavioural Processes*, v.141, n.3, p.316-321, 2017.
- 1088 BAILIE, W.E.; STOWE, E.C.; SCHMITT, A.M. Aerobic bacterial flora of oral and
1089 nasal fluids of canines with reference to bacteria associated with bites. *Journal of*
1090 *Clinical Microbiology*, v.7, n.2, p.223-231, 1978.
- 1091 BARDOU, M.; HONNORAT, E.; DUBOURG, G.; COUDERC, C.; FOURNIER, P.E.;
1092 SENG, P.; STEIN, A. Meningitis caused by *Pasteurella multocida* in a dog owner
1093 without a dog bite: clonal lineage identification by MALDI-TOF mass spectrometry.
1094 *BMC Research Notes*, v.8, n.626, 2015.
- 1095 BARREIRO, J.R.; FERREIRA, C.R.; SANVIDO, G.B.; KOSTRZEWA, M.; MAIER,
1096 T.; WEGEMANN, B.; BOTTCHE, V.; EBERLIN, M.N.; SANTOS, M.V. Short
1097 communication: Identification of subclinical cow mastitis pathogens in milk by
1098 matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry. *Journal*
1099 *of Dairy Science*, v.93, p.5661-7, 2010.
- 1100 BARUAH, M.; LYGDOH, C.; LYGDOH, W.V.; TALUKDAR, R. Noncatheter-
1101 related bacteraemia due to *Chryseobacterium indologenes* in an immunocompetent
1102 patient. *Indian Journal of Medical Microbiology*, v.34, n.3, p.380-381, 2016.
- 1103 BEAN, D.C.; WIGMORE, S.M. Carriage rate and antibiotic susceptibility of coagulase-
1104 positive staphylococci isolated from healthy dogs in Victoria, Australia. *Australian*
1105 *Veterinary Journal*, v.94, n.12, p.456-460, 2016.
- 1106 BENTLEY, R.T.; TAYLOR, A.R.; THOMOVSKY, S.A. Fungal infections of the
1107 central nervous system in small animals: clinical features, diagnosis, and
1108 management. *The Veterinary Clinics of North America. Small Animal Practice*, v.48,
1109 n.1, 2018.
- 1110 BHATT, V.D.; AHIR, V.B.; KORINGA, P.G.; JAKHESARA, S.J.; RANK, D.N.;
1111 NAURIYAL, D.S.; KUNJADIA, A.P.; JOSHI, C.G. Milk microbiome signatures of
1112 subclinical mastitis-affected cattle analysed by shotgun sequencing. *Journal of*
1113 *Applied Microbiology*, v.112, n.4, p.639-650, 2012.
- 1114 BÖRJESSON, S.; GÓMEZ-SANZ, E.; EKSTRÖM, K.; TORRES, C.; GRÖNLUND,
1115 U. *Staphylococcus pseudintermedius* can be misdiagnosed as *Staphylococcus aureus*

- 1116 in humans with dog bite wounds. *European Journal of Clinical Microbiology &*
 1117 *Infectious Diseases*, v.34, p.839-834, 2015.
- 1118 BRAGA, C.A.S.B.; RESENDE, C.M.F.; PESTANA, A.C.N.R.; CARMO, L.S.;
 1119 COSTA, J.E.; SILVA, L.A.F.; ASSIS, L.N.; LIMA, L.A.; FARIAS, L.M.;
 1120 CARVALHO, M.A.R. Isolamento e identificação da microbiota periodontal de cães
 1121 da raça Pastor Alemão. *Ciência Rural*, v.35, n.2, p.385-390, 2005.
- 1122 BRITO, E.H.S.; FONTANELLE, R.O.S.; BRILHANTE, R.S.N.; CORDEIRO, R.A.;
 1123 MONTEIRO, A.J.; SIDRIM, J.J.C.; ROCHA, M.F.G. The anatomical distribution
 1124 and antimicrobial susceptibility of yeast species isolated from healthy dogs. *The*
 1125 *Veterinary Journal*, v.182, p.320-326, 2009.
- 1126 BROOK, I. Microbiology and management of human and animal bite wound infections.
 1127 *Primary Care*, v.30, n.1, p.25-39, 2003.
- 1128 BUTLER, T. *Capnocytophaga canimorsus*: an Emerging cause of sepsis, meningitis,
 1129 and post-splenectomy infection after dog bites. *European Journal of Clinical*
 1130 *Microbiology & Infectious Diseases*, v.34, n.7, p.1271-1280, 2015.
- 1131 BYGOTT, J.M.; MALNICK, H.; SHAH, J.J.; CHATTAWAY, M.A.; KARAS, A. First
 1132 clinical case of *Corynebacterium auriscanis* isolated from localized dog bite
 1133 infection. *Journal of Medical Microbiology*, v.57, p.899-900, 2008.
- 1134 CANATTO, B.D.; SILVA, E.A.; BERNARDI, F.; MENDES, M.C.N.C.; PARANHOS,
 1135 N.T.; DIAS, R.A. Caracterização demográfica das populações de cães e gatos
 1136 supervisionados do município de São Paulo. *Arquivo Brasileiro de Medicina*
 1137 *Veterinária e Zootecnia*, v.64, n.6, p.1515-1523, 2012.
- 1138 CAPELLAN, O.; HOLLANDER, J.E. Management of lacerations in the emergency
 1139 department. *Emergency Medicine Clinics of North America*, v.21, n.1, p.205-231,
 1140 2003.
- 1141 Centers for Disease Control (CDC). 2013. Antibiotic resistance threats in the United
 1142 States. Centers of Disease Control and Prevention, Atlanta, EUA.
- 1143 CHANG, K.; SIU, L.K.; CHEN, Y.H.; LU, P.L.; CHEN, T.C.; HSIEH, H.C.; LIN, C.L.
 1144 Fatal *Pasteurella multocida* septicemia and necrotizing fasciitis related with wound
 1145 licked by a domestic dog. *Scandinavian Journal of Infectious Disease*, v.39, p.167-
 1146 192, 2007.
- 1147 CHEN, Y.; LIAO, K.; AI, L.; GUO, P.; HUANG, H.; WU, Z.; LIU, M. Bacteremia
 1148 caused by *Bergeyella zoohelcum* in an infective endocarditis patient: case report and
 1149 review of literature. *BMC Infectious Diseases*, v.17, n.271, 2017.
- 1150 CHOMEL, B.B.; SUN, B. Zoonoses in the bedroom. *Emerging Infectious Diseases*,
 1151 v.17, n.2, p.167-172, 2011.
- 1152 CHUANG, C.Y.; YANG, Y.L.; HSUEH, P.R.; LEE, P.I. Catheter-related bacteremia
 1153 caused by *Staphylococcus pseudintermedius* refractory to antibiotic-lock therapy in a
 1154 hemophilic child with dog exposure. *Journal of Clinical Microbiology*, v.48, n.4,
 1155 p.1497-1498, 2010.
- 1156 CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE (CLSI). In:
 1157 *Performance Standards for Antimicrobial Disk and Dilution Susceptibility Tests for*
 1158 *Bacteria Isolated from Animals*. 3rd ed. CLSI supplement VET01S. Wayne, PA:
 1159 Clinical and Laboratory Standards Institute; 2015.
- 1160 CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE (CLSI). In:
 1161 *Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing*. 29th ed. CLSI
 1162 supplement M100. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2019.
- 1163 CONSELHO FEDERAL DE MEDICINA VETERINÁRIA (CFMV). Número de cães e
 1164 gatos nos lares brasileiros supera os 70 milhões e representa um desafio para a

- 1165 Medicina Veterinária. Disponível em <[http://portal.cfmv.gov.br/portal/noticia/](http://portal.cfmv.gov.br/portal/noticia/4255)
1166 4255>, 2015. Acesso em: 29/09/2019.
- 1167 DENDLE, C.; LOOKE, D. Animal Bites: An update for management with a focus on
1168 infections. *Emergency Medicine Australasia*, v.20, p.458-467, 2008.
- 1169 DIRE, D.J. Emergency management of dog and cat bite wounds. *Emergency Medicine*
1170 *Clinics of North America*, v.10, n.4, p.719-736, 1992.
- 1171 FARGHALI, H.A.; ABDELKADER, N.A.; ABUBAKR, H.O.; ALJUAYDI, S.;
1172 KHATTAB, M.S.; ELHELW, R.; ELHARIRI, M. Antimicrobial action of
1173 autologous platelet-rich plasma on MRSA-infected skin wounds in dogs. *Scientific*
1174 *Reports*, v.9, n.1, 2019.
- 1175 FERREIRA, T.S.P.; MORENO, L.Z.; FELIZARDO, M.R.; DE GOBBI, D.D.S.;
1176 FILSNER, P.H.L.N.; GOMES, V.T.M.; MORENO, M.; MORENO, A.M. Pheno-
1177 and genotypic characterization of *Pasteurella multocida* isolated from cats, dogs and
1178 rabbits from Brazil. *Comparative Immunology, Microbiology and Infectious*
1179 *Diseases*, v.45, p.48-52, 2016.
- 1180 FESSLER, A.T.; SCHUENEMANN, R.; KADLEC, K.; HENSEL, V.; BROMBACH,
1181 J.; MURUGAIYAN, J.; OECHTERING, G.; BURGNER, I.A.; SCHWARZ, S.
1182 Methicilin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) and methicillin-resistant
1183 *Staphylococcus pseudintermedius* (MRSP) among employees and in the environment
1184 of a small animal hospital. *Veterinary Microbiology*, v.221, p.153-158, 2018.
- 1185 FITZGERALD, J.R.; STURDEVANT, D.E.; MACKIE, S.M.; GILL, S.R.; MUSSER,
1186 J.M. Evolutionary genomics of *Staphylococcus aureus*: insights into the origin of
1187 methicillin-resistant strains and the toxic shock syndrome epidemic. *Proceedings of*
1188 *the National Academy of Sciences of the USA*, v.98, n.15, p.8821-8826, 2001.
- 1189 FREEDMAN, A.H.; GRONAU, I.; SCHWEIZER, R.M.; VECCHYO, D.O.D.; HAN,
1190 E.; SILVA, P.M.; GALAVERNI, M.; FAN, Z.; MARX, P.; LORENTE-GALDOS,
1191 B.; BEALE, H.; RAMIREZ, O.; HORMOZDIARI, F.; ALKAN, C.; VILÀ, C.;
1192 SQUIRE, K.; GEFFEN, E.; KUSAK, J.; BOYKO, A.R.; PARKER, H.G.; LEE, C.;
1193 TADIGOTLA, V.; SIEPEL, A.; BUSTAMANTE, C.D.; HARKINS, T.T.; NELSON,
1194 S.F.; OSTRANDER, E.A.; MARQUES-BONET, T.; WAYNE, R.K.; NOVEMBRE,
1195 J. Genome Sequencing Highlights the Dynamic Early History of Dogs. *PLoS*
1196 *Genetics*, v.10, n.1, 2014.
- 1197 FRIAS, D.F.R.; LAGES, S.L.S.; CARVALHO, A.A.B. Avaliação da conduta de
1198 profilaxia antirrábica indicada para pessoas envolvidas em agravos com cães e gatos
1199 no município de Jaboticabal, SP, no período de 2000 a 2006. *Revista Brasileira de*
1200 *Epidemiologia*, v.14, n.4, p.722-732, 2011.
- 1201 FUNKE, G.; ENGLERT, R.; FRODL, R.; BERNARD, K.A.; STENGER, S.
1202 *Corynebacterium canis* sp. nov., isolated from a wound infection caused by a dog
1203 bite. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, v.60, n.11,
1204 2010.
- 1205 GIGUÈRE, S.; PRESCOTT, J.F.; BAGGOT, J.D.; WALKER, R.D.; DOWLING, P.M.
1206 *Terapia Antimicrobiana em Medicina Veterinária*. São Paulo: Roca, 2010. 683p.
- 1207 GILBERT, J.A.; MEYER, F.; ANTONOPOULOS, D.; BALAJI, P.; BROWN, C.T.;
1208 BROWN, C.T.; DESAI, N.; EISEN, J.A.; EVERS, D.; FIELD, D.; FENG, W.;
1209 HUSON, D.; JANSSON, J.; KNIGHT, R.; KNIGHT, J.; KOLKER, E.;
1210 KONSTANTINDIS, K.; KOSTKA, J.; KYRPIDES, N.; MACKELPRANG, R.;
1211 MCHARDY, A.; QUINCE, C.; RAES, J.; SCZYRBA, A.; SHADE, A.; STEVENS,
1212 R. Meeting Report: The Terabase Metagenomics Workshop and the Vision of an
1213 Earth Microbiome Project. *Standards in Genomic Sciences*, v.3, n.3, p.243-8, 2010.

- 1214 GILBERT, J.A.; JANSSON, J.K.; KNIGHT, R. The Earth Microbiome project:
1215 successes and aspirations. *BMC Biology*, e.12:69, 2014.
- 1216 GONÇALVES, J.L.; TOMAZI, T.; BARREIRO, J.R.; BRAGA, P.A.C.; FERREIRA,
1217 C.R.; ARAÚJO JUNIOR, J.P.; EBERLIN, M.N.; SANTOS, M.V. Identification of
1218 *Corynebacterium* spp. isolated from bovine intramammary infections by matrix-
1219 assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry. *Veterinary*
1220 *Microbiology*, v.173, p.147-151, 2014.
- 1221 GOODALE, E.C.; OUTERBRIDGE, C.A.; WHITE, S.D. *Aspergillus* otitis in small
1222 animals – a retrospective study of 17 cases. *Veterinary Dermatology*, v.27, n.1, 2016.
- 1223 GOUGEON, A.J.; SIXOU, J.L.; SHACOORI, Z.T.; MALLET, M.B. Antimicrobial
1224 treatment of *Capnocytophaga* infections. *International Journal of Antimicrobial*
1225 *Agents*, v.29, n.4, p.367-373, 2007.
- 1226 GREENE, C.E. *Infectious Diseases of the Dog and Cat*. 4.ed. St. Louis: Saunders
1227 Elsevier, 2012.
- 1228 GRIFFIN, G.M.; HOLT, D.E. Dog-bite wounds: bacteriology and treatment outcome in
1229 37 cases. *Journal of the American Animal Hospital Association*, v.37, n.5, p.453-460,
1230 2001.
- 1231 HAN, M.G.; SANG, R.J.; JEONG, Y.E.; JU, Y.R.; CHO, J.E.; PARK, J.S.
1232 Epidemiologic Features of Animal 60 Bite Cases Occurring in Rabies-Endemic
1233 Areas of Korea, 2005 to 2009. *Osong Public Health and Research Perspectives*, v.3,
1234 n.1, p.14-18, 2012.
- 1235 HAND, D.; WALLIS, C.; COLYER, A.; PENN, C.W. Pyrosequencing the canine
1236 faecal microbiota: breadth and depth of biodiversity. *Plos One*, v.8, n.1, p.1-10,
1237 2013.
- 1238 HARPER, M.; BOYCE, J.D.; ADLER, B. *Pasteurella multocida* pathogenesis: 125
1239 years after Pasteur. *FEMS Microbiology Letters*, v.265, n.1, p.1-10, 2006.
- 1240 HEYEDECKE, A.; ANDERSSON, B.; HOLMDAHL, T.; MELHUS, A. Human wound
1241 infections caused by *Neisseria animaloris* and *Neisseria zoodegmatis*, former CDC
1242 Group EF-4^a and EF-4b. *Infection Ecology & Epidemiology*, v.3, n.1, 2013.
- 1243 HON, K.E.; FU, C.A.; CHOR, C.; TANG, P.H.; LEUNG, T.; MAN, C.; NG, P. Issues
1244 associated with dog bite injuries in children and adolescents assessed at the
1245 emergency department. *Pediatric emergency care*, v.23, n.7, p.445–449, 2007.
- 1246 HUANG, T.M.; CHOU, C.C. Methicilin-sensitive and methicillin-resistant
1247 *Staphylococcus aureus* strains and their toxin genes in the nostrils of dogs and
1248 workers at an animal shelter. *Journal of Applied Microbiology*, v.126, n.6, 2019.
- 1249 ISAIAH, A.; HOFFMANN, A.R.; KELLEY, R.; MUNDELL, P.; STEINER, J.M.;
1250 SUCHODOLSKI, J.S. Characterization of the nasal and oral microbiota of detection
1251 dogs. *Plos One*, v.12, n.9, p.1-16, 2017.
- 1252 KASEMPIMOLPORN, S.; BENJAVONGKULCHAI, M.; SAENGSEESOM, W.;
1253 SITPRIJA, V. Oral bacterial flora of dogs with and without rabies: a preliminary
1254 study in Thailand. *Journal of the Medical Association of Thailand = Chotmaiher*
1255 *Thangphaet*, v.86, n.12, p.1162-1166, 2003.
- 1256 KAWASHIMA, S.; MATSUKAWA, N.; UEKI, Y.; HATTORI, M.; OJIKI, K.
1257 *Pasteurella multocida* meningitis caused by kissing animals: a case report and review
1258 of the literature. *Journal of Neurology*, v.257, n.4, p.653-654, 2010.
- 1259 KING, M.D.; HUMPHREY, B.J.; WANG, Y.F.; KOURBATOVA, E.V.; RAY, S.M.;
1260 BLUMBERG, H.M. Emergence of Community-Acquired Methicillin-
1261 Resistant *Staphylococcus aureus* USA 300 Clone as the Predominant Cause of Skin
1262 and Soft-Tissue Infections. *Annals of Internal Medicine*, v.144, n.5, p.309-317, 2006.

- 1263 KIZERWETTER-SWIDA, M.; CHROBAK-CHMIEL, D.; RZEWUSKA, M. High
1264 level mupirocin resistance in methicillin-resistant staphylococci isolated from dogs
1265 and cats. *BMC Veterinary Research*, v.15, n.1, 2019.
- 1266 KMIĘCIAK, W.; SZEWCZYK, E.M. Are zoonotic *Staphylococcus pseudintermedius*
1267 strains a growing threat for humans? *Folia Microbiologica*, v.63, p.743-747, 2018.
- 1268 KNOBEL, D.L.; CLEAVELAND, S.; COLEMAN, P.G.; FÈVERE, E.M.; MELTZER,
1269 M.I.; MIRANDA, M.E.G.; SHAW, A.; ZINSSTAG, J.; MESLIN, F.X. Re-
1270 evaluating the burden of rabies in Africa and Asia. *Bulletin of the World Health*
1271 *Organization*, v.83, n.5, p.360-368, 2005.
- 1272 LACAZ, C.S.; PORTO, E.; MARTINS, J.E.C.; HEINS-VACCARI, E.M.;
1273 TAKAHASHI DE MELO, N. *Tratado de Micologia médica*. 9. ed. São Paulo:
1274 Sarvier, 2002. 1104p.
- 1275 LANDMAN, D.; BRATU, S.; KOCHAR, S.; PANWAR, M.; TREHAN, M.;
1276 DOYMAZ, M.; QUALE, J. Evolution of antimicrobial resistance among
1277 *Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter baumannii* and *Klebsiella pneumoniae* in
1278 Brooklyn, NY. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, v.60, n.1, 78-82, 2007.
- 1279 LEON, C.M.C.G. *Metataxonomia bacteriana do leite caprino por sequenciamento do*
1280 *gene 16S rRNA*. 2018. 97p. Tese (Doutorado Integrado em Zootecnia) –
1281 Universidade Federal da Paraíba, Areia.
- 1282 LEMSADDEK, T.S.; TAVARES, M.; BRAZ, S.B.; TAVARES, L.; OLIVEIRA, M.
1283 Enterococcal infective endocarditis following periodontal disease in dogs. *Plos One*,
1284 p.1-6, 2016.
- 1285 LIN, W.R.; CHEN, Y.S.; LIU, Y.C. Cellulitis and bacteremia caused by *Bergeyella*
1286 *zoohelcum*. *Journal of the Formosan Medical Association*, v.106, n.7, p.573-576,
1287 2007.
- 1288 LIN, W.; PATIL, P.M. Facial dog attack injuries. *Indian Journal of Surgery*, v.77, n.1,
1289 p.55-8, 2015.
- 1290 LION, C.; ESCANDE, F.; BURDIN, J.C. *Capnocytophaga canimorsus* infections in
1291 human: Review of the literature and cases report. *European Journal of*
1292 *Epidemiology*, v.12, p.521-533, 1996.
- 1293 LOZANO, C.; REZUSTA, A.; FERRER, I.; LAGUNA, V.P.; ZARAZAGA, M.; RIPA,
1294 L.R.; REVILLO, M.J.; TORRES, C. *Staphylococcus pseudintermedius* human
1295 infection cases in Spain: dog-to-human transmission. *Vector-Borne and Zoonotic*
1296 *Diseases*, v.17, n.4, 2017.
- 1297 MAATEN, T.S.; TURNER, D.; TILBURG, J.V.; VAARTEN, J. Benefits and Risks for
1298 People and Livestock of Keeping Companion Animals: Searching for a Healthy
1299 Balance. *Journal of Comparative Pathology*, v.155, n. 1, p. S8–S17, 2016.
- 1300 MACHADO, V.S.; OIKINOMOU, G.; BICALHO, M.L.S.; KNAUER, W.A.;
1301 GILBERT, R.; BICALHO, R.C. Investigation of postpartum dairy cows' uterine
1302 microbial diversity using metagenomic pyrosequencing of the 16S rRNA gene.
1303 *Veterinary Microbiology*, v.159, n.3-4, p.460-469, 2012.
- 1304 MAGIORAKOS, A.P.; SRINIVASAN, A.; CAREY, R.B.; CARMELI, Y.; FALAGAS,
1305 M.E.; GISKE, C.G.; HARBARTH, S.; HINDLER, J.F.; KAHLMETER, G.;
1306 LILJEQUIST, B.O.; PATERSON, D.L.; RICE, L.B.; STELLING, J.; STRUELENS,
1307 M.J.; VATOPOULOS, A.; WEBER, J.T.; MONNET, D.L. Multidrug-resistant,
1308 extensively drug-resistant and pandrug-resistant bacteria: an international expert
1309 proposal for interim standard definitions for acquired resistance. *Clinical*
1310 *Microbiology and Infection*, v.18, n.3, p.268-281, 2012.
- 1311 MAGNETTE, A.; HUANG, T.D.; RENZI, F.; BOGAERTS, P.; CORNELIS, G.R.;
1312 GLUPCZYNSKI, Y. Improvement of identification of *Capnocytophaga canimorsus*

- by matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry using enriched database. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, v.84, p.12-15, 2016.
- MANDELL, G.L.; BENNETT, J.E.; DOLIN, R. *Principles and practice of infectious diseases*. 6.ed. Elsevier Churchill Livingstone: EUA, v.2, 2005. 3661p.
- MARTINS, A.; CUNHA, M.L.R.S. Methicillin resistance in *Staphylococcus aureus* e coagulase-negative staphylococci: epidemiological and molecular aspects. *Microbiology and Immunology*, v.51, n.9, p.787-795, 2007.
- MCEWEN, S.A.; COLLIGNON, P.J. Antimicrobial resistance: a One Health perspective. *Microbiology Spectrum*, v.6, n.2, 2018.
- MEGID, J.; ITO, F.H. Raiva. In: MEGID, J.; RIBEIRO, M.G.; PAES, A.C. *Doenças Infeciosas em Animais de Produção e de Companhia*. Roca: Rio de Janeiro, 2016. p.799-824.
- MERRIAM, C.V.; FERNANDEZ, H.T.; CITRON, D.M.; TYRREL, K.L.; WARREN, Y.A.; GOLDSTEIN, E.J.C. Bacteriology of human bite wound infections. *Anaerobe*, v.9, p.83-86, 2003.
- MEYER, S.; SHIN, H.; CORNELIS, G.R. *Capnocytophaga canimorsus* resists phagocytosis by macrophages and blocks the ability of macrophages to kill other bacteria. *Immunobiology*, v.213, n. 9-10, p. 805-814, 2008.
- 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.360-8, 2008.
- MONTEJO, M.; AGUIRREBENGOA, K.; UGALDE, J.; LOPEZ, L.; SAEZ-NIETO, J.A.; HERNÁNDEZ, J.L. *Bergeyella zoohelcum* bacteremia after a dog bite. *Clinical Infectious Diseases*, v.33, n.9, p.1608-1609, 2001.
- MORGAN, M.; PALMER, J. Dog Bites. *British Medical Journal*, v.334, p.413-417, 2007.
- MUKERJI, R.; KAKARALA, R.; SMITH, S.J.; KUSZ, H.G. *Chryseobacterium indologenes*: an Emerging infection in the USA. *BMC Case Report*, 2016.
- MURAKAMI, K.; MINAMIDE, K.; WADA, K.; NAKAMURA, E.; TERAOKA, H.; WATANABE, S. Identification of methicillin-resistant strains of staphylococci by polymerase chain reaction. *Journal Clinical Microbiology*, v.29, p.2240-4, 1991.
- MURAMATSU, Y.; HARAYA, N.; HORIE, K.; UCHIDA, L.; KOORIYAMA, T.; SUZUKI, A.; HORIUCHI, M. *Bergeyella zoohelcum* isolated from oral cavities of therapy dogs. *Zoonoses and Public Health*, v.66, n.8, 2019.
- NASCIF JUNIOR, I.A.; SOUZA, A.M.P.; NONINO, M.A. Nível endêmico dos acidentes por mordeduras caninas no município de Franca-SP. In: 1º ENCONTRO NACIONAL DE EPIDEMIOLOGIA VETERINÁRIA. *Acta Scientiae Veterinariae*. 40 (Supl2). São Paulo, 2012. p. s126.
- NAVARRO-NAVAJAS, A.; ARIZA-ORDOÑEZ, N.; BARRERA, C. Bacteriemia por *Pasteurella multocida* asociada al contacto con un animal doméstico. *Revista Chilena de Infectologia*, v.36, n.5, p.667-669, 2019.
- NONNEMANN, B.; LYHS, U.; SVENNESEN, L.; KRISTENSEN, K.A.; KLAAS, I.C.; PEDERSEN, K. Bovine mastitis bacteria resolved by MALDI-TOF mass spectrometry. *Journal of Dairy Science*, v.102, n.3, p.2515-2524, 2019.
- NUNES, J.O.R. Caracterização de agravos causados por cães e gatos a seres humanos no município de Jaboticabal, São Paulo, durante o período de 2000 a 2009. In: 1º ENCONTRO NACIONAL DE EPIDEMIOLOGIA VETERINÁRIA. *Acta Scientiae Veterinariae*. 40 (Supl2). São Paulo, 2012. p. s80.

- OEHLER, R.L.; VELEZ, A.P.; MIZRACHI, M.; LAMARCHE, J.; GOMPF, S. Bite-related and septic syndromes caused by cats and dogs. *The Lancet Infectious Diseases*, v.9, n.7, p.439–447, 2009.
- OH, C.; LEE, K.; CHEONG, Y.; LEE, S.W.; PARK, S.Y.; SONG, C.S.; CHOI, I.S.; LEE, J.B. Comparison of the oral microbiomes of canines and their owners using next-generation sequencing. *Plos One*, v.10, n.7, 2015.
- OIKONOMOU, G.; MACHADO, V.S.; SANTISTEBAN, C.; SCHUKKEN, Y.H.; BICALHO, R.C. Microbial diversity of bovine mastitic milk as described by pyrosequencing of metagenomic 16S rDNA. *Plos One*, v.7, n.10, 2012.
- OIKONOMOU, G.; BICALHO, M.L.; MEIRA, E.; ROSSI, R.E.; FODITSCH, C.; MACHADO, V.S.; TEIXEIRA, A.G.V.; SANTISTEBAN, C.; SCHUKKEN, Y.H.; BICALHO, R.C. Microbiota of cow's milk; distinguishing healthy, sub-clinically and clinically diseased quarters. *Plos One*, v.9, n.1, p.1-11, 2014.
- OLIVEIRA, M.A. *Distribuição espaço-temporal de casos de agressões caninas em Belo Horizonte, 2007/2011*. 2013. 65p. Dissertação (Mestrado em Epidemiologia) – Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.
- OVERGAAUW, P.A.M.; ZUTPHEN, L.V.; HOEK, D.; YAYA, F.O.; ROELFSEMA, J.; PINELLI, E.; KNAPEN, F.V.; KORTBEEK, L.M. Zoonotic parasites in fecal samples and fur from dogs and cats in The Netherlands. *Veterinary Parasitology*, v.163, n.1-2, p.115-122, 2009.
- PEÑA, A.; ABARCA, K.; WEITZEL, T.; GALLEGOS, J.; CERDA, J.; GARCIA, P.; LÓPEZ, J. One Health in Practice: A Pilot Project for Integrated Care of Zoonotic Infections in Immunocompromised Children and Their Pets in Chile. *Zoonoses and Public Health*, v.63, n.5, p.403–409, 2016.
- PIEREZAN, F.; OLIVRY, T.; PAPS, J.S.; LAWHON, S.D.; WU, J.; STEINER, J.M.; SUCHODOLSKI, J.S.; HOFFMAN, A.R. The skin microbiome in allergen-induced canine atopic dermatitis. *Veterinary Dermatology*, v.27, n.5, p.332-e82, 2016.
- PRASIL, P.; RYSKOVA, L.; PLISEK, S.; BOSTIK, P. A rare case of purulent meningitis caused by *Capnocytophaga canimorsus* in the Czech Republic – case report and review of the literature. *BMC Infectious Diseases*, v.20, n.100, 2020.
- POLI, M. Mercado pet cresce graças a mudanças no comportamento dos donos de animais de estimação. **Você S/A Edição 223**, dez. 2016. Disponível em: <<https://exame.abril.com.br/carreira/mercado-pet-cresce-gracas-a-mudancas-no-comportamento-dos-donos-de-animais-de-estimacao/>>
- QUIGLEY, L.; MCCARTHY, R.; O'SULLIVAN, O.; BERESFORD, T.P.; FITZGERALD, G.F.; ROSS, R.P.; STANTON, C.; COTTER, P.D. The microbial content of raw and pasteurized cow milk as determined by molecular approaches. *Journal of Dairy Science*, v.96 n.8 p.4928-4937, 2013.
- QUINN, P.J.; MARKEY, B.K.; LEONARD, F.C.; FITZPATRICK, E.S.; FANNING, S.; HARTIGAN, P.J. *Veterinary Microbiology and Microbial Diseases*. 2.ed., UK: Wiley-Blackwell, 2011. 1231p.
- REMPE, B.; ALOI, M.; ISKYAN, K.; GODWIN, S.A.; TURNER, T. Evidence-Based Management of Mammalian Bite Wounds. *Pediatric Emergency Medicine Practice*, v.6, n.9, p.1-17, 2009.
- RIBEIRO, M.G. Princípios Terapêuticos na Mastite em Animais de Produção e de Companhia. In: Sílvia Franco Andrade. (Org.). *Manual de Terapêutica Veterinária*. 3ed. Roca: São Paulo, 2008. v. 1, p. 759-771.
- RIBEIRO, M.G.; RISSETI, R.M.; BOLAÑOS, C.A.; CAFFARO, K.A.; DE MORAIS, A.B.C.; LARA, G.H.; ZAMPROGNA, T.O.; PAES, A.C.; LISTONI, F.J.P.; FRANCO, M.M. *Trueperella pyogenes* multispecies infections in domestic animals:

- 1412 a retrospective study of 144 cases (2002 to 2012). *Veterinary Quarterly*, v.35, n.2,
1413 p.82-7, 2015.
- 1414 RIEGEL, P.; MOREL, L.J.; LEVANTIE, B.; BOISSET, S.; VANDENESCH, F.;
1415 PRÉVOST, G. Coagulase-positive *Staphylococcus pseudintermedius* from animals
1416 causing human endocarditis. *International Journal of Medical Microbiology*, v.301,
1417 p.237-239, 2011.
- 1418 ROZGONYI, F.; KOCSIS, E.; KRISTÓF, K.; NAGY, K. Is MRSA more virulent than
1419 MSSA? *Clinical Microbiology and Infection*, v.13, n.9, p.843-845, 2007.
- 1420 RUIZ, A.A.; CASTILLO, T.R.A.; SÁNCHEZ, J.M. Púrpura fulminante aguda
1421 infecciosa secundaria a una herida por mordedura de perro.
- 1422 SALERNO, T; PAES, A.C. Enfermidades pelos gêneros *Pasteurella* e *Mannheimia*. In:
1423 MEGID, J.; RIBEIRO, M.G.; PAES, A.C. *Doenças Infecciosas em Animais de*
1424 *Produção e de Companhia*. Roca: Rio de Janeiro, 2016. p.212-222.
- 1425 SANTIN, R.; MATTEI, A.S.; WALLER, S.B.; MADRID, I.M.; CLEFF, M.B.;
1426 XAVIER, M.O.; NOBRE, M.O.; NASCENTE, P.S.; MELLO, J.R.B.; MEIRELES,
1427 M.C.A. Clinical and mycological analysis of dog's oral cavity. *Brazilian Journal of*
1428 *Microbiology*, v.143, p.139-143, 2013.
- 1429 SANTOS, M.V., FONSECA, L.F.L. *Estratégias para controle de mastite e melhoria da*
1430 *qualidade do leite*. São Paulo: Manole, 2007. 314p.
- 1431 SAWANT, A.A.; HEGDE, N.V.; STRALEY, B.A.; DONALDSON, S.C.; LOVE, B.C.;
1432 KNABEL, S.J.; JAYARAO, R.M. Antimicrobial-Resistant Enteric Bacteria from
1433 Dairy Cattle. *Applied and Environmental Microbiology*, v.73, p.156-163, 2007.
- 1434 SHULER, C.M.; DEBESS, E.E.; LAPIDUS, J.A.; HEDBERG, K. Canine and human
1435 factors related to dog bite injuries. *Journal of the American Veterinary Medical*
1436 *Association*, v.232, n.4, p.542-546, 2008.
- 1437 SINGHAL, N.; KUMAR, M.; KANAUIA, P.K.; VIRDI, J.S. MALDI-TOF mass
1438 spectrometry: an emerging technology for microbial identification and diagnosis.
1439 *Frontiers in Microbiology*, v.6, p.1-16, 2015.
- 1440 SOBESTIANSKY, J.; BARCELLOS, D. *Doenças dos Suínos*. 2.ed. Goiânia: Cânone,
1441 2012. 959p.
- 1442 SQUIRE, G.; HETHERINGTON, S. First reported case of lead-related infective
1443 endocarditis secondary to *Capnocytophaga canimorsus*: "Dog scratch" endocarditis.
1444 *BMJ Case Reports*, v.13, n.2, 2020.
- 1445 SRECNİK, S.; ZDOVC, I.; JAVORSEK, U.; PIRS, T.; PAVLICA, Z.; NEMEC, A.
1446 Microbiological aspects of naturally occurring primary endodontic infections in
1447 dogs. *Journal of Veterinary Dentistry*, v.36, n.2, p.124-128, 2019.
- 1448 STURGEON, A.; STULL, J.W.; COSTA, M.C.; WEESE, J.S. Metagenomic analysis of
1449 the canine oral cavity as revealed by high-throughput pyrosequencing of the 16S
1450 rRNA gene. *Veterinary Microbiology*, v.162, n.2-4, p.891-898, 2013.
- 1451 TALAN, D.A.; CITRON, D.M.; ABRAHAMIAN, F.M.; MORAN, G.J.; GOLDSTEIN,
1452 E.J.C. Bacteriology analysis of infected dog and cat bites. *The New England Journal*
1453 *of Medicine*, v.340, n.2, p.85-92, 1999.
- 1454 TATIBANA, L.S.; COSTA-VAL, A.P. Relação homem-animal de companhia e o papel
1455 do médico veterinário. *Revista Veterinária e Zootecnia em Minas*, p.12-18, 2009.
- 1456 TAVARES, W. *Antibióticos e Quimioterápicos para o Clínico*. São Paulo: Atheneu,
1457 2007. 585p.
- 1458 THOMPSON, L.R.; SANDERS, J.G.; MCDONALD, D.; AMIR, A.; LADAU, J.;
1459 LOCEY, K.J.; PRILL, R.J.; TRIPATHI, A.; GIBBONS, S.M.; ACKERMANN, G.;
1460 NAVAS-MOLINA, J.A.; JANSSEN, S.; KOPYLOVA, E.; VÁZQUEZ-BAEZA, Y.;
1461 GONZÁLEZ, A.; MORTON, J.T.; MIRARAB, S.; XU, Z.Z.; JIANG, L.; HAROON,

- 1462 M.F.; KANBAR, J.; ZHU, Q.; SONG, S.J.; KOSCIOLEK, T.; BOKULICH, N.A.;
 1463 LEFLER, J.; BRISLAWN, C.J.; HUMPHREY, G.; OWENS, S.M.; HAMPTON-
 1464 MARCELL, J.; BERG-LYONS, D.; MCKENZIE, V.; FIERER, N.; FUHRMAN,
 1465 J.A.; CLAUSET, A.; STEVENS, R.L.; SHADE, A.; POLLARD, K.S.; GOODWIN,
 1466 K.D.; JANSSON, J.K.; GILBERT, J.A.; KNIGHT, R. The Earth Microbiome Project
 1467 Consortium. A communal catalogue reveals Earth's multiscale microbial diversity.
 1468 *Nature*, v.551, p.457-463, 2017.
- 1469 THRUSFIELD, M. *Veterinary Epidemiology*. 3th edn, Blackwell Publishing. United
 1470 Kingdom: Oxford, 2007. 626p.
- 1471 TRABULSI, L.R.; SAMPAIO, M.C. Microbiota ou flora normal do corpo humano. In:
 1472 TRABULSI, L.R.; ALTHERTUM, F. *Microbiologia*. Atheneu: São Paulo, 2005. p.
 1473 101-109.
- 1474 TRIOLA, M.F. *Introdução à Estatística*. 9ª ed. LTC: Rio de Janeiro, 2005. 682p.
- 1475 URSELL, L.K.; METCALF, J.L.; PARFREY, L.W.; KNIGHT, R. Defining the human
 1476 microbiome. *Nutrition reviews*, v.70, p.38-44, 2012.
- 1477 VIANA, L.; GONÇALVES, R.C.; OLIVEIRA FILHO, J.P.; PAES, A.C.; AMORIM,
 1478 R.M. Ocorrência de *Mannheimia haemolytica* e de *Pasteurella multocida* em ovinos
 1479 sadios e com enfermidade respiratória. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e*
 1480 *Zootecnia*, v.59, n.6, p.1579-1582, 2007.
- 1481 VELEZ, M.; CASANASA, B.; GREENE, J.N.; MOREY, J.; MASTROIANNI, D.;
 1482 OEHLER, R. *Pasteurella multocida* infections in cancer patients. *Asian Biomedicine*,
 1483 v.4, n.3, p.449-455, 2010.
- 1484 WADE, T.; BOOY, R.; TEARE, E.L.; KROLL, S. *Pasteurella multocida* meningitis I
 1485 infancy – (a lick may be as bad as bite). *European Journal of Pediatrics*, v.158,
 1486 p.875-878, 1999.
- 1487 WEESE, J.S. The canine and feline skin microbiome in health and disease. *Veterinary*
 1488 *Dermatology*, v.24, p.137-e31, 2013.
- 1489 WEISS, H.B.; FRIEDMAN, D.I.; COBEN, J.H. Incidence of dog bite injuries treated in
 1490 emergency departments. *Journal of the American Medical Association*, v.279, n.1,
 1491 p.51-53, 1998.
- 1492 WILSON, B.A.; HO, M. *Pasteurella multocida*: from Zoonosis to Cellular
 1493 Microbiology. *Clinical Microbiology Reviews*, v.26, n.3, p.631-655, 2013.
- 1494 WIPF, J.R.; PERRETEN, V. Methicilin-resistant *Staphylococcus aureus* isolated from
 1495 dogs and cats in Switzerland. *Schweiz Archiv fur Tierheilkunde*, v.158, n.6, 2016.
- 1496 WOLFF, K.D. Management of animal bite injuries of the face: Experience with 94
 1497 patients. *Journal of Oral and Maxillofacial Surgery*, v.56, n.7, p.838-843, 1998.
- 1498 World Health Organization (WHO). 2014. Antimicrobial resistance: global report on
 1499 surveillance. WHO, Geneva, Suíça.
- 1500 WORTHING, K.A.; BROWN, J.; GERBER, L.; TROTT, D.J.; ABRAHAM, S.;
 1501 NORRIS, J.M. Methicilin-resistant staphylococci amongst veterinary personnel,
 1502 personnel-owned pets, patients and hospital environment of two small animal
 1503 veterinary hospitals. *Veterinary Microbiology*, v.223, p.79-85, 2018.
- 1504 ZAITZ, C.; CAMPBELL, I.; MARQUES, S.A.; RUIZ, L.R.B.; SOUZA, V.M.
 1505 *Compêndio de Micologia Médica*. Medsi: Rio de Janeiro, 1998. 434p.
- 1506 ZAMBORI, C.; CUMPANASOIU, C.; BIANCA, M.; TIRZIU, E. Biofilms in oral
 1507 cavity of dogs and implication in zoonotic infections. *Scientific Papers: Animal*
 1508 *Science and Biotechnologies*, v.46, n.1, p.155-158, 2013.

1511 **ANEXO – QUESTIONÁRIO EPIDEMIOLÓGICO**

1512

1513

1514

DADOS DO ANIMAL:

1515

1516 Nome: _____ Raça: _____ Idade: _____ Sexo: _____ ID: _____

1517

1518 Tipo de alimentação: () Ração () Comida caseira () Ambos

1519 Comportamento: () Dócil () Agressivo

1520 Vacinação antirrábica: () Atualizada () Desatualizada

1521 Hist. de agressões: () Tutores () Contactantes () Profissionais () Animais () Desconhecidos

1522 Presença de crianças na residência: () Sim () Não

1523 Animal frequenta o interior da residência? () Sim () Não

1524 Animal tem o hábito de compartilhar a cama com algum morador? () Sim () Não

1525 Com qual frequência realiza higienização bucal?

1526 () Todos os dias () 3x/semana () 2x/semana () 1x/semana () A cada 15 dias () Nunca

1527 Animal recebeu tratamento antimicrobiano nos últimos 30 dias? () Sim () Não

1528 **DADOS DO PROPRIETÁRIO:**

1529 Nome: _____

1530 Endereço: _____

1531 Telefone: (____) _____ - _____

TRABALHO CIENTÍFICO

Trabalho a ser enviado para a revista *Microbial Pathogenesis*

NORMAS DA REVISTA:**NEW SUBMISSIONS**

Submission to this journal proceeds totally online and you will be guided stepwise through the creation and uploading of your files. The system automatically converts your files to a single PDF file, which is used in the peer-review process. As part of the Your Paper Your Way service, you may choose to submit your manuscript as a single file to be used in the refereeing process. This can be a PDF file or a Word document, in any format or layout that can be used by referees to evaluate your manuscript. It should contain high enough quality figures for refereeing. If you prefer to do so, you may still provide all or some of the source files at the initial submission. Please note that individual figure files larger than 10 MB must be uploaded separately.

References

There are no strict requirements on reference formatting at submission. References can be in any style or format as long as the style is consistent. Where applicable, author(s) name(s), journal title/ book title, chapter title/article title, year of publication, volume number/book chapter and the article number or pagination must be present. Use of DOI is highly encouraged. The reference style used by the journal will be applied to the accepted article by Elsevier at the proof stage. Note that missing data will be highlighted at proof stage for the author to correct.

Formatting requirements

There are no strict formatting requirements but all manuscripts must contain the essential elements needed to convey your manuscript, for example Abstract, Keywords, Introduction, Materials and Methods, Results, Conclusions, Artwork and Tables with Captions. If your article includes any Videos and/or other Supplementary material, this should be included in your initial submission for peer review purposes. Divide the article into clearly defined sections.

Figures and tables embedded in text

Please ensure the figures and the tables included in the single file are placed next to the relevant text in the manuscript, rather than at the bottom or the top of the file. The corresponding caption should be placed directly below the figure or table.

ARTICLE STRUCTURE

Subdivision - numbered sections

Divide your article into clearly defined and numbered sections. Subsections should be numbered 1.1 (then 1.1.1, 1.1.2, ...), 1.2, etc. (the abstract is not included in section numbering). Use this numbering also for internal cross-referencing: do not just refer to 'the text'. Any subsection may be given a brief heading. Each heading should appear on its own separate line.

Introduction

State the objectives of the work and provide an adequate background, avoiding a detailed literature survey or a summary of the results.

Material and methods

Provide sufficient details to allow the work to be reproduced by an independent researcher. Methods that are already published should be summarized, and indicated by a reference. If quoting directly from a previously published method, use quotation marks and also cite the source. Any modifications to existing methods should also be described.

Results

Results should be clear and concise.

Discussion

This should explore the significance of the results of the work, not repeat them. A combined Results and Discussion section is often appropriate. Avoid extensive citations and discussion of published literature.

Conclusions

The main conclusions of the study may be presented in a short Conclusions section, which may stand alone or form a subsection of a Discussion or Results and Discussion section.

Glossary

Please supply, as a separate list, the definitions of field-specific terms used in your article.

Appendices

If there is more than one appendix, they should be identified as A, B, etc. Formulae and equations in appendices should be given separate numbering: Eq. (A.1), Eq. (A.2), etc.; in a subsequent appendix, Eq. (B.1) and so on. Similarly for tables and figures: Table A.1; Fig. A.1, etc.

ESSENTIAL TITLE PAGE INFORMATION

- **Title.** Concise and informative. Titles are often used in information-retrieval systems. Avoid abbreviations and formulae where possible.

- **Author names and affiliations.** Please clearly indicate the given name(s) and family name(s) of each author and check that all names are accurately spelled. You can add your name between parentheses in your own script behind the English transliteration. Present the authors' affiliation addresses (where the actual work was done) below the names. Indicate all affiliations with a lowercase superscript letter immediately after the author's name and in front of the appropriate address. Provide the full postal address of each affiliation, including the country name and, if available, the e-mail address of each author.

- **Corresponding author.** Clearly indicate who will handle correspondence at all stages of refereeing and publication, also post-publication. This responsibility includes answering any future queries about Methodology and Materials. **Ensure that the e-mail address is given and that contact details are kept up to date by the corresponding author.**

• **Present/permanent address.** If an author has moved since the work described in the article was done, or was visiting at the time, a 'Present address' (or 'Permanent address') may be indicated as a footnote to that author's name. The address at which the author actually did the work must be retained as the main, affiliation address. Superscript Arabic numerals are used for such footnotes.

Abstract

A concise and factual abstract is required. The abstract should state briefly the purpose of the research, the principal results and major conclusions. An abstract is often presented separately from the article, so it must be able to stand alone. For this reason, References should be avoided, but if essential, then cite the author(s) and year(s). Also, non-standard or uncommon abbreviations should be avoided, but if essential they must be defined at their first mention in the abstract itself.

Keywords

Immediately after the abstract, provide a maximum of 6 keywords, using American spelling and avoiding general and plural terms and multiple concepts (avoid, for example, 'and', 'of'). Be sparing with abbreviations: only abbreviations firmly established in the field may be eligible. These Keywords will be used for indexing purposes.

Abbreviations

Define abbreviations that are not standard in this field in a footnote to be placed on the first page of the article. Such abbreviations that are unavoidable in the abstract must be defined at their first mention there, as well as in the footnote. Ensure consistency of abbreviations throughout the article.

Acknowledgements

Collate acknowledgements in a separate section at the end of the article before the references and do not, therefore, include them on the title page, as a footnote to the title or otherwise. List here those individuals who provided help during the research (e.g., providing language help, writing assistance or proof reading the article, etc.). List funding sources in this standard way to facilitate compliance to funder's requirements:

Funding: This work was supported by the National Institutes of Health [grant numbers xxxx, yyyy]; the Bill & Melinda Gates Foundation, Seattle, WA [grant number zzzz]; and the United States Institutes of Peace [grant number aaaa].

If no funding has been provided for the research, please include the following sentence: This research did not receive any specific grant from funding agencies in the public, commercial, or not-for-profit sectors.

Units

Follow internationally accepted rules and conventions: use the international system of units (SI). If other units are mentioned, please give their equivalent in SI.

Math formulae

Please submit math equations as editable text and not as images. Present simple formulae in line with normal text where possible and use the solidus (/) instead of a horizontal line for small fractional terms, e.g., X/Y . In principle, variables are to be presented in italics. Powers of e are often more conveniently denoted by $\exp$. Number consecutively any equations that have to be displayed separately from the text (if referred to explicitly in the text).

Footnotes

Footnotes should be used sparingly. Number them consecutively throughout the article. Many word processors build footnotes into the text, and this feature may be used. Should this not be the case, indicate the position of footnotes in the text and present the footnotes themselves separately at the end of the article.

Tables

Please submit tables as editable text and not as images. Tables can be placed either next to the relevant text in the article, or on separate page(s) at the end. Number tables consecutively in accordance with their appearance in the text and place any table notes below the table body. Be sparing in the use of tables and ensure that the data presented in them do not duplicate results described elsewhere in the article. Please avoid using vertical rules and shading in table cells.

***In vitro* antimicrobial resistance and oral microbiota of dogs diagnosed by microbiome and mass spectrometry**

Authors: Fábio V. R. Portilho^a | Juliano Nóbrega^b | Beatriz Oliveira de Almeida^a | André R. Mota^a | Carolina L. de Paula^a | Lorrayne S. A. Martins^a | Fernando J. P. Listoni^a | Sandra M. G. Bosco^c | Alana Lucena Oliveira^c | Maria de Lourdes R. R. Cunha^c | Márcio G. Ribeiro^a

Affiliations:

^a UNESP - São Paulo State University, Department of Animal Production and Preventive Veterinary Medicine, School of Veterinary Medicine and Animal Sciences, Botucatu, State of São Paulo, Brazil.

^b UNESP - São Paulo State University, Department of Veterinary Clinical Sciences, School of Veterinary Medicine and Animal Sciences, Botucatu, São Paulo, Brazil.

^c UNESP - São Paulo State University, Department of Chemical and Biological Sciences, Sector of Microbiology and Immunology, Institute of Biosciences, Botucatu, São Paulo, Brazil.

Address of authors:

Fábio Vinícius Ramos Portilho: Post-graduate student in Veterinary Medicine. Department of Animal Production and Preventive Veterinary Medicine, School of Veterinary Medicine and Animal Sciences, UNESP, Botucatu, SP, Brazil. 18618-681. Phone: +55 14 3880.2100. Email: fv_portilho@hotmail.com

Juliano Nóbrega: Post-graduate student in Veterinary Medicine. Department of Veterinary Clinical Sciences, School of Veterinary Medicine and Animal Sciences, UNESP, Botucatu, SP, Brazil. 18618-681. Phone: +55 14 3880.2064. Email: nobrega.vet@hotmail.com

Beatriz Oliveira de Almeida: Post-graduate student in Veterinary Medicine. Department of Animal Production and Preventive Veterinary Medicine, School of Veterinary Medicine and Animal Sciences, UNESP, Botucatu, SP, Brazil. 18618-681. Phone: +55 14 3880.2100. Email: bia_oa@hotmail.com

André da Rocha Mota: Post-graduate student in Veterinary Medicine. Department of Animal Production and Preventive Veterinary Medicine, School of Veterinary Medicine

1734 and Animal Sciences, UNESP, Botucatu, SP, Brazil. 18618-681. Phone: +55 14
1735 3880.2100. Email: andremota5@hotmail.com

1736 **Carolina Lechinski de Paula:** Post-graduate student in Veterinary Medicine.
1737 Department of Animal Production and Preventive Veterinary Medicine, School of
1738 Veterinary Medicine and Animal Sciences, UNESP, Botucatu, SP, Brazil. 18618-681.
1739 Phone: +55 14 3880.2100. Email: ca_lechinski@yahoo.com.br

1740 **Lorrayne de Souza Araújo Martins:** Post-graduate student in Veterinary Medicine.
1741 Department of Animal Production and Preventive Veterinary Medicine, School of
1742 Veterinary Medicine and Animal Sciences, UNESP, Botucatu, SP, Brazil. 18618-681.
1743 Phone: +55 14 3880.2100. Email: lorrynevet@hotmail.com

1744 **Fernando José Paganini Listoni:** Laboratory of Veterinary Microbiology. Department
1745 of Animal Production and Preventive Veterinary Medicine, School of Veterinary
1746 Medicine and Animal Sciences, UNESP, Botucatu, SP, Brazil. 18618-681. Phone: +55
1747 14 3880.2100. Email: fernando.listoni@fmvz.unesp.br

1748 **Sandra de Moraes Gimenes Bosco:** Professor of Microbiology. Department of
1749 Chemical and Biological Sciences, Sector of Microbiology and Immunology, Institute
1750 of Biosciences, Botucatu, São Paulo, Brazil. 18618-689. Phone: +55 14 3880.0434.
1751 Email: sandra.bosco@unesp.br

1752 **Alana Lucena Oliveira:** Post-graduate student in Veterinary Medicine. Department of
1753 Chemical and Biological Sciences, Sector of Microbiology and Immunology, Institute
1754 of Biosciences, Botucatu, São Paulo, Brazil. 18618-689. Phone: +55 17 98199.6620.
1755 Email: alanalucenaoliveira@gmail.com

1756 **Maria de Lourdes R. S. da Cunha:** Professor of Microbiology. Department of
1757 Chemical and Biological Sciences, Sector of Microbiology and Immunology, Institute
1758 of Biosciences, Botucatu, São Paulo, Brazil. 18618-689. Phone: +55 14 3880.0428.
1759 Email: mlrs.cunha@unesp.br

1760 **Márcio Garcia Ribeiro:** Professor of Infectious Diseases of Domestic Animals.
1761 Department of Animal Production and Preventive Veterinary Medicine, School of
1762 Veterinary Medicine and Animal Sciences, UNESP, Botucatu, São Paulo, Brazil.
1763 Phone: +55 14 3880.2102. Email: marcio.ribeiro@unesp.br

1764

1765 **Correspondence:**

1766 **Márcio Garcia Ribeiro:** Professor of Infectious Diseases of Domestic Animals.
1767 Department of Animal Production and Preventive Veterinary Medicine, School of

1768 Veterinary Medicine and Animal Sciences, UNESP-São Paulo State University,
 1769 Botucatu, SP, Brazil. 18618-681. Phone: +55 14 3880.2102. Email:
 1770 marcio.ribeiro@unesp.br

1771

1772 **ABSTRACT**

1773

1774 The close relationship between humans and companion animals in recent decades has
 1775 strongly increased the risk of transmission of pathogens from pets-to-humans. The
 1776 microbiota of the oral cavity from companion animals is polymicrobial and these agents
 1777 may potentially infect humans through bites or by direct contact with mucous
 1778 membranes or cutaneous lesions. Nonetheless, the identification of these
 1779 microorganisms by molecular techniques (microbiome, proteomics) is scarce. Besides,
 1780 the *in vitro* microbial susceptibility pattern of oral bacterial and microbiota from dogs
 1781 and the etiology of agents involved in human bites are not fully understood, since many
 1782 dogs are homeless and/or evade after aggression. The present study investigated the
 1783 presence of bacterial and fungal agents in the oral cavity of 100 healthy dogs based on
 1784 conventional microbiological culture, large-scale DNA sequencing (microbiome), and
 1785 matrix-assisted laser desorption ionization time of flight mass spectrometry (MALDI-
 1786 TOF MS). *In vitro* antimicrobial susceptibility profile of the isolates was assessed as
 1787 well. A total of 213 bacterial and 20 fungal microorganisms were identified. The most
 1788 prevalent bacterial agents diagnosed by microbiological culture and mass spectrometry
 1789 were *Staphylococcus pseudintermedius* (40/100=40%), α -hemolytic *Streptococcus*
 1790 (37/100=37%), and *Pasteurella stomatis* (22/100=22%), whereas the most common
 1791 genus of fungi was *Aspergillus* (10/100=10%). Imipenem (207/213=97.2%), ceftiofur
 1792 (196/213=92%), and amoxicillin/clavulanic acid (194/213=91.1%) were the most
 1793 effective antimicrobials. Conversely, the highest resistance of isolates was observed to
 1794 sulfamethoxazole/trimethoprim (77/213=36.1%), penicillin (75/213=35.2%), and
 1795 azithromycin (48/213=22.5%). Multidrug resistance was identified in 18.8% of the
 1796 bacterial isolates (40/213), in addition to the detection of the resistance gene *mecA* in
 1797 three isolates of coagulase-positive staphylococci (3/49=6.1%) (one *S. aureus* and two
 1798 *S. pseudintermedius*). In large-scale sequencing, the most predominant genera were
 1799 *Porphyromonas* (32.5%), *Moraxella* (16.3%), *Fusobacterium* (12.8%), and
 1800 *Conchiformibius* (9.5%). Less frequently, there were identified *Bergeyella* spp. (5%),
 1801 *Campylobacter* spp. (3.8%), and *Capnocytophaga* spp. (3.4%). High complexity of

agents was identified in oral microbiota of apparently healthy dogs, including pathogens with zoonotic potential. Also, isolates revealed a high multidrug resistance to conventional antimicrobials, an emergent public health issue. Overall, the polymicrobial nature of oral microbiota of dogs and multi-resistance of the agents to conventional drugs highlights the potential risk of contaminated lesions caused by bites from dogs-to-humans, and need for treatment of these lesions based on etiology identification with a combination of methods, and antimicrobial susceptibility pattern.

Key-words: oral cavity, dog bites, large scale sequencing, MALDI-TOF.

Funding information

We appreciate the support of São Paulo Research Foundation (FAPESP; protocol 2018/07345-7).

1. INTRODUCTION

The population of dogs and cats has significantly increased globally, and close contact with their owners may favor the transmission of some pathogens, particularly those with zoonotic potential, which is a public health issue (OEHLER et al., 2009; ESCH and PETERSEN, 2013).

In general, rabies and tetanus represent the main concerns in cases of accidents in humans after dog bites (CAPELLAN and HOLLANDER, 2003; KNOBEL et al., 2005). However, the oral cavity of dogs is one of the body regions with the greatest diversity of microorganisms because of the eating and licking habits of this species, as well as the lack of oral hygiene (TRABULSI and SAMPAIO, 2005). Despite the polymicrobial nature that comprises the oral cavity of dogs, including potential zoonotic agents, a few comprehensive studies have focused on the complexity of aerobic, anaerobic and fungi that inhabit oral microbiota of healthy dogs (MEYERS et al., 2008). In this regard, Oehler et al. (2009) identified a similarity between microorganisms isolated from swabs of oral mucosa from dogs and from bite wounds in humans from the USA, suggesting risks of the transmission of agents between animals and owners. Likewise, 6,707 cases of aggressions by dogs were reported in Brazil between 2007 and 2011 (OLIVEIRA, 2013), a fact that reinforces the possibility of transmission of pathogens from dogs-to-humans. Given the complexity of

microorganisms found in the oral cavity of dogs, the wounds caused by their bites in humans are considered poly contaminated, which makes treatment extremely difficult (LIN and PATIL, 2015). About 20% of accidents in humans caused by dog bites evolve to complications due to bacterial infections, especially in cases with high laceration of skin (WOLFF, 1998). In cases of severe lacerations or bites that affect several muscle groups of people secondary or complicate infections can occur, e.g., endocarditis, meningitis, brain abscess, and sepsis, mainly among immunosuppressed individuals (BROOK, 2003).

Studies involving the oral microbiota of healthy dogs using molecular techniques or multidrug-resistant bacteria are scarce or unnoticed and have been mainly restricted to the microbiological culture of wounds in humans attacked by dog bites (OEHLER et al., 2009; LEMSADDEK et al., 2016).

In the past years, the mass spectrometry analysis (protein analysis) and the sequencing of microorganisms on a large scale (microbiome) have enabled the simultaneous identification of the populations of microorganisms that inhabit different mucous membranes or organic tracts of animals and humans, as well as environments and biomes on a world (GILBERT et al., 2010, 2014; THOMPSON et al., 2017). In humans, the use of the microbiome in the gastrointestinal, oronasal and cutaneous cavities is promising to the preventive and collective medicine and to control nosocomial infections (URSELL et al., 2012). In this scenario, the aim of the present study was to investigate the oral microbiota of 100 healthy dogs, including with zoonotic potential, as well as the *in vitro* susceptibility pattern of the isolates using conventional microbiological examination, mass spectrometry, and microbiomes tests.

2. MATERIAL AND METHODS

Animal Use Ethics Committee

This study was approved by the Animal Use Ethics Committee (CEUA) guidelines of FMVZ-UNESP/Botucatu, SP, protocol number 0077/2018. All owners who allowed the collection of material from the dogs signed a term of consent to be aware of the study procedures.

Animals and sampling

A convenience sample of oral microbiota was collected from apparently healthy dogs in a city of the center of the state of São Paulo, Brazil. The sample size was estimated based on the prevalence of 20% of isolation of *Pasteurella multocida* from the oral cavity of healthy dogs, with a confidence level of 95% and an absolute error of 5% (THRUSFIELD, 2007), which results in a minimum sampling of 100 dogs for the study.

The dogs were subjected to triple collection of swabs from the oral cavity (one for stock and two for microbiological cultures) using physical restraint. The sampling was carried out at home, by friction of the sterile swabs against the animals' teeth, gums, tongue, and hard palate. Then, two swabs were stored in the Stuart transport medium and one in a microtube with sterile saline solution. All of them were kept in refrigeration (4-8°C) and immediately subjected to the microbiology diagnosis. The swab destined for the stock was frozen at -20°C.

Data on age, race, gender, food, behavior (docile or aggressive), rabies prophylaxis, living habits with owners and history of biting people or other animals were obtained from the owners.

The animals were eligible to study if they presented the following conditions: i) no administration of antimicrobials, by any route, in the last 30 days (based on the date of the sampling); ii) absence of severe periodontal disease; iii) absence of any systemic disease.

Microbiological and fungal culture

All oral samples were cultured under aerobic and microaerophilic conditions (5% CO₂) on sheep blood agar (5%) (Oxoid®, São Paulo, Brazil), at 37°C and kept. Simultaneously, they were subjected to aerobic culture in selective MacConkey medium (Oxoid®, São Paulo, Brazil), under the same conditions mentioned above. The 100 samples were cultured also on blood agar under anaerobic conditions at 37°C for 4 days, and on Sabouraud agar (Oxoid®, São Paulo, Brazil) with the addition of chloramphenicol (25mg/500mL) and kept at 37°C for 10 days. The bacterial and fungal microorganisms were classified based on conventional phenotypic characteristics (QUINN et al., 2011).

Selective isolation of *Pasteurella* spp.

All samples of dogs were cultured in sheep blood agar medium containing 6 µg of vancomycin for the selective isolation of *Pasteurella* spp. (VIANA et al., 2007).

Selective isolation of *Staphylococcus aureus* and characterization of methicillin-resistant isolates (*mecA* gene)

All oral swab samples were cultured on egg-tellurite-glycine-pyruvate agar (BD Baird-Parker Agar[®], Heidelberg, Germany) with addition of egg yolk with potassium tellurite (EY Tellurite Enrichment, Difco[™], Heidelberg, Germany) in aerobic conditions at 37°C for 48 hours to isolate staphylococci. The detection of the *mecA* gene was performed according to Murakami et al. (1991).

Matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry – MALDI-TOF

All isolates compatible with *Clostridium* spp., *Pasteurella* spp., and coagulase-positive *Staphylococcus* spp. were subjected to Matrix-assisted Laser Desorption Ionization-Time of Flight Mass Spectrometry (Bruker e Daltonics[™], Bremen, Germany) at 337-nm laser conditions. Spectra were analyzed between 2.000-20.000m/z, using the Software FlexControl 3.3, and characterization at the level of species was considered ≥ 2.0 (BARREIRO et al., 2010; GONÇALVES et al., 2014).

***In vitro* microbial susceptibility profile**

The bacterial isolates were subjected to the *in vitro* microbial susceptibility test using the standard diffusion method, according to the recommendations of the Clinical Laboratory Standards Institute-CLSI (CLSI, 2015; 2019), using 12 antimicrobials belonging to 6 classes of drugs, as it follows: **1)** penicillins and beta-lactam derivatives (ceftriaxone, 30µg; ceftiofur, 30µg; amoxicillin/clavulanic acid, 30µg; imipenem, 10µg); **2)** macrolides (azithromycin, 15µg); **3)** fluoroquinolones (enrofloxacin, 5µg; ciprofloxacin, 10µg; levofloxacin, 5µg); **4)** aminoglycosides (gentamicin, 10µg); **5)** amphenicols (chloramphenicol, 30µg) and **6)** sulfonamides

(sulfamethoxazole/trimethoprim, 25µg). Isolates that exhibit simultaneous resistance to ≥ 3 different groups of antimicrobials were considered multiresistant (MAGIORAKOS et al., 2012).

Microbiome

Large-scale genetic sequencing was performed on 20 dogs randomly selected (one out of five dogs), from 100 dogs sampled in the study. The microbiome samples were collected using appropriate swabs and microtubes provided by the manufacturer, and analyzed by IlluminaTM device (Illumina, Inc., San Diego, USA) with MiSeq system, following the manufacturer's protocol.

Statistical analysis

The association between the occurrence of different microorganisms, multidrug resistance to antimicrobials, and the epidemiological data of the animals (age, race, sex, type of feeding, behavior, and history of bites) were analyzed by the Chi-square test (Fisher's Exact), considering significant values of $p < 0.05$ (TRIOLA, 2005).

3. RESULTS

Epidemiological data of the sampled dogs

Out of the 100 sampled dogs, 57% (57/100) did not have a defined breed. Of the remaining 43% (43/100), the most frequent breeds were: border collie (6/100 = 6%), poodle (5/100 = 5%), shih-tzu (5/100 = 5%), and blue heeler (4/100 = 4%).

The age of the animals varied between 6 months and 16 years, with an average of 5.9 years. Among the dogs sampled, 43% (43/100) were under five years old, 39% (39/100) between 5 and 9 years old, and 18% (18/100) were 10 years old or more. Of the total, 57% (57/100) were females and 43% (43/100) males.

Regarding food, 80% (80/100) were fed only with dog food and 20% (20/100) with dog and homemade foods. Of the total, 97% (97/100) were considered docile by the owners and only 3% (3/100) reported as aggressive.

Regarding rabies prophylaxis, 94% (94/100) were vaccinated annually. When asked about the history of animal aggression, 80% of owners (80/100) stated that their dogs have never been involved in any type of aggression, while 7% (7/100) reported episodes of aggression against other animals, 6% (6/100) against unknown people, 3% (3/100) against relatives or friends, 2% (2/100) against the owners themselves, and 2% (2/100) against the animal's veterinarian. Of the total, 15% (15/100) had frequent contact with children.

Most dogs (77/100 = 77%) had free access to all the rooms in the household, including the owner's bedroom, although only 26% (26/100) were used to sleep in the same bed as someone from the family.

When asked about the oral hygiene of their animals, 89% of the owners (89/100) stated that they had never carried out any hygiene procedure, while 5% (5/100) performed cleaning every 15 days, 4% (4/100) once a week, and 2% (2/100) twice a week.

Microorganisms identification

The frequency of bacterial microorganisms isolated from the 100 sampled dogs is summarized in Table 1. The main microorganisms identified by microbiological and/or mass spectrometry were: *Staphylococcus pseudintermedius* (40/213 = 18.78%), α -hemolytic *Streptococcus* (37/213 = 17.37%), *Pasteurella stomatis* (22/213 = 10.33%), *Staphylococcus* spp. (coagulase-negative) (18/213 = 8.45%), *Pasteurella canis* (16/213 = 7.51%), *Pseudomonas* spp. (12/213 = 5.63%), *Escherichia coli* (11/213 = 5.16%), *Neisseria animaloris* (10/213 = 4.69%) and *Neisseria zoodegmatis* (10/231 = 4.69%) (Table 1).

TABLE 1. Frequency of bacteria identified from the oral cavity of 100 healthy dogs, diagnosed by microbiological¹ and mass spectrometry (MALDI-TOF)² techniques. Brazil, 2020.

Microorganisms	N	%
<i>Staphylococcus pseudintermedius</i> ²	40	18.78%
α -hemolytic <i>Streptococcus</i> ¹	37	17.37%
<i>Pasteurella stomatis</i> ²	22	10.33%
<i>Staphylococcus</i> spp. ¹	18	8.45%
<i>Pasteurella canis</i> ²	16	7.51%
<i>Pseudomonas</i> spp. ¹	12	5.63%
<i>Escherichia coli</i> ¹	11	5.16%
<i>Neisseria animaloris</i> ²	10	4.69%
<i>Neisseria zoodegmatis</i> ²	10	4.69%
<i>Staphylococcus intermedius</i> ²	6	2.82%
<i>Enterobacter cloacae</i> ¹	4	1.88%
<i>Micrococcus</i> spp. ¹	4	1.88%
<i>Rothia nasimurium</i> ²	4	1.88%
<i>Klebsiella pneumoniae</i> ¹	3	1.41%
<i>Pasteurella multocida</i> ²	3	1.41%
<i>Staphylococcus aureus</i> ²	3	1.41%
<i>Enterobacter aerogenes</i> ¹	2	0.94%
<i>Pasteurella dagmatis</i> ²	2	0.94%
<i>Proteus mirabilis</i> ¹	2	0.94%
<i>Chryseobacterium gleum</i> ²	1	0.47%
<i>Chryseobacterium indologenes</i> ²	1	0.47%
<i>Citrobacter freundii</i> ¹	1	0.47%
<i>Neisseria weaveri</i> ²	1	0.47%
Total	213	100.00%

MALDI-TOF = Matrix Assisted Laser Desorption Ionization – Time of flight; N = Number of isolates; % = Frequency of isolates

***Pasteurella* spp.**

Colonies compatible with *Pasteurella* spp. were isolated from 60% (60/100) of the oral cavity samples. Two different types of colonies were isolated in four samples, resulting in 64 isolates of *Pasteurella* spp. The MALDI-TOF MS revealed that *P.*

stomatis was the most frequent species (22/64 = 34.4%), followed by *P. canis* (16/64 = 25%), *P. multocida* (3/64 = 4.7%), and *P. dagmatis* (2/64 = 3.1%). The remaining isolates were identified as *Neisseria* species (21/64 = 32.8%), including *N. animaloris* (10/64 = 15.6%), *N. zoodegmatis* (10/64 = 15.6%), and *N. weaveri* (1/64 = 1.6%). The prevalence of the genus *Pasteurella* was 42% (42/100), since in a sample of the oral cavity there were identified two distinct species; whereas the prevalence of the genus *Neisseria* was 19% (19/100), since two samples revealed two different species.

***Staphylococcus* spp.**

Typical colonies of staphylococci were isolated in 66% (66/100) of the samples. A sample had two different colonies, totaling 67 isolates, which were subjected to biochemical tests (coagulase, Mannitol Salt Agar, DNase, and trehalose). The coagulase-positive isolates (49/67 = 73.1%) were subjected to diagnosis by mass spectrometry (MALDI-TOF MS), and the coagulase-negative isolates (18/67 = 26.9%) were classified as *Staphylococcus* spp. MALDI-TOF revealed a predominance of *S. pseudintermedius* (40/49 = 81.6%), followed less frequently by *S. intermedius* (6/49 = 12.3%) and *S. aureus* (3/49 = 6, 1%).

Enterobacteria

Enterobacteria were isolated in 21% (21/100) of the samples. Among two samples, two different species were isolated, resulting 23 isolates. The most frequent species was *Escherichia coli* (11/23 = 47.8%), followed by *Enterobacter cloacae* (4/23 = 17.4%), *Klebsiella pneumoniae* (3/23 = 13%), *Enterobacter aerogenes* (2/23 = 8.7%), *Proteus mirabilis* (2/23 = 8.7%), and *Citrobacter freundii* (1/23 = 4.4%).

Other bacterial microorganisms

Other bacterial microorganisms isolated from the sampled dogs were: α -hemolytic *Streptococcus* (37/100 = 37%), *Pseudomonas* spp. (12/100 = 12%), *Micrococcus* spp. (4/100 = 4%), *Rothia nasimurium* (4/100 = 4%), *Chryseobacterium indologenes* (1/100 = 1%), and *Chryseobacterium gleum* (1/100 = 1%).

Fungi and yeasts

Fungi and yeasts were isolated in 19% of the samples (19/100). One of them showed two distinct colonies, resulting in 20 isolates. The most prevalent genus was *Aspergillus* (10/100 = 10%), followed by *Malassezia pachydermatis* (4/100 = 4%). Less frequently there were identified: *Bipolaris* sp. (1/100 = 1%), *Curvularia* sp. (1/100 = 1%), *Fusarium* sp. (1/100 = 1%), *Nigrospora* sp. (1/100 = 1%), *Scopulariopsis* sp. (1/100 = 1%), and *Trichoderma* sp. (1/100 = 1).

Anaerobes

The microbiological cultures under anaerobic conditions did not reveal any colony compatible with clostridia or strict anaerobes microorganisms.

***In vitro* microbial susceptibility test**

The most effective antimicrobials against the isolates were imipenem (207/213 = 97.2%), ceftiofur (196/213 = 92%), and amoxicillin/clavulanic acid (194/213 = 91.1%). In contrast, the isolates revealed greater resistance to sulfamethoxazole/trimethoprim (77/213 = 36.1%), penicillin (75/213 = 35.2%), and azithromycin (48/213 = 22.5%) (Table 2). The microbial susceptibility profile of the main groups of bacteria identified in the sampled dogs is summarized in Table 3. Imipenem and amoxicillin/clavulanic acid were the most effective drugs to the main groups of bacteria identified, except enterobacteria, in which cephalosporins showed better efficacy. In general, *Pasteurella* and *Neisseria* isolates showed little resistance to the drugs used. In contrast, staphylococci showed resistance, in variable frequency, to various antimicrobials (Table 3).

Bacterial multidrug resistance was identified in 19.2% of the isolates (41/213), which occurred mainly in *Staphylococcus pseudintermedius* (19/41 = 46.3%), followed by *Pseudomonas* spp. (10/41 = 24.4%), *Escherichia coli* (4/41 = 9.7%) and *Staphylococcus* spp. (4/41 = 9.7%).

The methicillin resistance gene (*mecA*) was detected in 6.1% (3/49) of the coagulase-positive *Staphylococcus* isolates: one *S. aureus* and two *S. pseudintermedius* (Figures 1A-E).

2107 TABLE 2. *In vitro* antimicrobial susceptibility pattern of 213 bacteria isolated from the
 2108 oral cavity of 100 healthy dogs. Brazil, 2020.

Antimicrobial	Susceptibility		
	S (%)	PS (%)	R (%)
Imipenem	207 (97.2)	6 (2.8)	0
Ceftiofur	196 (92)	8 (3.8)	9 (4.2)
Amoxicillin/clavulanic acid	194 (91.1)	3 (1.4)	16 (7.5)
Levofloxacin	189 (88.7)	8 (3.8)	16 (7.5)
Ceftriaxone	187 (87.8)	12 (5.6)	14 (6.6)
Gentamycin	183 (85.9)	12 (5.6)	18 (8.5)
Chloramphenicol	178 (83.6)	9 (4.2)	26 (12.2)
Ciprofloxacin	174 (81.7)	20 (9.4)	19 (8.9)
Enrofloxacin	171 (80.3)	26 (12.2)	16 (7.5)
Azithromycin	160 (75.1)	5 (2.4)	48 (22.5)
Penicillin	138 (64.8)	0	75 (35.2)
Sulfamethoxazole/trimethoprim	132 (62)	4 (1.9)	77 (36.1)

2109

2110 S = Sensitive; PS = Partially sensitive; R = Resistant

2111 TABLE 3: *In vitro* antimicrobial susceptibility profile from the main groups of bacteria isolated from the oral cavity of 100 healthy dogs. Brazil,
2112 2020.

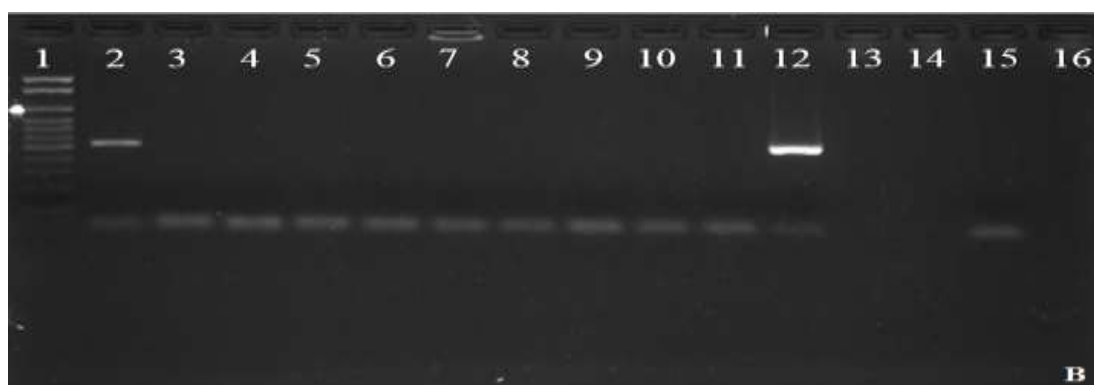
Antimicrobial	Microorganisms																	
	<i>Staphylococcus</i> sp. (n=67)			<i>Pasteurella</i> sp. (n=43)			α -hemolytic <i>Streptococcus</i> (n=37)			<i>Neisseria</i> sp. (n=21)			Enterobacteria (n=23)			Others (n=22)		
	S	PS	R	S	PS	R	S	PS	R	S	PS	R	S	PS	R	S	PS	R
Imipenem	67 (100%)	0	0	43 (100%)	0	0	37 (100%)	0	0	21 (100%)	0	0	17 (73.9%)	6 (26.1%)	0	22 (100%)	0	0
Ceftiofur	66 (98.5%)	0	1 (1.5%)	43 (100%)	0	0	37 (100%)	0	0	21 (100%)	0	0	20 (87%)	3 (13%)	0	9 (40.9%)	5 (22.7%)	8 (36.4%)
Amoxicillin/clavulanic acid	66 (98.5%)	0	1 (1.5%)	43 (100%)	0	0	37 (100%)	0	0	21 (100%)	0	0	19 (82.6%)	2 (8.7%)	2 (8.7%)	8 (36.4%)	1 (4.5%)	13 (59.1%)
Ceftriaxone	64 (95.5%)	1 (1.5%)	2 (3%)	43 (100%)	0	0	32 (86.5%)	1 (2.7%)	4 (10.8%)	21 (100%)	0	0	16 (69.6%)	3 (13%)	4 (17.4%)	11 (50%)	7 (31.8%)	4 (18.2%)
Levofloxacin	51 (76.1%)	2 (3%)	14 (20.9%)	43 (100%)	0	0	36 (97.3%)	0	1 (2.7%)	21 (100%)	0	0	18 (78.2%)	4 (17.4%)	1 (4.4%)	20 (90.9%)	2 (9.1%)	0
Gentamycin	54 (80.6%)	4 (6%)	9 (13.4%)	41 (95.4%)	2 (4.6%)	0	28 (75.7%)	3 (8.1%)	6 (16.2%)	21 (100%)	0	0	20 (87%)	3 (13%)	0	19 (86.4%)	0	3 (13.6%)
Chloramphenicol	52 (77.6%)	0	15 (22.4%)	43 (100%)	0	0	35 (94.6%)	2 (5.4%)	0	21 (100%)	0	0	21 (91.3%)	2 (8.7%)	0	6 (27.3%)	5 (22.7%)	11 (50%)
Ciprofloxacin	51 (76.1%)	1 (1.5%)	15 (22.4%)	42 (97.7%)	1 (2.3%)	0	26 (70.3%)	11 (29.7%)	0	21 (100%)	0	0	13 (56.5%)	6 (26.1%)	4 (17.4%)	21 (95.5%)	1 (4.5%)	0
Enrofloxacin	48 (71.6%)	6 (9%)	13 (19.4%)	42 (97.7%)	1 (2.3%)	0	28 (75.7%)	8 (21.6%)	1 (2.7%)	18 (85.7%)	3 (14.3%)	0	19 (82.6%)	3 (13%)	1 (4.4%)	16 (72.7%)	5 (22.8%)	1 (4.5%)
Azithromycin	37 (55.2%)	0	30 (44.8%)	43 (100%)	0	0	30 (81.1%)	3 (8.1%)	4 (10.8%)	21 (100%)	0	0	15 (65.2%)	0	8 (34.8%)	14 (63.6%)	2 (9.1%)	6 (27.3%)
Penicillin	30 (44.8%)	0	37 (55.2%)	42 (97.7%)	0	1 (2.3%)	36 (97.3%)	0	1 (2.7%)	21 (100%)	0	0	0	0	23 (100%)	9 (40.9%)	0	13 (59.1%)
Sulfamethoxazole / trimethoprim	37 (55.2%)	1 (1.5%)	29 (43.3%)	26 (60.5%)	0	17 (39.5%)	20 (54.1%)	1 (2.7%)	16 (43.2%)	20 (95.2%)	1 (4.8%)	0	18 (78.2%)	1 (4.4%)	4 (17.4%)	11 (50%)	0	11 (50%)

2113
2114 *Staphylococcus* sp. = *S. aureus*, *S. intermedius*, *S. pseudintermedius*, and coagulase-negative staphylococci; *Pasteurella* sp. = *P. canis*, *P. dagmatis*, *P. multocida*, and
2115 *P. stomatis*; *Neisseria* sp. = *N. animaloris*, *N. weaveri*, and *N. zoodegmatis*; Enterobacteria = *Citrobacter freundii*, *Enterobacter aerogenes*, *E. cloacae*, *Escherichia*
2116 *coli*, *Klebsiella pneumoniae*, and *Proteus mirabilis*; Others = *Chryseobacterium gleum*, *C. indologenes*, *Micrococcus* sp., *Pseudomonas* sp., and *Rothia nasimurium*.



2117

2118 **FIGURE 1A:** Pulsed-field gel electrophoresis for detection of the *mecA* gene in coagulase-
 2119 positive staphylococci isolates from oral cavity of healthy dogs. **Column 1:** Ladder 100 bp; **column**
 2120 **2:** USA300 (Positive control); **column 3:** isolate 6; **column 4:** isolate 39; **column 5:** isolate 79; **column 6:** isolate
 2121 19; **column 7:** isolate 21; **column 8:** isolate 22; **column 9:** isolate 29; **column 10:** isolate 30; **column 11:** isolate 31;
 2122 **column 12:** isolate 32; **column 13:** isolate 37; **column 14:** isolate 38; **column 15:** MW2 (Positive control); **column**
 2123 **16:** negative control.



2124

2125 **FIGURE 1B:** Pulsed-field gel electrophoresis for detection of the *mecA* gene in coagulase-
 2126 positive staphylococci isolates from oral cavity of healthy dogs. **Column 1:** Ladder 100 bp; **column**
 2127 **2:** USA300 (Positive control); **column 3:** isolate 51; **column 4:** isolate 64; **column 5:** isolate 69; **column 6:** isolate
 2128 2; **column 7:** isolate 36; **column 8:** isolate 41; **column 9:** isolate 71; **column 10:** isolate 74; **column 11:** isolate 81;
 2129 **column 12:** MW2 (Positive control); **columns 13 and 14:** empty; **column 15:** negative control; **column 16:** empty.



2130

2131 **FIGURE 1C:** Pulsed-field gel electrophoresis for detection of the *mecA* gene in coagulase-
 2132 positive staphylococci isolates from oral cavity of healthy dogs. **Column 1:** Ladder 100 bp; **column**
 2133 **2:** negative control; **column 3:** USA300 (Positive control); **column 4:** MW2 (Positive control); **column 5:** isolate
 2134 9; **column 6:** isolate 13; **column 7:** isolate 14; **column 8:** isolate 16; **column 9:** isolate 17; **column 10:** isolate 23;
 2135 **column 11:** isolate 24; **column 12:** isolate 25; **column 13:** isolate 27; **column 14:** isolate 33; **column 15:** isolate 35;
 2136 **column 16:** empty.

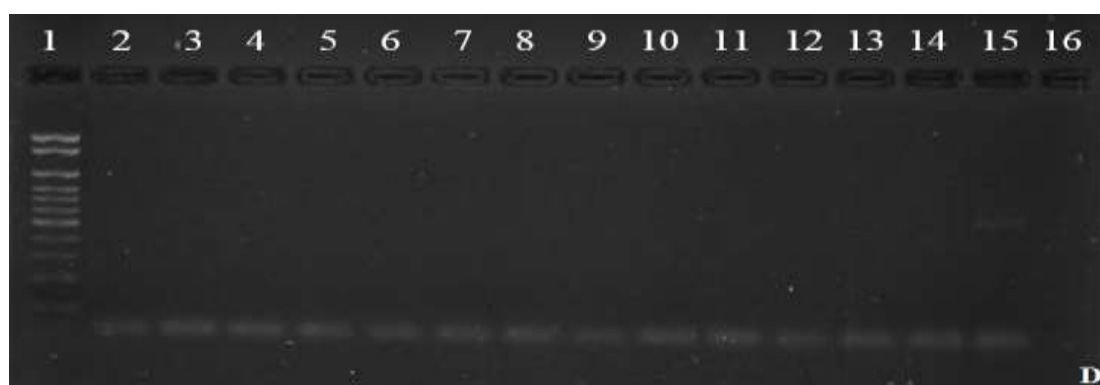


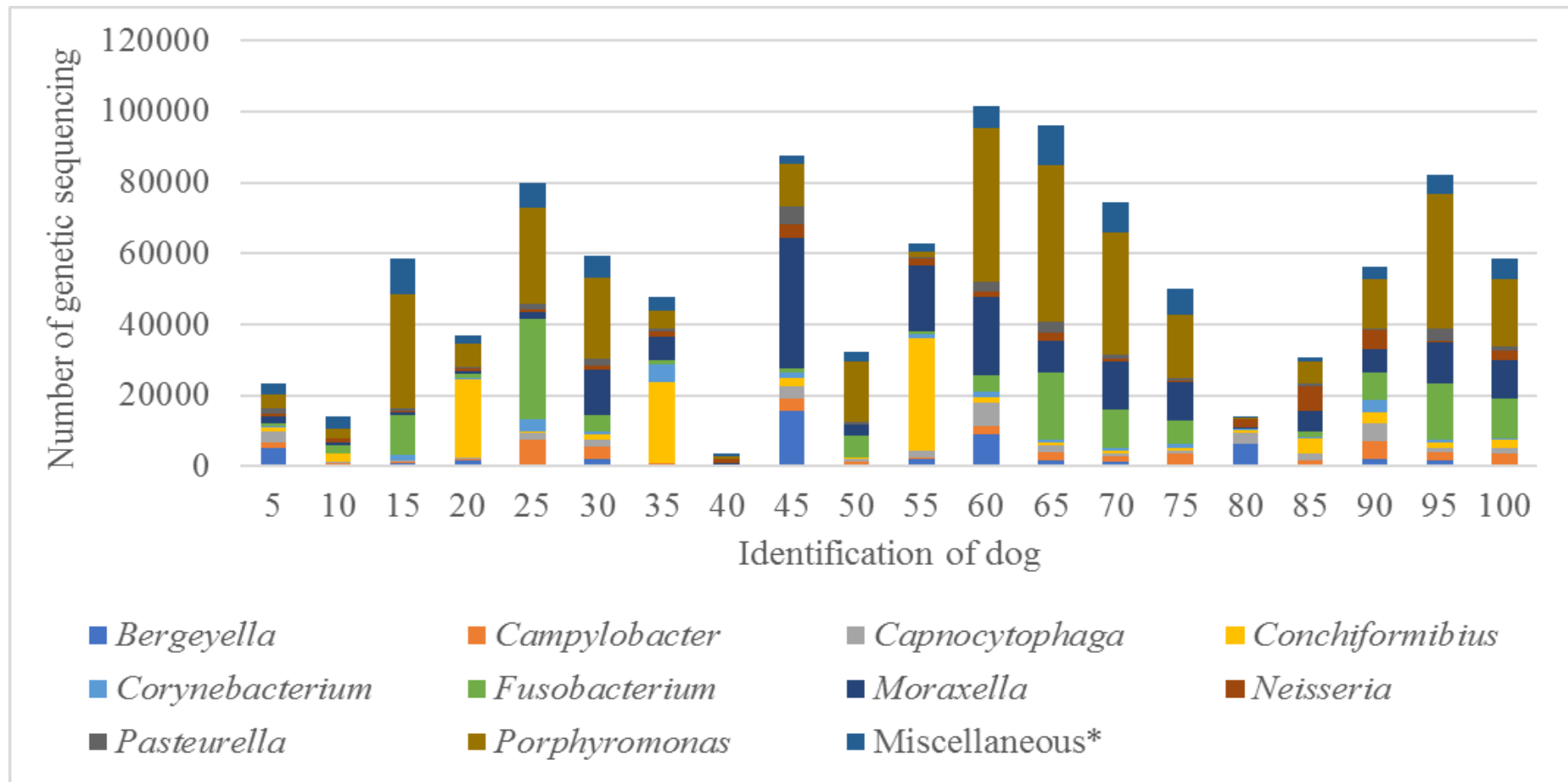
FIGURE 1D: Pulsed-field gel electrophoresis for detection of the *mecA* gene in coagulase-positive staphylococci isolates from oral cavity of healthy dogs. **Column 1:** Ladder 100 bp; **column 2:** isolate 43; **column 3:** isolate 57; **column 4:** isolate 61; **column 5:** isolate 65; **column 6:** isolate 70; **column 7:** isolate 75; **column 8:** isolate 77; **column 9:** isolate 78; **column 10:** isolate 83; **column 11:** isolate 84; **column 12:** isolate 86; **column 13:** isolate 89; **column 14:** isolate 92; **column 15:** isolate 93; **column 16:** empty.



FIGURE 1E: Pulsed-field gel electrophoresis for detection of the *mecA* gene in coagulase-positive staphylococci isolates from oral cavity of healthy dogs. **Column 1:** Ladder 100 bp; **column 2:** USA300 (Positive control); **column 3:** negative control; **column 4:** isolate 42; **column 5:** isolate 60; **column 6:** isolate 93 (repetition); **column 7:** isolate 97.

Microbiome

Large-scale sequencing (microbiome) was performed on 20 oral cavity samples. The results show all the microorganisms species and the total number of sequences in each sample, which varied between 3,794 and 101,622, with an average of 53,562 sequences/sample. Figures 2 and 3 illustrate the bacterial genera identified with the highest frequency of sequencing in the 20 healthy dogs sampled.

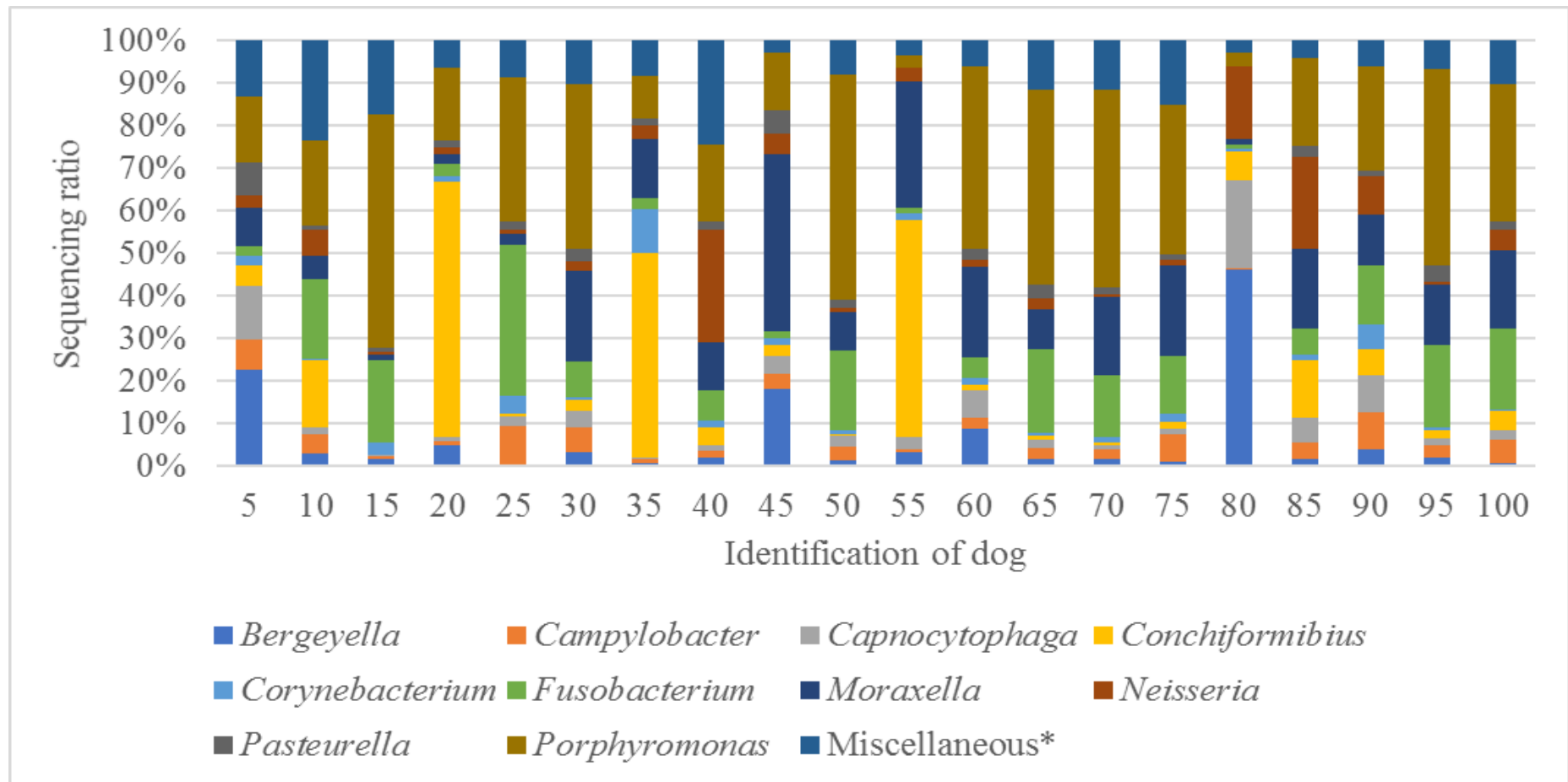


2157

2158

2159 FIGURE 2: Absolute number of the genetic sequencing of the most frequent bacterial genera obtained from the microbiome technique in 20
 2160 samples of the oral cavity of healthy dogs. Brazil, 2020.

2161 * Miscellaneous = *Peptostreptococcus* spp., *Pseudomonas* spp., *Rothia* spp., *Serratia* spp., *Staphylococcus* spp., *Streptococcus* spp., and others.



2162

2163

2164 FIGURE 3: Proportion of the most frequent bacterial genera identified by large-scale sequencing (microbiome) in 20 samples from the oral
 2165 cavity of healthy dogs. Brazil, 2020.

2166 * Miscellaneous = *Peptostreptococcus* spp., *Pseudomonas* spp., *Rothia* spp., *Serratia* spp., *Staphylococcus* spp., *Streptococcus* spp., and others.

Statistical analysis

No statistical association was found between microbiological or molecular identification of isolates, multidrug resistance, and animal epidemiological data ($p > 0.05$).

4. DISCUSSION

This study identified great complexity of bacterial and fungal microorganisms in the oral cavity of 100 apparently healthy dogs using conventional microbiological and advanced molecular techniques (mass spectrometry and large-scale genetic sequencing), as well as high multidrug resistance of the isolates (19.2%). The identification of a high frequency of pathogens with zoonotic potential from the oral microbiota of dogs highlights the risk that accidents caused by dog bites pose to humans, especially due to the close contact between pets and owners.

The growth of several types of bacterial colonies in conventional culture media required the use of selective media for certain genera of interest, such as *Pasteurella* and *Staphylococcus*. For species-level characterization of the microorganisms, mass spectrometry (MALDI-TOF) was used, which enabled the identification of uncommon species reported as normal inhabitants of the oral microbiota of healthy dogs.

Among the species of *Pasteurella*, *P. multocida* and *P. canis* have been the most described as inhabitants of the oral microbiota of dogs in Brazil (BRAGA et al., 2005; FERREIRA et al., 2016), USA (BAILIE et al., 1978), and Slovenia (SRECNIK et al., 2019). Nonetheless, the use of mass spectrometry in the 100 dogs studied revealed a higher prevalence of *P. stomatis*, uncommonly referred. Despite the low prevalence, the identification of *P. multocida* in the oral cavity of dogs is important because of the zoonotic potential of the pathogen as a result of accidents by dogs bites, since this microorganism has already been reported as a primary cause of several complications in humans attacked by dogs or in close contact with them. In this context, a case of meningitis caused by *P. multocida* was reported in a seven-weeks-old child in England, after a history of contact with another person's hand previously licked by a dog (WADE et al., 1999). In France, *P. multocida* was identified in an immunocompetent adult patient without a history of dog bites or licking. The isolate was similar to that obtained from his dog's mouth, which was diagnosed by mass

spectrometry (BARDOU et al., 2015). Septicemia by *P. multocida* has also been described in China in an immunocompromised elderly human patient after having an open wound licked by a domestic dog (CHANG et al., 2007). A similar case in Colombia was recorded in a patient with the habit of sharing food with the dog (NAVARRO- NAVAJAS et al., 2019).

Likewise *Pasteurella* genus, species of *Neisseria* such as *N. zoodegmatidis* and *N. animaloris* are also common inhabitants of the oral cavity of dogs. These microorganisms have been described causing mild pulmonary signs in dogs, and clinical complications in different organs in humans. A retrospective study in Sweden, in 2013, reported 13 human patients with an average age of 56 years, whose secretions from wounds caused by dog bite were subjected to microbiological culture, which identified *N. zoodegmatidis* and *N. animaloris* (HEYDECKE et al., 2013). Most patients had local signs in the wound region, although one evolved to septicemia. Interestingly, *N. zoodegmatidis* and *N. animaloris* were the most prevalent species of *Neisseria* identified by mass spectrometry (MALDI-TOF) in the current study, warning to the zoonotic potential of these agents that naturally inhabit the oral cavity of healthy dogs.

For the isolation of staphylococci among 100 dogs sampled, egg-tellurite-glycine-pyruvate agar medium was used. Dark colonies with double lipolysis halo were preliminarily classified as *S. aureus* after the biochemical tests. Nevertheless, mass spectrometry analysis identified most of these isolates as *S. pseudintermedius*, followed by *S. intermedius* and *S. aureus* less frequently. The same difficulty on the speciation was reported by Chuang et al. (2010), in China, when they described a case of septicemia by *S. pseudintermedius* in a 6-years-old child with continuous use of an intravenous catheter for medicinal purposes, and a history of recent contact with two dogs. Similarly, Börjesson et al. (2015) reported in a study in Sweden that ~13% of the colonies of *S. pseudintermedius* were incorrectly classified as *S. aureus* and suggested the use of molecular techniques to distinguish both species.

S. pseudintermedius is a common inhabitant of the skin and mucosa of dogs. However, due to the biochemical similarity with other species, it has probably been underdiagnosed or underestimated as a primary agent of infection in humans attacked by bites or with close contact with dogs. In this context, *S. pseudintermedius* was reported in France in a case of endocarditis in a patient using a pacemaker (RIEGEL et al., 2011). In Spain, a study of four cases of infected wounds of humans caused by *S. pseudintermedius* revealed that two patients had isolates with identical patterns in the

electrophoretic profile, and *in vitro* antimicrobial susceptibility test, when compared to the isolates obtained from their domestic dogs (LOZANO et al., 2017), indicating the possibility of zoonotic transmission of the pathogens from dogs-to-owners.

The prevalence of enterobacteria was relatively low in the oral cavity among the 100 dogs sampled, which was an expected result, since the fecal origin of these microorganisms. The isolation of *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* can be justified by the habit of licking and coprophagy in young dogs, which could facilitate the transient presence of enterobacteria in the oral cavity. Also, it is important to mention the risk of severe human infections by these pathogens, as described in 2018, in Spain, where an elderly patient died after developing fulminant hemorrhagic purpura secondary to a dog bite. This patient presented extensive areas of cutaneous necrosis and the co-isolation of *E. coli* and *Staphylococcus warneri* in the blood culture (RUIZ et al., 2018). No report of human septicemia by *K. pneumoniae* secondary to a dog bite has been described, although it is known that this pathogen commonly shows multidrug resistance to conventional antimicrobials. Therefore, the identification of *K. pneumoniae* in the oral mucosa of healthy dogs in the sampled animals reinforces the risk of serious infections by this pathogen after bite aggressions (KASEMPIMOLPORN et al., 2003).

Alpha-hemolytic *Streptococcus* was identified in 37% of the oral cavity of 100 sampled dogs. A similar result was obtained in a retrospective study carried out between 1995 and 1996, in 18 emergency departments in the United States, which revealed the prevalence of 46% of hemolytic streptococci in wounds of humans bitten by dogs, and emphasizes the zoonotic potential of this group of pathogens (TALAN et al., 1999).

A low prevalence of *Pseudomonas* spp. was observed in the samples of this study. However, the presence of this pathogen in the oral microbiota of healthy dogs warns to the need for an appropriate therapeutic approach to dog bite injuries, since some species as *P. aeruginosa*, have been related to nosocomial human infections, and are highly resistant to conventional antimicrobials (LANDMAN et al., 2007).

Chryseobacterium indologenes and *C. gleum*, formerly from *Flavobacterium* genus, are pathogens often described in severe hospital infections in humans, particularly immunosuppressed patients and/or with history of use of catheters and tracheotomies tubes, and has been considered an emerging infection in the United States (MUKERJI et al., 2016). Although *C. indologenes* commonly presents low

pathogenicity in immunocompetent individuals, it has already been described causing septicemia in a patient in India without the history of hospitalization, invasive procedures, or immunosuppressive comorbidities (BARUAH et al., 2016). Given the low prevalence in the present study, the identification of two species of this genus in the oral cavity of healthy dogs indicates a potential risk of transmission of these pathogens from dogs-to-humans.

Aspergillus spp. are saprophytic fungal microorganisms commonly involved in otitis and sinusitis diseases in dogs, which can evolve to severe central nervous system complications (GOODALE et al., 2016; BENTLEY et al., 2018). In the present study, 10% of dogs had *Aspergillus* spp. in the oral microbiota. However, no case of isolation of *Aspergillus* spp. from the oral cavity of healthy dogs was found, which makes it difficult to compare this result with similar studies. *Malassezia pachydermatis* was the only species of yeast identified in 4% of the oral cavity of dogs sampled, as opposed of other studies in Brazil that revealed the isolation of the same agent up to 30% of oral samples of dogs (BRITO et al., 2009; SANTIN et al., 2013).

The bacterial resistance is an emergent issue worldwide, including the recent concept of One Health (CDC, 2013; WHO, 2014; RIBEIRO et al., 2015; McEWEN and COLLIGNON, 2018). In the current study, the most effective antimicrobials against the isolates were imipenem, ceftiofur, and amoxicillin/clavulanic acid. These drugs have been indicated for the treatment of oral infections of dogs and wounds in humans caused by dog bites (MEYERS et al., 2008; OEHLER et al., 2009). In fact, when it is not possible to carry out microbiological culture and *in vitro* susceptibility pattern test, these drugs can be considered as options to treat human patients who suffered aggressions, particularly by homeless dogs or the ones that evaded after the attack. Despite the high susceptibility of the isolates to the aforementioned drugs, it is important to associate other antimicrobials, since the injuries caused by dog bites are considered polymicrobial (MEYERS et al., 2008). In contrast, high resistance of bacterial isolates was observed for sulfamethoxazole/trimethoprim (36.1%) and penicillin (35.2%), which can be attributed to the continuous use of these drugs in veterinary medicine for over 40 years (ZAMBORI et al., 2013; BEAN and WIGMORE, 2016). The identification of multi-resistant isolates in the oral cavity samples among dogs sampled reinforces the risk of transmission of resistant bacteria from the oral microbiota of dogs to humans. In addition, it reinforces the recommendation that the treatment of wounds in humans caused by dog bites should

be supported by etiological identification and *in vitro* antimicrobial susceptibility tests of isolates.

The identification of the *mecA* gene in one isolate of *Staphylococcus aureus* and two isolates of *S. pseudintermedius* obtained from samples of oral secretion from dogs in the present study indicates the risk of transmission of resistant bacteria between dogs and humans. The *mecA* resistance gene has already been described in isolates of *S. aureus* from dogs of Sweden (WIPF and PERRETEN, 2016), China (HUANG and CHOU, 2019), Poland (KIZERWETTER-SWIDA et al., 2019) and Egypt (FARGHALI et al., 2019). Fessler et al. (2018) also reported the occurrence of methicillin-resistant *S. aureus* and *S. pseudintermedius* (MRSA and MRSP, respectively) in veterinary hospital employees in Germany. Similarly, Worthing et al. (2018) identified both species carrying the *mecA* gene in dogs, owners, and veterinarians in two veterinary hospitals from Australia, reinforcing the potential risk of transmission of these resistant pathogens between dogs and humans in the veterinary medicine practice or secondary to nosocomial infections.

The 20 samples of oral secretion from dogs in the current study that were subjected to large-scale genetic sequencing (microbiome) revealed great complexity of bacterial microorganisms, although only 20% of 100 oral samples of dogs were subjected to this last-generation technique, a fact that may be considered a limitation of the current study.

The genera *Pasteurella* and *Neisseria* were detected among the 10 microorganisms with the highest number of sequencing in all samples, as well as being identified microbiological culture and/or mass spectrometry. The *Neisseria* genus has been described in high frequency using large-scale genetic sequencing in the oral cavities of four dogs and their owners in South Korea (OH et al., 2015). In contrast, it was not possible to isolate the strictly anaerobic bacteria of *Fusobacterium* and *Porphyromonas* genera using conventional microbiological procedures, whereas they sequenced herein using the microbiome technique, in addition to similar studies (OH et al., 2015), indicating that large-scale genetic sequencing is effective to identify strict anaerobic microorganisms in the oral sample of dogs.

All 20 samples subjected to the microbiome revealed a high number of the sequencing of *Bergeyella* spp., which is a normal inhabitant of the upper respiratory tract and oral cavity of dogs (MURAMATSU et al., 2019). This microorganism has already been identified causing septicemia in patients without a history of a dog bite in

China (LIN et al., 2007; CHEN et al., 2017), and in a patient bit by a dog in Spain (MONTEJO et al., 2001), reinforcing zoonotic potential of the pathogen.

Species of the genus *Capnocytophaga* were also sequenced in high quantity in the 20 samples of the oral cavity of dogs subjected to large-scale genetic. The first report of identification of *Capnocytophaga canimorsus* in the saliva of dogs was in the USA (BAILIE et al., 1978), and subsequently, several cases of serious infections were reported in human patients after dog bites. In this context, an elderly patient in the Czech Republic presented purulent meningitis caused by *C. canimorsus* secondary to dog bite (PRASIL et al., 2020). In the United Kingdom, an elderly woman was affected by endocarditis caused by *C. canimorsus* after being scratched by her dog (SQUIRE and HETHERINGTON, 2020). A retrospective study involving 484 cases of human infections by *C. canimorsus*, between 1990 and 2014, revealed a history of dog bite in 60% of the cases and a history of dog scratches or licks in 27% of them, with a mortality rate of 26% (BUTLER, 2015). Thus, *C. canimorsus*-induced infections in humans after a dog bite, scratch or lick are ones of the most worrying because of the high frequency and severity of clinical signs in patients.

Other pathogens with high frequency of sequencing in the microbiome were *Campylobacter* spp., *Corynebacterium* spp., and *Moraxella* spp., which have previously been described in wound secretions caused by dog bites in the USA (TALAN et al., 1999; MERRIAM et al., 2003), Germany (FUNKE et al., 2010) and the United Kingdom (BYGOTT et al., 2008).

Interestingly, there was no microbiological isolation or sequencing of species belonging to the *Clostridium* genus. In contrast, Griffin and Holt (2001) identified *Clostridium* spp. in the USA in samples of human wounds caused by dog bites, indicating that anaerobic agents should be considered in the diagnosis of skin lesions in humans after dog bites.

Overall, a plurality of microorganisms with zoonotic potential was identified from the oral microbiota of healthy dogs in the current study, as well as the high multidrug resistance of some pathogens to conventional antimicrobials. These findings highlight the need for avoiding close or promiscuous contact with the oral cavity of dogs, as well as target the treatments of humans attacked by bites based on the identification of etiology and *in vitro* antimicrobial susceptibility tests.

5. CONCLUSIONS

✓ *Staphylococcus* spp., *Streptococcus* spp., and *Pasteurella* spp. were the main genera of microorganisms identified by microbiological culture and mass spectrometry, reinforcing the presence of these agents in the oral cavity of healthy dogs;

✓ Large-scale genetic sequencing revealed a great diversity of aerobic and anaerobic bacteria in the oral cavity of healthy dogs, including pathogens that were not isolated in conventional culture media, confirming the microbiome technique for the population study of microorganisms;

✓ Imipenem, amoxicillin/clavulanic acid, and cephalosporins (ceftiofur and ceftriaxone) were the most effective antimicrobials against isolates, representing drugs that can be indicated for oral infections in dogs and occasionally in humans attacked by bites when it is not possible to identify the causal agent;

✓ The bacterial isolates revealed ~20% of multidrug resistance, particularly for sulfamethoxazole/trimethoprim and penicillin, probably due to the continuous or non-rational use for decades of these antimicrobials in the treatment of different diseases of dogs, which can increase the selective pressure for resistant bacteria;

✓ Great complexity of agents has been identified in the oral microbiota of dogs, including pathogens previously reported in infections in humans after bites, e.g., *Pasteurella* sp., *Staphylococcus* sp. and *Capnocytophaga* sp., warning to the need of considering dog bites as highly contaminated and polymicrobial lesions, along with the risk of transmission of potentially zoonotic microorganisms to humans secondary to dog bites.

6. GLOSSARY

α = Alpha

β = Beta

μg = Micrograms

CEUA = Animal Use Ethics Committee

CO₂ = Carbon Dioxide

USA = United States of America

FMVZ = School of Veterinary Medicine and Animal Science

2405 MALDI-TOF MS = Matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass
 2406 spectrometry
 2407 MG = Minas Gerais
 2408 mg = Milligrams
 2409 mL = Milliliters
 2410 MRSA = Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*
 2411 MRSP = Methicillin-resistant *Staphylococcus pseudintermedius*
 2412 bp = Base pairs
 2413 SP = Sao Paulo
 2414 UNESP = São Paulo State University
 2415 USP = University of São Paulo
 2416 °C = Degrees (Celsius)
 2417 % = Percentage

2418

2419 **7. REFERENCES**

2420

- 2421 BAILIE, W.E.; STOWE, E.C.; SCHMITT, A.M. Aerobic bacterial flora of oral and
 2422 nasal fluids of canines with reference to bacteria associated with bites. *Journal of*
 2423 *Clinical Microbiology*, v.7, n.2, p.223–231, 1978.
- 2424 BARDOU, M.; HONNORAT, E.; DUBOURG, G.; COUDERC, C.; FOURNIER,
 2425 P.E.; SENG, P.; STEIN, A. Meningitis caused by *Pasteurella multocida* in a dog
 2426 owner without a dog bite: clonal lineage identification by MALDI-TOF mass
 2427 spectrometry. *BMC Research Notes*, v.8, n.626, 2015.
- 2428 BARREIRO, J.R.; FERREIRA, C.R.; SANVIDO, G.B.; KOSTRZEWA, M.; MAIER,
 2429 T.; WEGEMANN, B.; BOTTCHE, V.; EBERLIN, M.N.; SANTOS, M.V. Short
 2430 communication: Identification of subclinical cow mastitis pathogens in milk by
 2431 matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry.
 2432 *Journal of Dairy Science*, v.93, p5661-7, 2010.
- 2433 BARUAH, M.; LINGDOH, C.; LINGDOH, W.V.; TALUKDAR, R. Noncatheter-
 2434 related bacteraemia due to *Chryseobacterium indologenes* in an immunocompetent
 2435 patient. *Indian Journal of Medical Microbiology*, v.34, n.3, p.380-381, 2016.
- 2436 BEAN, D.C.; WIGMORE, S.M. Carriage rate and antibiotic susceptibility of
 2437 coagulase-positive staphylococci isolated from healthy dogs in Victoria, Australia.
 2438 *Australian Veterinary Journal*, v.94, n.12, p.456-460, 2016.
- 2439 BENTLEY, R.T.; TAYLOR, A.R.; THOMOVSKY, S.A. Fungal infections of the
 2440 central nervous system in small animals: clinical features, diagnosis, and
 2441 management. *The Veterinary Clinics of North America. Small Animal Practice*,
 2442 v.48, n.1, 2018.
- 2443 BÖRJESSON, S.; GÓMEZ-SANZ, E.; EKSTRÖM, K.; TORRES, C.; GRÖNLUND,
 2444 U. *Staphylococcus pseudintermedius* can be misdiagnosed as *Staphylococcus*
 2445 *aureus* in humans with dog bite wounds. *European Journal of Clinical*
 2446 *Microbiology & Infectious Diseases*, v.34, p.839-834, 2015.

- 2447 BRAGA, C.A.S.B.; RESENDE, C.M.F.; PESTANA, A.C.N.R.; CARMO, L.S.;
 2448 COSTA, J.E.; SILVA, L.A.F.; ASSIS, L.N.; LIMA, L.A.; FARIAS, L.M.;
 2449 CARVALHO, M.A.R. Isolamento e identificação da microbiota periodontal de cães
 2450 da raça Pastor Alemão. *Ciência Rural*, v.35, n.2, p.385-390, 2005.
- 2451 BRITO, E.H.S.; FONTANELLE, R.O.S.; BRILHANTE, R.S.N.; CORDEIRO, R.A.;
 2452 MONTEIRO, A.J.; SIDRIM, J.J.C.; ROCHA, M.F.G. The anatomical distribution
 2453 and antimicrobial susceptibility of yeast species isolated from healthy dogs. *The*
 2454 *Veterinary Journal*, v.182, p.320-326, 2009.
- 2455 BROOK, I. Microbiology and management of human and animal bite wound
 2456 infections. *Primary Care*, v.30, n.1, p.25-39, 2003.
- 2457 BUTLER, T. *Capnocytophaga canimorsus*: an Emerging cause of sepsis, meningitis,
 2458 and post-splenectomy infection after dog bites. *European Journal of Clinical*
 2459 *Microbiology & Infectious Diseases*, v.34, n.7, p.1271-1280, 2015.
- 2460 BYGOTT, J.M.; MALNICK, H.; SHAH, J.J.; CHATTAWAY, M.A.; KARAS, A.
 2461 First clinical case of *Corynebacterium auriscanis* isolated from localized dog bite
 2462 infection. *Journal of Medical Microbiology*, v.57, p.899-900, 2008.
- 2463 CAPELLAN, O.; HOLLANDER, J.E. Management of lacerations in the emergency
 2464 department. *Emergency Medicine Clinics of North America*, v.21, n.1, p.205-231,
 2465 2003.
- 2466 CENTERS FOR DISEASE CONTROL (CDC). 2013. Antibiotic resistance threats in
 2467 the United States. Centers of Disease Control and Prevention, Atlanta, EUA.
- 2468 CHANG, K.; SIU, L.K.; CHEN, Y.H.; LU, P.L.; CHEN, T.C.; HSIEH, H.C.; LIN,
 2469 C.L. Fatal *Pasteurella multocida* septicemia and necrotizing fasciitis related with
 2470 wound licked by a domestic dog. *Scandinavian Journal of Infectious Disease*, v.39,
 2471 p.167-192, 2007.
- 2472 CHEN, Y.; LIAO, K.; AI, L.; GUO, P.; HUANG, H.; WU, Z.; LIU, M. Bacteremia
 2473 caused by *Bergeyella zoohelcum* in an infective endocarditis patient: case report
 2474 and review of literature. *BMC Infectious Diseases*, v.17, n.271, 2017.
- 2475 CHUANG, C.Y.; YANG, Y.L.; HSUEH, P.R.; LEE, P.I. Catheter-related bacteremia
 2476 caused by *Staphylococcus pseudintermedius* refractory to antibiotic-lock therapy in
 2477 a hemophilic child with dog exposure. *Journal of Clinical Microbiology*, v.48, n.4,
 2478 p.1497-1498, 2010.
- 2479 CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE (CLSI). In:
 2480 *Performance Standards for Antimicrobial Disk and Dilution Susceptibility Tests for*
 2481 *Bacteria Isolated from Animals*. 3rd ed. CLSI supplement VET01S. Wayne, PA:
 2482 Clinical and Laboratory Standards Institute; 2015.
- 2483 CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE (CLSI). In:
 2484 *Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing*. 29th ed. CLSI
 2485 supplement M100. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2019.
- 2486 ESCH, K.J.; PETERSEN, C.A. Transmission and epidemiology of zoonotic protozoal
 2487 diseases of companion animals. *Clinical Microbiology Reviews*, v.26, n.1, p.58-85,
 2488 2013.
- 2489 FARGHALI, H.A.; ABDELKADER, N.A.; ABUBAKR, H.O.; ALJUAYDI, S.;
 2490 KHATTAB, M.S.; ELHELW, R.; ELHARIRI, M. Antimicrobial action of
 2491 autologous platelet-rich plasma on MRSA-infected skin wounds in dogs. *Scientific*
 2492 *Reports*, v.9, n.1, 2019.
- 2493 FERREIRA, T.S.P.; MORENO, L.Z.; FELIZARDO, M.R.; DE GOBBI, D.D.S.;
 2494 FILSNER, P.H.L.N.; GOMES, V.T.M.; MORENO, M.; MORENO, A.M. Pheno-
 2495 and genotypic characterization of *Pasteurella multocida* isolated from cats, dogs

- 2496 and rabbits from Brazil. *Comparative Immunology, Microbiology and Infectious*
 2497 *Diseases*, v.45, p.48-52, 2016.
- 2498 FESSLER, A.T.; SCHUENEMANN, R.; KADLEC, K.; HENSEL, V.; BROMBACH,
 2499 J.; MURUGAIYAN, J.; OECHTERING, G.; BURGNER, I.A.; SCHWARZ, S.
 2500 Methicilin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) and methicillin-resistant
 2501 *Staphylococcus pseudintermedius* (MRSP) among employees and in the
 2502 environment of a small animal hospital. *Veterinary Microbiology*, v.221, p.153-
 2503 158, 2018.
- 2504 FUNKE, G.; ENGLERT, R.; FRODL, R.; BERNARD, K.A.; STENGER, S.
 2505 *Corynebacterium canis* sp. nov., isolated from a wound infection caused by a dog
 2506 bite. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, v.60,
 2507 n.11, 2010.
- 2508 GILBERT, J.A.; MEYER, F.; ANTONOPOULOS, D.; BALAJI, P.; BROWN, C.T.;
 2509 BROWN, C.T.; DESAI, N.; EISEN, J.A.; EVERS, D.; FIELD, D.; FENG, W.;
 2510 HUSON, D.; JANSSON, J.; KNIGHT, R.; KNIGHT, J.; KOLKER, E.;
 2511 KONSTANTINDIS, K.; KOSTKA, J.; KYRPIDES, N.; MACKELPRANG, R.;
 2512 MCHARDY, A.; QUINCE, C.; RAES, J.; SCZYRBA, A.; SHADE, A.; STEVENS,
 2513 R. Meeting Report: The Terabase Metagenomics Workshop and the Vision of an
 2514 Earth Microbiome Project. *Standards in Genomic Sciences*, v.3, n.3, p.243–8, 2010.
- 2515 GILBERT, J.A.; JANSSON, J.K.; KNIGHT, R. The Earth Microbiome project:
 2516 successes and aspirations. *BMC Biology*, e.12:69, 2014.
- 2517 GONÇALVES, J.L.; TOMAZI, T.; BARREIRO, J.R.; BRAGA, P.A.C.; FERREIRA,
 2518 C.R.; ARAÚJO JUNIOR, J.P.; EBERLIN, M.N.; SANTOS, M.V. Identification of
 2519 *Corynebacterium* spp. isolated from bovine intramammary infections by matrix-
 2520 assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry. *Veterinary*
 2521 *Microbiology*, v.173, p.147-151, 2014.
- 2522 GOODALE, E.C.; OUTERBRIDGE, C.A.; WHITE, S.D. *Aspergillus* otitis in small
 2523 animals – a retrospective study of 17 cases. *Veterinary Dermatology*, v.27, n.1,
 2524 2016.
- 2525 GREENE, C.E. *Infectious Diseases of the Dog and Cat*. 4.ed. St. Louis: Saunders
 2526 Elsevier, 2012.
- 2527 GRIFFIN, G.M.; HOLT, D.E. Dog-bite wounds: bacteriology and treatment outcome
 2528 in 37 cases. *Journal of the American Animal Hospital Association*, v.37, n.5, p.453-
 2529 460, 2001.
- 2530 HEYEDECKE, A.; ANDERSSON, B.; HOLMDAHL, T.; MELHUS, A. Human
 2531 wound infections caused by *Neisseria animaloris* and *Neisseria zoodegmatis*,
 2532 former CDC Group EF-4^a and EF-4b. *Infection Ecology & Epidemiology*, v.3, n.1,
 2533 2013.
- 2534 HUANG, T.M.; CHOU, C.C. Methicilin-sensitive and methicillin-resistant
 2535 *Staphylococcus aureus* strains and their toxin genes in the nostrils of dogs and
 2536 workers at an animal shelter. *Journal of Applied Microbiology*, v.126, n.6, 2019.
- 2537 KASEMPIMOLPORN, S.; BENJAVONGKULCHAI, M.; SAENGSEESOM, W.;
 2538 SITPRIJA, V. Oral bacterial flora of dogs with and without rabies: a preliminary
 2539 study in Thailand. *Journal of the Medical Association of Thailand = Chotmai het*
 2540 *Thangphaet*, v.86, n.12, p.1162-1166, 2003.
- 2541 KIZERWETTER-SWIDA, M.; CHROBAK-CHMIEL, D.; RZEWUSKA, M. High
 2542 level mupirocin resistance in methicilin-resistant staphylococci isolated from dogs
 2543 and cats. *BMC Veterinary Research*, v.15, n.1, 2019.
- 2544 KNOBEL, D.L.; CLEAVELAND, S.; COLEMAN, P.G.; FÈVERE, E.M.;
 2545 MELTZER, M.I.; MIRANDA, M.E.G.; SHAW, A.; ZINSSTAG, J.; MESLIN, F.X.

- 2546 Re-evaluating the burden of rabies in Africa and Asia. *Bulletin of the World Health*
 2547 *Organization*, v.83, n.5, p.360-368, 2005.
- 2548 LACAZ, C.S.; PORTO, E.; MARTINS, J.E.C.; HEINS-VACCARI, E.M.;
 2549 TAKAHASHI DE MELO, N. *Tratado de Micologia médica*. 9. ed. São Paulo:
 2550 Sarvier, 2002. 1104p.
- 2551 LANDMAN, D.; BRATU, S.; KOCHAR, S.; PANWAR, M.; TREHAN, M.;
 2552 DOYMAZ, M.; QUALE, J. Evolution of antimicrobial resistance among
 2553 *Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter baumannii* and *Klebsiella pneumoniae* in
 2554 Brooklyn, NY. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, v.60, n.1, 78-82, 2007.
- 2555 LEMSADDEK, T.S.; TAVARES, M.; BRAZ, S.B.; TAVARES, L.; OLIVEIRA, M.
 2556 Enterococcal infective endocarditis following periodontal disease in dogs. *Plos*
 2557 *One*, p.1-6, 2016.
- 2558 LIN, W.R.; CHEN, Y.S.; LIU, Y.C. Cellulitis and bacteremia caused by *Bergeyella*
 2559 *zoohelcum*. *Journal of the Formosan Medical Association*, v.106, n.7, p.573-576,
 2560 2007.
- 2561 LIN, W.; PATIL, P.M. Facial dog attack injuries. *Indian Journal of Surgery*, v.77, n.1,
 2562 p.55-8, 2015.
- 2563 LOZANO, C.; REZUSTA, A.; FERRER, I.; LAGUNA, V.P.; ZARAZAGA, M.;
 2564 RIPA, L.R.; REVILLO, M.J.; TORRES, C. *Staphylococcus pseudintermedius*
 2565 human infection cases in Spain: dog-to-human transmission. *Vector-Borne and*
 2566 *Zoonotic Diseases*, v.17, n.4, 2017.
- 2567 MAGIORAKOS, A.P.; SRINIVASAN, A.; CAREY, R.B.; CARMELI, Y.;
 2568 FALAGAS, M.E.; GISKE, C.G.; HARBARTH, S.; HINDLER, J.F.;
 2569 KAHLMEIER, G.; LILJEQUIST, B.O.; PATERSON, D.L.; RICE, L.B.;
 2570 STELLING, J.; STRUELENS, M.J.; VATOPOULOS, A.; WEBER, J.T.;
 2571 MONNET, D.L. Multidrug-resistant, extensively drug-resistant and pandrug-
 2572 resistant bacteria: an international expert proposal for interim standard definitions
 2573 for acquired resistance. *Clinical Microbiology and Infection*, v.18, n.3, p.268-281,
 2574 2012.
- 2575 MCEWEN, S.A.; COLLIGNON, P.J. Antimicrobial resistance: a One Health
 2576 perspective. *Microbiology Spectrum*, v.6, n.2, 2018.
- 2577 MERRIAM, C.V.; FERNANDEZ, H.T.; CITRON, D.M.; TYRREL, K.L.; WARREN,
 2578 Y.A.; GOLDSTEIN, E.J.C. Bacteriology of human bite wound infections.
 2579 *Anaerobe*, v.9, p.83-86, 2003.
- 2580 MEYERS, B.; SCHOEMAN, J.P.; GODDARD, A.; PICARD, J. The bacteriology and
 2581 antimicrobial susceptibility of infected and non-infected dog bite wounds: Fifty
 2582 cases. *Veterinary Microbiology*, v.127, n.3-4, p.360-8, 2008.
- 2583 MONTEJO, M.; AGUIRREBENGOA, K.; UGALDE, J.; LOPEZ, L.; SAEZ-NIETO,
 2584 J.A.; HERNÁNDEZ, J.L. *Bergeyella zoohelcum* bacteremia after a dog bite.
 2585 *Clinical Infectious Diseases*, v.33, n.9, p.1608-1609, 2001.
- 2586 MUKERJI, R.; KAKARALA, R.; SMITH, S.J.; KUSZ, H.G. *Chryseobacterium*
 2587 *indologenes*: an Emerging infection in the USA. *BMC Case Report*, 2016.
- 2588 MURAKAMI, K.; MINAMIDE, K.; WADA, K.; NAKAMURA, E.; TERAOKA, H.;
 2589 WATANABE, S. Identification of methicillin-resistant strains of staphylococci by
 2590 polymerase chain reaction. *Journal Clinical Microbiology*, v.29, p.2240-4, 1991.
- 2591 MURAMATSU, Y.; HARAYA, N.; HORIE, K.; UCHIDA, L.; KOORIYAMA, T.;
 2592 SUZUKI, A.; HORIUCHI, M. *Bergeyella zoohelcum* isolated from oral cavities of
 2593 therapy dogs. *Zoonoses and Public Health*, v.66, n.8, 2019.

- 2594 NAVARRO-NAVAJAS, A.; ARIZA-ORDOÑEZ, N.; BARRERA, C. Bacteriemia por
2595 *Pasteurella multocida* asociada al contacto con un animal doméstico. *Revista*
2596 *Chilena de Infectología*, v.36, n.5, p.667-669, 2019.
- 2597 OEHLER, R.L.; VELEZ, A.P.; MIZRACHI, M.; LAMARCHE, J.; GOMPF, S. Bite-
2598 related and septic syndromes caused by cats and dogs. *The Lancet Infectious*
2599 *Diseases*, v.9, n.7, p.439-447, 2009.
- 2600 OH, C.; LEE, K.; CHEONG, Y.; LEE, S.W.; PARK, S.Y.; SONG, C.S.; CHOI, I.S.;
2601 LEE, J.B. Comparison of the oral microbiomes of canines and their owners using
2602 next-generation sequencing. *Plos One*, v.10, n.7, 2015.
- 2603 OLIVEIRA, M.A. *Distribuição espaço-temporal de casos de agressões caninas em*
2604 *Belo Horizonte, 2007/2011*. 2013. 65p. Dissertação (Mestrado em Epidemiologia) –
2605 Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.
- 2606 PRASIL, P.; RYSKOVA, L.; PLISEK, S.; BOSTIK, P. A rare case of purulent
2607 meningitis caused by *Capnocytophaga canimorsus* in the Czech Republic – case
2608 report and review of the literature. *BMC Infectious Diseases*, v.20, n.100, 2020.
- 2609 QUINN, P.J.; MARKEY, B.K.; LEONARD, F.C.; FITZPATRICK, E.S.; FANNING,
2610 S.; HARTIGAN, P.J. *Veterinary Microbiology and Microbial Diseases*. 2.ed., UK:
2611 Wiley-Blackwell, 2011. 1231p.
- 2612 RIBEIRO, M.G.; RISSETI, R.M.; BOLAÑOS, C.A.; CAFFARO, K.A.; DE MORAIS,
2613 A.B.C.; LARA, G.H.; ZAMPROGNA, T.O.; PAES, A.C.; LISTONI, F.J.P.;
2614 FRANCO, M.M. *Trueperella pyogenes* multispecies infections in domestic
2615 animals: a retrospective study of 144 cases (2002 to 2012). *Veterinary Quarterly*,
2616 v.35, n.2, p.82-7, 2015.
- 2617 RIEGEL, P.; MOREL, L.J.; LEVANTIE, B.; BOISSET, S.; VANDENESCH, F.;
2618 PRÉVOST, G. Coagulase-positive *Staphylococcus pseudintermedius* from animals
2619 causing human endocarditis. *International Journal of Medical Microbiology*, v.301,
2620 p.237-239, 2011.
- 2621 RUIZ, A.A.; CASTILLO, T.R.A.; SÁNCHEZ, J.M. Púrpura fulminante aguda
2622 infecciosa secundaria a una herida por mordedura de perro.
- 2623 SANTIN, R.; MATTEI, A.S.; WALLER, S.B.; MADRID, I.M.; CLEFF, M.B.;
2624 XAVIER, M.O.; NOBRE, M.O.; NASCENTE, P.S.; MELLO, J.R.B.; MEIRELES,
2625 M.C.A. Clinical and mycological analysis of dog's oral cavity. *Brazilian Journal of*
2626 *Microbiology*, v.143, p.139-143, 2013.
- 2627 SQUIRE, G.; HETHERINGTON, S. First reported case of lead-related infective
2628 endocarditis secondary to *Capnocytophaga canimorsus*: “Dog scratch”
2629 endocarditis. *BMJ Case Reports*, v.13, n.2, 2020.
- 2630 SRECNIK, S.; ZDOVC, I.; JAVORSEK, U.; PIRS, T.; PAVLICA, Z.; NEMEC, A.
2631 Microbiological aspects of naturally occurring primary endodontic infections in
2632 dogs. *Journal of Veterinary Dentistry*, v.36, n.2, p.124-128, 2019.
- 2633 TALAN, D.A.; CITRON, D.M.; ABRAHAMIAN, F.M.; MORAN, G.J.;
2634 GOLDSTEIN, E.J.C. Bacteriology analysis of infected dog and cat bites. *The New*
2635 *England Journal of Medicine*, v.340, n.2, p.85-92, 1999.
- 2636 THOMPSON, L.R.; SANDERS, J.G.; MCDONALD, D.; AMIR, A.; LADAU, J.;
2637 LOCEY, K.J.; PRILL, R.J.; TRIPATHI, A.; GIBBONS, S.M.; ACKERMANN, G.;
2638 NAVAS-MOLINA, J.A.; JANSSEN, S.; KOPYLOVA, E.; VÁZQUEZ-BAEZA,
2639 Y.; GONZÁLEZ, A.; MORTON, J.T.; MIRARAB, S.; XU, Z.Z.; JIANG, L.;
2640 HAROON, M.F.; KANBAR, J.; ZHU, Q.; SONG, S.J.; KOSCIOLEK, T.;
2641 BOKULICH, N.A.; LEFLER, J.; BRISLAWN, C.J.; HUMPHREY, G.; OWENS,
2642 S.M.; HAMPTON-MARCELL, J.; BERG-LYONS, D.; MCKENZIE, V.; FIERER,
2643 N.; FUHRMAN, J.A.; CLAUSET, A.; STEVENS, R.L.; SHADE, A.; POLLARD,

- 2644 K.S.; GOODWIN, K.D.; JANSSON, J.K.; GILBERT, J.A.; KNIGHT, R. The Earth
2645 Microbiome Project Consortium. A communal catalogue reveals Earth's multiscale
2646 microbial diversity. *Nature*, v.551, p.457-463, 2017.
- 2647 THRUSFIELD, M. *Veterinary Epidemiology*. 3th edn, Blackwell Publishing. United
2648 Kingdom: Oxford, 2007. 626p.
- 2649 TRABULSI, L.R.; SAMPAIO, M.C. Microbiota ou flora normal do corpo humano. In:
2650 TRABULSI, L.R.; ALTHERTUM, F. *Microbiologia*. Atheneu: São Paulo, 2005. p.
2651 101-109.
- 2652 TRIOLA, M.F. *Introdução à Estatística*. 9ª ed. LTC: Rio de Janeiro, 2005. 682p.
- 2653 URSELL, L.K.; METCALF, J.L.; PARFREY, L.W.; KNIGHT, R. Defining the
2654 human microbiome. *Nutrition reviews*, v.70, p.38-44, 2012.
- 2655 VIANA, L.; GONÇALVES, R.C.; OLIVEIRA FILHO, J.P.; PAES, A.C.; AMORIM,
2656 R.M. Ocorrência de *Mannheimia haemolytica* e de *Pasteurella multocida* em
2657 ovinos sadios e com enfermidade respiratória. *Arquivo Brasileiro de Medicina*
2658 *Veterinária e Zootecnia*, v.59, n.6, p.1579-1582, 2007.
- 2659 WADE, T.; BOOY, R.; TEARE, E.L.; KROLL, S. *Pasteurella multocida* meningitis I
2660 infancy – (a lick may be as bad as bite). *European Journal of Pediatrics*, v.158,
2661 p.875-878, 1999.
- 2662 WIPF, J.R.; PERRETEN, V. Methicilin-resistant *Staphylococcus aureus* isolated from
2663 dogs and cats in Switzerland. *Schweiz Archiv fur Tierheilkunde*, v.158, n.6, 2016.
- 2664 WOLFF, K.D. Management of animal bite injuries of the face: Experience with 94
2665 patients. *Journal of Oral and Maxillofacial Surgery*, v.56, n.7, p.838-843, 1998.
- 2666 WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). 2014. Antimicrobial resistance:
2667 global report on surveillance. WHO, Geneva, Suíça.
- 2668 WORTHING, K.A.; BROWN, J.; GERBER, L.; TROTT, D.J.; ABRAHAM, S.;
2669 NORRIS, J.M. Methicilin-resistant staphylococci amongst veterinary personnel,
2670 personnel-owned pets, patients and hospital environment of two small animal
2671 veterinary hospitals. *Veterinary Microbiology*, v.223, p.79-85, 2018.
- 2672 ZAITZ, C.; CAMPBELL, I.; MARQUES, S.A.; RUIZ, L.R.B.; SOUZA, V.M.
2673 *Compêndio de Micologia Médica*. Medsi: Rio de Janeiro, 1998. 434p.
- 2674 ZAMBORI, C.; CUMPANASOIU, C.; BIANCA, M.; TIRZIU, E. Biofilms in oral
2675 cavity of dogs and implication in zoonotic infections. *Scientific Papers: Animal*
2676 *Science and Biotechnologies*, v.46, n.1, p.155-158, 2013.

2677

2678