

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA
CAMPUS BOTUCATU

IDENTIFICAÇÃO E AVALIAÇÃO ANTIMICROBIANA DE *Lactobacillus casei* SOBRE
ISOLADOS CLÍNICOS DE *Staphylococcus pseudintermedius*

DANIELLE CAVALCANTI DE CARVALHO DINIZ

Botucatu - SP
Setembro – 2023

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA
CAMPUS BOTUCATU

IDENTIFICAÇÃO E AVALIAÇÃO ANTIMICROBIANA DE *Lactobacillus casei* SOBRE
ISOLADOS CLÍNICOS DE *Staphylococcus pseudintermedius*

DANIELLE CAVALCANTI DE CARVALHO DINIZ

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

Orientador: Prof. Dr. Luiz
Henrique de Araújo Machado

Co-Orientador: Prof. Dr. Adriano
Sakai Okamoto

Botucatu - SP
Setembro – 2023

FICHA CATALOGRÁFICA

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CÂMPUS DE BOTUCATU - UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: MARIA CAROLINA A. CRUZ E SANTOS-CRB 8/10188

Diniz, Danielle Cavalcanti de Carvalho.

Identificação e avaliação antimicrobiana de *Lactobacillus casei* sobre isolados clínicos de *Staphylococcus pseudintermedius* / Danielle Cavalcanti de Carvalho Diniz. - Botucatu, 2023

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia
Orientador: Luiz Henrique de Araújo Machado
Coorientador: Adriano Sakai Okamoto
Capes: 50502000

1. Probióticos. 2. Infecções. 3. Pele - Doenças. 4. Bacterioses.
5. Resistência Microbiana a Medicamentos. 6. Saúde Única.

Palavras-chave: Bacterioterapia; Infecção; Piodermite; Resistência microbiana; Saúde única.

Nome da autora: Danielle Cavalcanti de Carvalho Diniz

Título: ISOLAMENTO E AVALIAÇÃO ANTIMICROBIANA DE *Lactobacillus casei*
SOBRE CULTURAS DE *Staphylococcus pseudintermedius*

COMISSÃO EXAMINADORA

Prof. Dr. Luiz Henrique de Araújo Machado
Orientador
Departamento de Clínica Veterinária
FMVZ – UNESP – Botucatu

Profa. Dra. Maria Lúcia G Lourenço
Membro
Departamento de Clínica Veterinária
FMVZ – UNESP – Botucatu

Prof. Dr. Marconi Rodrigues de Farias
Membro
Departamento de de Clínica Médica Veterinária
Pontifícia Universidade Católica do Paraná- PUCPR

Data da Defesa: 23 de outubro de 2023

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Perfil de susceptibilidade dos isolados de <i>S. pseudintermedius</i> ...	35
Tabela 2 - Valores do tamanho dos halos de inibição formados a partir da borda da colônia dos <i>Lactobacillus</i> sobre cada isolado de <i>S. pseudintermedius</i>	42
Tabela 3 - Resultado do teste de Tukey entre os pares de amostras; um valor 0 (verde) significa que as respostas das amostras são compatíveis entre si num nível de significância de 95%, enquanto um valor 1 (vermelho) significa que as respostas das amostras não são compatíveis entre si, no mesmo nível de significância; “SOMA” indica o número de amostras com as quais cada amostra se mostrou incompatível.....	44
Tabela 4 - Diâmetro de inibição dos antimicrobianos sobre o isolado de <i>L. casei</i>	45
Tabela 5 - Perfil de susceptibilidade de <i>L. casei</i>	45

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 -	Ilustração esquemática das camadas da epiderme.....	13
Figura 2 -	Formas de ação dos peptídeos antimicrobianos.....	15
Figura 3 -	Representação esquemática da modulação imunológica realizada pela microbiota cutânea.....	18
Figura 4 -	Filos e famílias bacterianos mais comuns identificados na axila, virilha, pele interdigital e narina de cães alérgicos e saudáveis...	19
Figura 5 -	Mecanismo de ação dos probióticos e relação com sistema imune.....	20
Figura 6 -	Classificação das piodermites de acordo com a profundidade...	22
Figura 7-	Bacteriocinas produzidas pelo <i>L.casei</i>	33
Figura 8 -	Ilustração do processo de coleta e identificação de amostras de <i>S. pseudintermedius</i>	36
Figura 9 -	Ilustração do processo de coleta e identificação de amostras de <i>L. casei</i>	37
Figura 10 -	Ilustração do processo de caracterização probiótica.....	39
Figura 11 -	Cultura de amostra proveniente de pavilhão auricular, apresentando colônias de cor creme e com bordas lisas, compatível com bactéria ácido láctica.....	40
Figura 12 -	Microscopia de isolado de bactérias Gram-positivas, de forma bacilar e dispostas em cadeia.....	40
Figura 13 -	Atividade inibitória de <i>Lactobacillus casei</i> em isolado #33 demonstrada pela presença de halo sem crescimento de <i>S. pseudintermedius</i>	40
Figura 14 -	Raio médio dos halos de inibição para cada isolado de <i>S. pseudintermedius</i>	42
Figura 15 -	Raio médio do halo de inibição obtido em cada isolado, empregando-se <i>Lactobacillus</i> em função do raio médio obtido para o controle positivo no mesmo isolado.....	42
Figura 16 -	Atividade inibitória dos antimicrobianos demonstrada pela presença de halo sem crescimento de <i>L. casei</i>	42

LISTA DE ABREVIACOES

BAL	Bactéria cido-láctica
CIM	Concentração inibitória mínima
MALDI- TOF MS	Matrix Assisted Laser Desorption Ionization Time of Flight Mass Spectrometry
MDR	Multidrug resistance
MHC	Mueller Hinton Caldo
MRSP	Methicillin resistant <i>Staphylococcus pseudintermedius</i>
MSSP	Methicillin sensible <i>Staphylococcus pseudintermedius</i>
PAM	Peptídeo antimicrobiano
PAMP	Pathogen-associated molecular pattern
PCR	Polimerase Chain Reaction
SIG	<i>Staphylococcus intermedius</i> Group

SUMÁRIO

RESUMO	9
ABSTRACT	10
1 INTRODUÇÃO	11
2 REVISÃO DE LITERATURA	13
2.1 Barreira Cutânea	13
2.1.1 Barreira Física.....	13
2.2 Microbioma.....	15
2.2.1 Microbioma Cutâneo.....	17
2.3 Piodermites	21
2.3.1 Definição	21
2.3.2 Etiologia.....	22
2.3.3 Diagnóstico.....	24
2.3.4 Tratamento	24
2.3.4.1 Terapia Tópica.....	25
2.3.4.2 Terapia Sistêmica.....	26
2.3.4.3 Vacinas	27
2.3.4.4 Bacteriófagos.....	27
2.3.4.5 Peptídeos Antimicrobianos.....	27
2.3.4.6 Probióticos	28
2.3.4.6.1 Bactérias Ácido-Lácticas	30
2.3.4.6.1.1 <i>Lactobacillus casei</i>	31
3 MATERIAL E MÉTODOS.....	33
3.1 Origem e coleta das amostras	33
3.2. Identificação das amostras de <i>S. pseudintermedius</i>	34
3.3. Identificação do <i>Lactobacillus casei</i>	36
3.4. Contagem de unidades formadoras de colônias	34
3.5. Análise estatística.....	34
3.6. Determinação de segurança e caracterização probiótica	37
4 RESULTADOS	39
4.1 Avaliação antimicrobiana	40
5 DISCUSSÃO.....	44
6 CONCLUSÃO	47
7 BIBLIOGRAFIA.....	48
8 ARTIGO CIENTÍFICO	57

Diniz, D.C.C. **Identificação e avaliação antimicrobiana de *Lactobacillus casei* sobre isolados clínicos de *Staphylococcus pseudintermedius***. Botucatu, 2023. 66p. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Campus de Botucatu, Universidade Estadual Paulista.

RESUMO

Staphylococcus pseudintermedius é um patógeno de grande importância por seu caráter emergente e zoonótico, podendo causar infecções cutâneas graves. As infecções cutâneas bacterianas são frequentes na rotina clínica veterinária de pequenos animais e são consideradas a principal causa do uso de antibióticos em animais, e a administração dessas medicações de forma equivocada e indiscriminada acaba por aumentar a pressão seletiva sobre bactérias, gerando microrganismos mais resistentes ao longo do tempo. Os antimicrobianos disponíveis estão cada vez mais escassos, e o desenvolvimento de novos fármacos está muito mais lento, gerando enorme preocupação com o futuro cenário da saúde e do controle desses patógenos. Desta forma, torna-se imperativo a pesquisa de novos meios de combate às bactérias patogênicas, sejam elas resistentes ou não. Os probióticos surgem como alternativa aos antibióticos, que atuam não apenas pela inibição e competição com microrganismos patogênicos, mas também auxilia na regulação do sistema imune. O presente estudo objetivou isolar e avaliar o potencial antimicrobiano de *Lactobacillus casei*, isolado da pele saudável de um cão, sobre *S. pseudintermedius* usando o método de difusão em ágar. A cepa de *Lactobacillus casei* inibiu o crescimento de todos os isolados de *S. pseudintermedius*, incluindo o resistente à meticilina. A zona de inibição variou de 6 a 20 milímetros, a partir da borda do *L.casei*. Os resultados demonstram que o uso de bactérias comensais da pele canina no controle de infecções bacterianas causadas por *S. pseudintermedius* é uma terapia promissora com significativa relevância para a saúde animal e humana.

Palavras-chave: piodermite, infecção, bacterioterapia, saúde única, resistência microbiana

Diniz, D.C.C. **Identification and antimicrobial evaluation of *Lactobacillus casei* against *Staphylococcus pseudintermedius* clinical isolates.** Botucatu, 2023. 66p. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Campus de Botucatu, Universidade Estadual Paulista.

ABSTRACT

Staphylococcus pseudintermedius is a pathogen of great importance due to its emerging and zoonotic nature, capable of causing severe skin infections. Bacterial skin infections are common in the veterinary clinical routine of small animals and are considered the main reason for antibiotic use in animals. However, the misguided and indiscriminate administration of these medications increases selective pressure on bacteria, leading to the emergence of more resistant microorganisms over time. The availability of antimicrobials is becoming scarcer, and the development of new drugs is progressing at a slower pace, generating enormous concern about the future health scenario and control of these pathogens. Therefore, it becomes imperative to research new ways to combat pathogenic bacteria, whether they are resistant or not. Probiotics emerge as an alternative to antibiotics, acting not only through the inhibition and competition with pathogenic microorganisms but also by assisting in the regulation of the immune system. The present study aimed to isolate and evaluate the antimicrobial potential of *Lactobacillus casei*, isolated from the healthy skin of a dog, against *S. pseudintermedius* using the agar diffusion method. The *L. casei* strain inhibited the growth of all *S. pseudintermedius* isolates, including the methicillin-resistant ones. The inhibition zone ranged from 6 to 20 millimeters from the edge of *L. casei*. These results demonstrate that the use of commensal bacteria from canine skin in controlling bacterial infections caused by *S. pseudintermedius* is a promising therapy with significant relevance for animal and human health.

Keywords: pyoderma, infection, bacteriotherapy, one health, microbial resistance

1 INTRODUÇÃO

Staphylococcus pseudintermedius é uma bactéria oportunista, sendo encontrada no microbioma cutâneo de humanos e animais saudáveis, ao mesmo tempo em que é uma importante causa de doença (BANNOEHR; GUARDABASSI, 2012). Esta espécie estafilocócica coagulase-positiva está principalmente associada a infecções de pele e otites, mas pode estar envolvida em praticamente todos os tipos de infecções e tem papel na disseminação mundial de cepas resistentes a muitos dos agentes antimicrobianos disponíveis na medicina veterinária (WEESE, 2013). As espécies de *S. pseudintermedius* metilina resistentes (MRSP), deixaram ainda mais difícil o tratamento dessas infecções, e ao passo que a velocidade do aparecimento de resistência a antibióticos está aumentando exponencialmente, a descoberta de antibacterianos só diminuiu nas últimas décadas (BANNOEHR; GUARDABASSI, 2012). Sob a égide da Saúde Única, esse fato não pode ser ignorado, uma vez que os cães ocupam os mesmos espaços que os humanos e podem servir de reservatório de bactérias zoonóticas resistentes (HARTANTYO *et al.*, 2018). Nesse contexto, torna-se imperativo encontrar alternativas ao uso de antibióticos para o tratamento dessas doenças, e os probióticos surgem como uma boa opção.

A conscientização sobre o uso de antibióticos e sua relação com a saúde única, além da busca por alternativas de menores custo e efeitos colaterais que as terapias tradicionais criaram um mercado bilionário de probióticos, avaliado em 58 bilhões de dólares em 2021 e que deve se expandir a uma taxa de crescimento anual de 7,5% de 2021 a 2030. No entanto, apenas 10% desse mercado pertence a produtos para uso veterinário (Verified Market Research, 2022).

Os probióticos são microrganismos vivos que conferem benefício à saúde do hospedeiro quando administrados em quantidades adequadas (ANJANA; TIWARI, 2022). Essas bactérias podem ajudar na modulação local e sistêmica do sistema imunológico hospedeiro, na cicatrização de feridas, no combate a infecções, além de terem utilização cosmética. Muitos estudos têm demonstrado o potencial dos probióticos contra muitas afecções, como doenças alérgicas, diarreia, doença inflamatória intestinal e infecções virais (GEBRAYEL *et al.*,

2022; LI et al., 2019; MCLOUGHLIN et al., 2022; ROBLES ALONSO; GUARNER, 2013). Por essas razões, há um interesse crescente no desenvolvimento de terapias adjuvantes ou alternativas utilizando probióticos, que poderiam ser usados como suplementos para melhorar as propriedades funcionais dos produtos e preparações terapêuticas.

Os microrganismos probióticos mais conhecidos são bactérias pertencentes aos gêneros *Lactobacillus* e *Bifidobacterium*. Cepas de lactobacilos vem demonstrando ter um papel benéfico na defesa contra os processos inflamatórios que afetam a pele, bem como na resistência a infecções por interferirem direta e indiretamente com patógenos (KNACKSTEDT; KNACKSTEDT; GATHERWRIGHT, 2020). Recentemente foi constatado que o *Lactobacillus reuteri* exerce um efeito anti-inflamatório sobre os queratinócitos infectados, reduzindo a transcrição de interleucinas inflamatórias (WIDYARMAN et al., 2018), além de proteger os queratinócitos da morte celular induzida por *S. aureus* por exclusão competitiva de seus locais de ligação nas células (PRINCE; MCBAIN; O'NEILL, 2012). Já o *Lactobacillus plantarum* é capaz de inibir o fator de necrose tumoral (JEON et al., 2016), o que apoia o desenvolvimento de tratamentos que contenham probióticos. Isto posto, este projeto tem como finalidade isolar e caracterizar bactérias do gênero *Lactobacillus* e avaliar sua eficácia antibacteriana in vitro em isolados de *S. pseudintermedius*.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Barreira cutânea

A barreira cutânea é constituída mais externamente por camadas de células mortas e compactadas (estrato córneo), entremeadas por lamelas lipídicas, preenchidos por ceramidas, colesterol e ácidos graxos livres, deixando a pele mais coesa, além de enzimas e peptídeos antimicrobianos (PAMs) (LEFÈVRE-UTILE *et al.*, 2021). A ruptura da barreira cutânea permite a entrada de alérgenos e microrganismos, aumenta o contato e exposição às células do sistema imune, gera uma estimulação da imunidade local e a liberação de mediadores inflamatórios que agravam ainda mais a disfunção de barreira (ELIAS; HATANO; WILLIAMS, 2008). Logo, a pele íntegra é um fator indispensável na prevenção e combate a infecções e qualquer doença que curse com a ruptura dessa barreira pode ser o fator desencadeador de uma reação inflamatória e estabelecimento de infecções secundárias.

2.1.1 Barreira física

A epiderme é reconhecida primariamente por sua função de barreira física e como um obstáculo à penetração de agentes externos, desempenhada pelas várias camadas de células presentes na pele. No estrato mais superficial, os corneócitos estão intimamente conectados entre si por junções celulares e moléculas de adesão, e entre eles estão envelopes de proteína e lipídios que funcionam como barreira permeável. O envelope lipídico dos corneócitos é formado por uma monocamada de ceramidas que serve como pilar de estruturação para os lipídios. Existe ainda uma matriz rica em colesterol, ácidos graxos livres, enzimas, proteínas estruturais e PAMs (ELIAS, 2012).

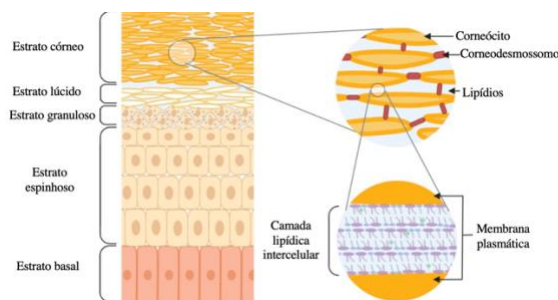


Figura 1. Ilustração das camadas da epiderme. Adaptação (YANG *et al.*, 2020).

2.1.2 Barreira química

O pH cutâneo canino difere do humano e de outros animais domésticos, sendo o mais elevado entre todos eles (DRAIZE, 1942), variando de acordo com a idade do animal e local do corpo, sendo mais ácido na região inguinal e de axilas (SCHLAKE *et al.*, 2022). O caráter ácido do estrato córneo é também um importante constituinte da barreira cutânea, contribuindo com a homeostase da barreira permeável, a integridade e coesão dos queratinócitos, controlando o processo de descamação, a regulação do microbioma cutâneo e com a diminuição da sinalização de citocinas inflamatórias (ELIAS, 2017). Há fatores químicos no estrato córneo que contribuem com a diminuição de seu pH e atividade antimicrobiana através da liberação de PAMs, incluindo a hidrolização de fosfolípidos em ácidos graxos livres e o catabolismo da filagrina em aminoácidos livres (LEFÈVRE-UTILE *et al.*, 2021). Além disso, bactérias e fungos residentes do microbioma fazem a hidrólise de triglicerídeos em ácidos graxos livres (COATES *et al.*, 2019).

Peptídeos antimicrobianos são substâncias expressas por células epiteliais e leucócitos, com atividade contra bactérias, fungos e vírus. Além disso, os PAMs podem promover quimiotaxia e cicatrização de feridas. As duas principais famílias dessas substâncias em mamíferos são as catelicidinas e as defensinas (LEONARD; AFFOLTER; BEVINS, 2012a). Os queratinócitos conseguem distinguir os microrganismos comensais dos patogênicos pela indução de diferentes peptídeos e ativação de vias distintas para induzir uma resposta imune adaptada e rápida (FERNANDES *et al.*, 2023).

A sinalização dos comensais envolve a baixa expressão de PAMs, suficiente apenas para limitar a colonização de patógenos e facilitar seu crescimento na pele. Por outro lado, na presença de organismos patogênicos, a liberação de PAMs é suficiente para matá-los, mas não os comensais (WANKE *et al.*, 2011). Estudos têm demonstrado que alterações na secreção e adesão de PAMs foram associadas a um aumento da incidência de infecção estafilocócica (SANTORO; ARCHER; KELLEY, 2019).

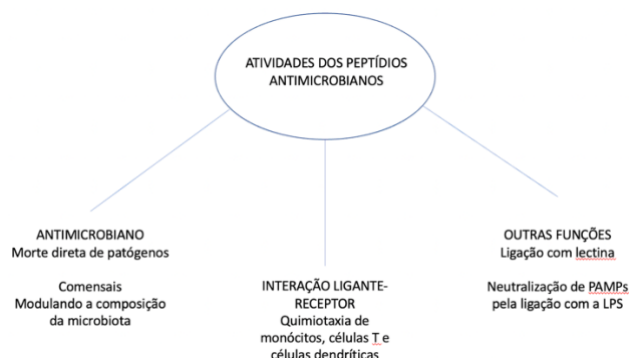


Figura 2. Formas de ação dos peptídeos antimicrobianos. Abreviaturas: LPS, lipopolissacarídeo e PAMP, padrões moleculares associados a patógenos. Adaptação (LEONARD; AFFOLTER; BEVINS, 2012).

2.1.3 Barreira imunológica

A barreira imunológica contém células sentinelas, como os queratinócitos, as células apresentadoras de antígenos, células linfoides, queratinócitos e as células de memória que trabalham juntas para manter a sua integridade. Esse arsenal celular detecta sinais microbianos por meio de padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs) e inicia uma resposta imune adequada, promovendo a inflamação (EYERICH *et al.*, 2018). A resposta inflamatória pode ser mediada por células Th1, que protegem contra patógenos intracelulares, por células Th2, que produzem imunoglobulinas e ativam eosinófilos, por células Th17 que são críticas para a função efetora de neutrófilos, e acredita-se que esse subconjunto de células proteja contra patógenos extracelulares, particularmente nas superfícies epiteliais. As células Th22 promovem e regulam a inflamação e o reparo tecidual e acredita-se que promovam também a proliferação epitelial na pele (NUTTALL *et al.*, 2019).

2.2 Microbioma

Compreender a estrutura e a função de todo o microbioma requer métodos para estudar cada um dos grupos de indivíduos dessa população, algo que pode ser desafiador com ecossistemas grandes e complexos. Tradicionalmente, as populações bacterianas são avaliadas através de métodos convencionais de cultura, no entanto, esse método possui limitações, como a presença de bactérias viáveis, mas não cultiváveis, que requerem condições de crescimento exigentes e são notoriamente difíceis de isolar, ou crescem

facilmente sob condições de cultura padrão, mas se sobrepõem a bactérias mais exigentes (TANG *et al.*, 2020). O reconhecimento dessas limitações levou ao desenvolvimento de novas técnicas para identificação de microrganismos, como a reação em cadeia da polimerase (PCR), que amplifica e detecta genes específicos de um (Singleplex) ou de múltiplos patógenos incluídos em painéis específicos (Multiplex) (AMERICAN ACADEMY OF MICROBIOLOGY; CHELSIE, 2015). O grande inconveniente dos métodos baseados na PCR é que estão limitados apenas a espécies previamente conhecidas (BARCINA; ARANA, 2009). O método de referência para identificação de novas espécies bacterianas é o sequenciamento do gene 16S do RNA ribossomal (rRNA), gene encontrado em todos os genomas bacterianos e composto por regiões altamente conservadas e diferentes (AMERICAN ACADEMY OF MICROBIOLOGY; CHELSIE, 2015). As regiões divergentes dos genes 16S rRNA criam assinaturas microbianas únicas que permitem a identificação molecular dessas bactérias (TURNBAUGH *et al.*, 2007).

Com o avanço da biotecnologia, surgiram métodos usando a espectrometria de massa de tempo de voo de dessorção/ionização a laser assistida por matriz (MALDI-TOF MS) para identificar corretamente e classificar os isolados bacterianos de acordo com seu perfil proteico, resultando em um perfil espectral de massa, que é característico de cada organismo (GANTZIAS, 2020). Esse método é rápido, altamente específico e barato, mas é dependente dos perfis de proteínas cadastrados no banco de dados e o equipamento necessário ainda apresenta um alto custo (HILL *et al.*, 2018). A microbiologia e a dermatologia estão em constante diálogo com o complexo ecossistema de seres que habitam a pele, sejam eles patogênicos ou não. Mesmo com barreiras físicas, químicas e imunológicas, a pele humana consegue abrigar mais de um bilhão de bactérias por centímetro quadrado, e é muito provável que esse número seja muito maior nos cães (TIZARD; JONES, 2018). Embora muitos desses organismos sejam patógenos, os microrganismos comensais também têm papel importante na saúde, mas ainda permanece em aberto até que ponto eles fornecem benefícios diretos ou apenas impedem que outros microrganismos nocivos se estabeleçam (KONG; SEGRE, 2012).

O microbioma é um ecossistema invisível que age como um segundo genoma, interage com os demais componentes da barreira cutânea, tem papel

importante de defesa, além de regular as trocas entre corpo e ambiente para manter a homeostase (GUENICHE, Audrey *et al.*, 2022). O *Staphylococcus epidermidis*, por exemplo, pertencente ao microbioma cutâneo natural inibe a colonização pelo *Staphylococcus aureus* patogênico, além de induzir a expressão de PAMs (KESHARI *et al.*, 2019). Além disso, pode melhorar a função da barreira epidérmica através do aumento da expressão das proteínas de junção celular (LEFÈVRE-UTILE *et al.*, 2021).

2.2.1 Microbioma cutâneo

A grande comunidade de organismos presente na pele podem ser do tipo residente, grupo relativamente fixo, habitualmente encontrados na pele e que tendem a se restabelecer uma vez que o motivo do desequilíbrio cesse, e do tipo transitório, ou seja, não se estabelecem permanentemente na superfície, mas podem persistir por alguns dias. Os dois grupos não são patogênicos se a higiene adequada for mantida e se a flora residente normal, a resposta imune e a função de barreira estiverem intactas. No entanto, após uma perturbação, seja por uso de antimicrobianos, falha na barreira cutânea ou no sistema imune, populações bacterianas residentes e/ou transitórias podem colonizar, proliferar e causar doenças (KONG; SEGRE, 2012).

A disbiose é a mudança na abundância e diversidade de um grupo e está associada a distúrbios cutâneos, como a dermatite atópica, uma vez que a disbiose pode modular a resposta imunológica (SANTORO *et al.*, 2015). Um microbioma cutâneo equilibrado tem o potencial de modular a resposta imune ao determinar a migração de células T reguladoras (Tregs) para a pele após a exposição à alérgenos/patógenos e de células T produtoras de IL-17 (Th17), garantindo uma defesa eficaz. Por outro lado, durante a disbiose o microambiente da pele pode levar à mudança para resposta Th2, dando início a um ciclo de inflamação (EYERICH *et al.*, 2018).

As células dendríticas imaturas (DC) amadurecem após estímulos pró-inflamatórios (IL-1, IL-6, lipopolissacarídeo (LPS), TNF-alfa ou patógenos) ou se tornam DCs tolerogênicas na presença de estímulos anti-inflamatórios TGF-beta e IL-10. A diferenciação de DCs imaturas em DCs maduras ou tolerogênicas também é regulada na presença de probióticos. As DCs maduras conferem uma

série de funções estimuladoras pelas quais estimulam as células Th ou Treg, dependendo da citocina produzida. As DCs maduras interagem com células T CD4 + virgens e, dependendo da citocina resultante produzida as células T CD4 + se diferenciam em células inflamatórias Th1 (as quais podem secretar IL-1, IL-6, IL-12, IFN- gama, TNF-alfa) ou Th17 (que podem secretar IL-17 A, IL-17 F e IL- 22).

Os probióticos regulam as células Treg e/ou células Th2, dependendo da cepa e da doença. As DCs tolerogênicas interagem com as células T e podem estimular diretamente as células Treg na presença de IL-2 e TGF-beta ou de probióticos. Além disso, as DCs maduras estimulam as células T CD8 + em células Tc1, Tc2, Tc9 ou Tc17, no entanto, não está claro se os probióticos estão envolvidos em sua diferenciação / estimulação (EYERICH *et al.*, 2018).

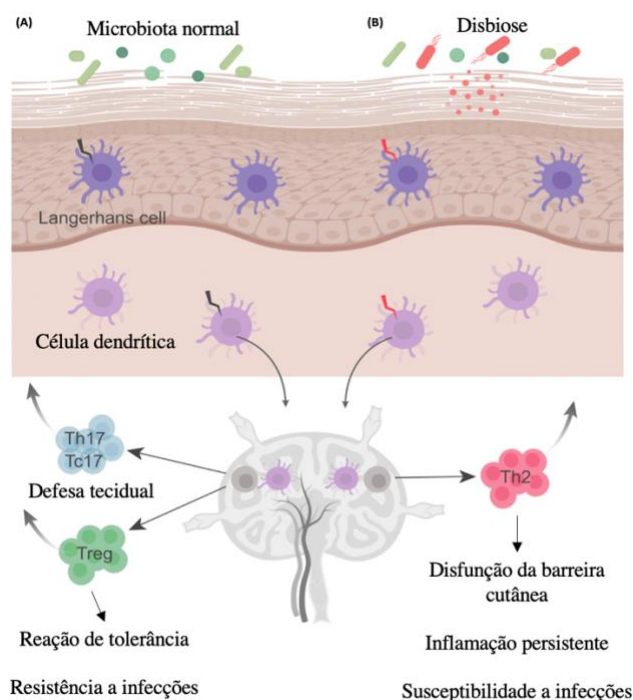


Figura 3. Representação esquemática da modulação imunológica realizada pela microbiota cutânea. Abreviações: Tc, célula T citotóxica; Th, célula T auxiliar. Adaptação (EYERICH *et al.*, 2018).

O microbioma cutâneo é diverso e pode variar de acordo com fatores genéticos, dieta, idade e contato com outros animais, inclusive com compartilhamento da microbiota cutânea (SONG *et al.*, 2013). As bactérias dominantes na superfície da pele dos cães pertencem ao filo Proteobacteria,

seguidas pelas Actinobactérias, Bacteroidetes e Firmicutes, embora a abundância dessas bactérias varie de acordo com a região do corpo estudada. O filo Fusobacteria é também um dos cinco mais abundantes, especialmente na região perianal. As superfícies mucosas mostraram menor riqueza e diversidade em comparação com locais de pele pilosa, como axila e pavilhão auricular, este último tendo a maior diversidade, enquanto a região perianal teve a menor (PEREIRA; CLEMENTE, 2021).

As bactérias mais prevalentes identificadas em amostras de pele saudável foram *Cutibacterium acnes* (5,8%), *S. pseudintermedius* (1,2%) e *Porphyromonas cangingivalis* (1,1%) (TANG *et al.*, 2020). A abundância bacteriana encontrada em amostras de cães saudáveis é semelhante às identificadas em cães alérgicos ou com piodermite, no entanto, apresentam uma diversidade menor quando comparadas às amostras de cães saudáveis (RODRIGUES HOFFMANN *et al.*, 2014). O restabelecimento da barreira cutânea e o tratamento anti-inflamatório parecem trazer à normalidade a diversidade bacteriana da pele (FYHRQUIST, 2019).

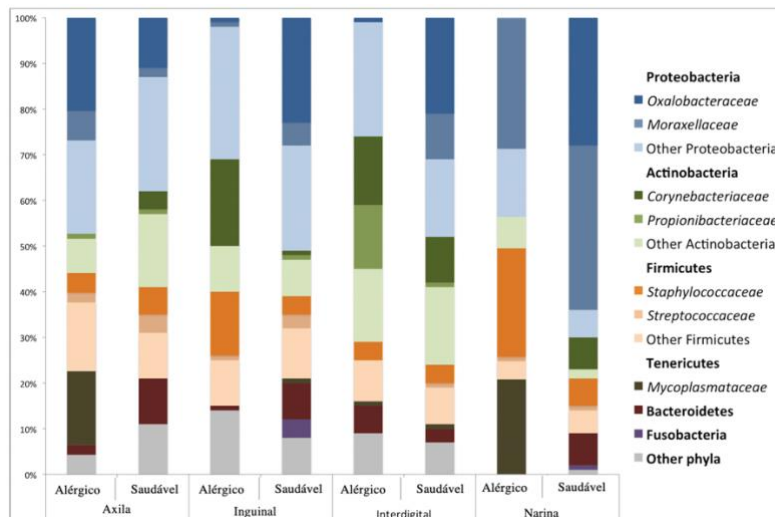


Figura 4. Filos e famílias bacterianos mais comuns identificados na axila, virilha, pele interdigital e narina de cães alérgicos e saudáveis (RODRIGUES HOFFMANN *et al.*, 2014).

2.2.2 Relação entre microbioma e sistema imune

Sob condições de homeostase, organismos comensais, células epiteliais, componentes da barreira química e células do sistema imune trabalham lado a lado para manter a integridade da barreira cutânea (EYERICH *et al.*, 2018). Os organismos comensais ocupam sítios semelhantes aos dos organismos patogênicos, impedindo diretamente sua colonização, além de secretar fatores antimicrobianos, como bacteriocinas, modulinas, ácido propiônico e peptídeos antimicrobianos. Os PAMs produzidos pelas bactérias comensais estimulam as células do sistema imune à vigilância e os queratinócitos a modular a estrutura epidérmica (YU *et al.*, 2020). Em adição, as bactérias comensais também podem promover a tolerância imunológica, reduzindo a inflamação e a gravidade da doença.

Em contrapartida, a epiderme produz nutrientes e ligantes essenciais para o estabelecimento da flora comensal e desenvolve sua defesa por meio da produção de PAMs próprios, da ação de neutrófilos e macrófagos, da produção de citocinas para potencializar a ação de fagócitos e quimiocinas para recrutá-los da corrente sanguínea. Finalmente, a barreira da pele informa o corpo enviando impulsos nervosos e células da pele circulantes para os órgãos linfoides (LEFÈVRE-UTILE *et al.*, 2021).

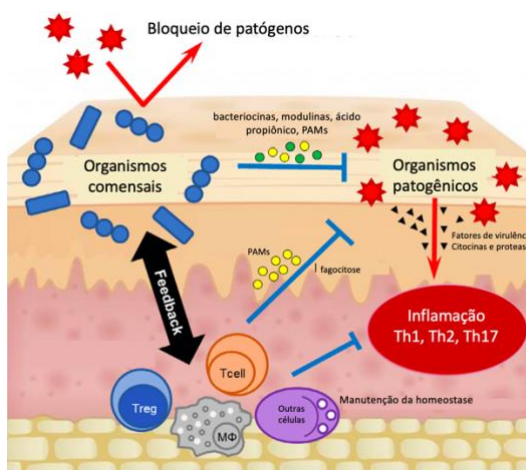


Figura 5. Mecanismo de ação dos probióticos e relação com sistema imune. Adaptado de (YU *et al.*, 2020). Th, linfócito T auxiliar; Treg, célula T reguladora.

Alterações na barreira cutânea, resposta imune ou no microbioma estão intimamente interligadas com as causas de base das infecções cutâneas, tornando muito difícil identificar o evento que iniciou o processo. É um ciclo vicioso em que esses fatores se agravam mutuamente. Logo, o tratamento precisa ser multimodal e agir em todas as áreas simultaneamente para corrigir ou diminuir os efeitos negativos de uma resposta inflamatória autoperpetuante (MARSELLA, 2021).

2.3 Piodermites

2.3.1 Definição

O termo piodermite é derivado do grego *pyon* (pus) + *derma* (pele) e é definido como uma infecção cutânea causada por bactérias piogênicas (JÓSKOWSKA, 2013). Esta afecção é muito mais comum nos cães quando comparada a outras espécies, incluindo a humana, e está associada a eritema, pápulas, pústulas, alopecia, crostas, dor e inflamação (LYNCH; HELBIG, 2021a). As razões para essa maior susceptibilidade ainda não são completamente elucidadas, mas podem incluir fatores anatômicos e fisiológicos. Por exemplo, o estrato córneo canino, a principal barreira física que impede a entrada de bactérias em partes mais profundas da pele, é mais fino e compacto do que o de outras espécies, e também exibe uma escassez de lipídios intercelulares, além de um pH mais alto (GORTEL, 2013). Essas particularidades podem favorecer a proliferação e a aderência de bactérias patogênicas na pele canina (FACCIN *et al.*, 2023).

A piodermite canina pode variar de infecções leves a graves e é mais comumente desencadeada por fatores subjacentes que causam uma disrupção da barreira cutânea, como trauma local, arranhaduras, seborreia, infestações por ectoparasitas, doenças alérgicas e endocrinopatias (GRIFFETH *et al.*, 2008). Pode ser classificada com base na profundidade das lesões como: a- de superfície, acometendo apenas a superfície da epiderme (dermatite piotraumática e dermatite de dobras cutâneas); b- superficiais, envolvendo as camadas mais profundas da epiderme e o epitélio do folículo piloso; e c- profunda, atingindo tecidos mais profundos da derme e frequentemente o subcutâneo (PATERSON, 2008). Nos cães, a piodermite superficial é a forma mais comum de infecção e, também, a principal razão para o uso de antimicrobianos na clínica de pequenos animais (BAJWA, 2016).

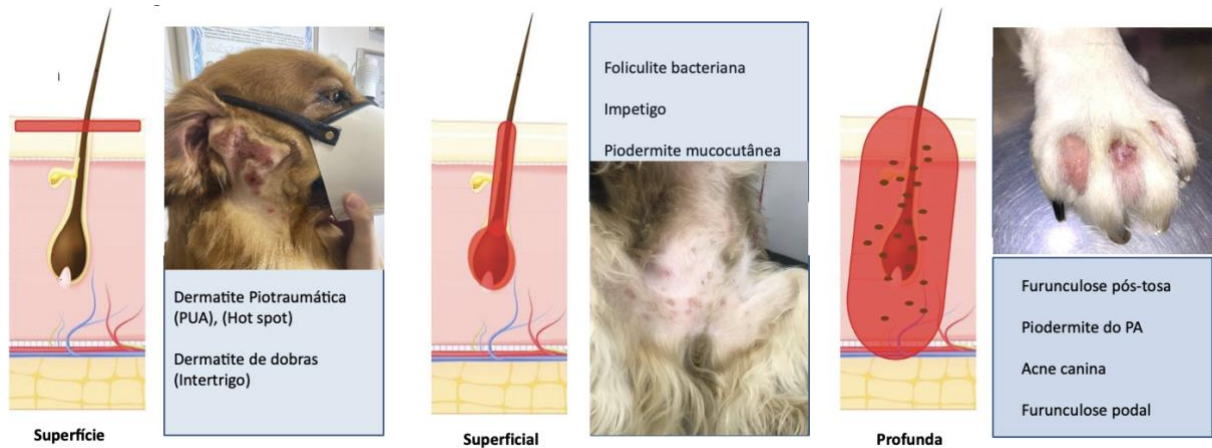


Figura 6. Classificação das piодermites de acordo com a profundidade. Criada pela autora em BioRender.com.

2.3.2 Etiologia

O *S. pseudintermedius* é o microrganismo mais comumente associado a infecções cutâneas, isolado como patógeno predominante em até 92% dos casos de piодermites caninas (GRIFFETH *et al.*, 2008), seguido por *S. intermedius*, *S. delphini*, e *S. schleiferi* (FACCIN *et al.*, 2023). Em raras ocasiões, outras bactérias podem ser isoladas, como *Streptococcus canis*, *Pseudomonas aeruginosa* e outras bactérias gram-negativas (HILLIER *et al.*, 2014). Embora seja evidente que o *S. pseudintermedius* é o patógeno predominante associado a piодermite canina, também é uma espécie comensal comum nos cães (LYNCH; HELBIG, 2021), sendo isolado em animais saudáveis em até 50% deles (MA *et al.*, 2020). Estudos anteriores ao ano 2000 mostravam o *Staphylococcus intermedius* como o microrganismo mais isolado de cães com piодermite superficial (COX *et al.*, 1984). No entanto, estudos mais recentes têm demonstrado que os organismos antes identificados como *S. intermedius* eram, na verdade, *S. pseudintermedius* (BLOOM, 2014; DEVRIESE *et al.*, 2005).

Staphylococcus pseudintermedius, do grego *pseudos* (falso) + *intermedius*, ou seja, um falso *Staphylococcus intermedius*, devido a sua grande similaridade fenotípica com este último (DEVRIESE *et al.*, 2005). Embora essa mudança não altere o manejo clínico da afecção, é importante diferenciar as espécies com maior relevância nas infecções humanas, como *Staphylococcus aureus*, de extrema pertinência para a Saúde Única. Sendo assim, diferentes técnicas, incluindo testes

fenotípicos, características bioquímicas e identificação molecular são necessários para identificar essas espécies adequadamente (SASAKI *et al.*, 2010).

Nos últimos anos, muitos estudos têm sido publicados demonstrando o crescimento de isolados de *S. pseudintermedius* resistentes à meticilina (MRSP), e com multirresistência a drogas (MDR) (HARTANTYO *et al.*, 2018). A meticilina é uma penicilina resistente à penicilinase, enzima bacteriana que inativa as penicilinas naturais e as aminopenicilinas (por exemplo, ampicilina e amoxicilina). As bactérias resistentes a meticilina possuem o gene *mecA*, que codifica uma proteína de ligação à penicilina com baixa afinidade com todos os β -lactâmicos, incluindo as cefalosporinas (MORRIS *et al.*, 2017). Isto posto, não é possível o uso de antibióticos de primeira escolha no tratamento desses casos. Além disso, o MRSP pode ser transferido de cães doentes para saudáveis por meio de transmissão direta ou transmissão ambiental indireta (LAARHOVEN *et al.*, 2011). Estudos avaliam que até 63% dos isolados de *S.pseudintermedius* provenientes de cães apresentando lesões cutâneas são MRSP, variando de 5% na Austrália (WORTHING *et al.*, 2018), 33% na Itália, (VENTRELLA *et al.*, 2017), 39% no Brasil (SANTANA *et al.*, 2023), 40% nos Estados Unidos (LORD *et al.*, 2022), chegando a 63% em Singapura (HARTANTYO *et al.*, 2018).

Esses dados também criaram uma preocupação crescente aos órgãos de saúde mundiais, uma vez que já existem trabalhos atestando o potencial zoonótico do patógeno (BLONDEAU *et al.*, 2023), tendo reflexo direto sobre a Saúde Única. O primeiro caso de *S. pseudintermedius* em humanos foi relatado na Bélgica, de um paciente com endocardite (VAN HOOVELS *et al.*, 2006), e, desde então, muitos estudos já identificaram infecções humanas por *S. pseudintermedius*. Dados do trabalho de Yarbrough *et al.* (2018) demonstraram que o patógeno foi mais frequentemente recuperado de feridas, mas também foi encontrado em amostras respiratórias e em pacientes com septicemia, sendo que a maioria dos pacientes apresentava comorbidades. Outro estudo relatou que a maioria dos casos de infecção por *S. pseudintermedius* eram provenientes de infecções de tecidos moles, mas também foram observadas bacteremia e infecções ósseas (VIAU *et al.*, 2015). Ainda, casos de infecções humanas por *S. pseudintermedius* foram constatados na Espanha (LOZANO *et al.*, 2017) e na Suécia (STARLANDER *et al.*, 2020).

2.3.3 Diagnóstico

O diagnóstico das piодermites deve abranger a observação de sinais clínicos compatíveis, como prurido, alopecia, pústulas ou pápulas foliculares, colarinhos epidérmicos e crostas, em concordância com o exame citológico, com presença de bactérias cocóides junto a um infiltrado inflamatório (BLOOM, 2014). No entanto, em animais imunodeprimidos, seja por doença ou uso de medicações imunossupressoras, as células inflamatórias podem não estar presentes (HILLIER *et al.*, 2014). A cultura bacteriana e o antibiograma devem ser feitos em pacientes com piодermites crônicas e nos casos de uso repetitivo de antibióticos, em razão da maior ocorrência de bactérias multirresistentes nesses casos (BAJWA, 2016).

As diretrizes para o diagnóstico e terapia antimicrobiana da foliculite bacteriana superficial canina elencam outras hipóteses onde a cultura bacteriana e antibiograma devem ser realizados: (a) quando houver redução inferior a 50% das lesões após duas semanas de terapia antimicrobiana sistêmica; (b) surgimento de novas lesões duas semanas ou mais após o início da terapia; (c) presença de lesões mesmo após seis semanas de terapia sistêmica; (d) bactérias intracelulares em forma de bastonete encontradas na citologia; e (e) história prévia de infecção multirresistente no paciente ou em um animal da mesma casa (HILLIER *et al.*, 2014).

As amostras a serem enviadas para cultura e teste de sensibilidade a antibióticos devem ser coletadas de uma pápula ou pústula intacta, mas, caso isso não seja possível, o envio de um colarinho epidérmico ou crosta também pode ser útil (BLOOM, 2014). Métodos de diagnóstico molecular, como PCR e espectrometria de massa proteômica (MALDI-TOF) podem ser usados para identificação precisa das espécies. Esta última é uma alternativa mais econômica, rápida e altamente precisa em relação à PCR, desde que a espécie de interesse esteja em seu banco de dados (MORRIS *et al.*, 2017).

2.3.4 Tratamento

É importante salientar que a medida mais eficaz para prevenir a ocorrência de infecções cutâneas é identificar e controlar a doença de base (BLOOM, 2014). As principais condições associadas aos piодermites são hipersensibilidades, dermatite atópica, ectoparasitas, endocrinopatias, dermatofitoses e anormalidades de cornificação (FACCIN *et al.*, 2023). Um estudo realizado na Alemanha, entre 2008 e 2013, demonstrou que a principal causa de base ligada às infecções cutâneas

superficiais é a dermatite atópica (42%), seguida por reações adversas a alimentos (22%), demodicose (16%), hipotireoidismo (11%) e hiperadrenocorticism (6%) (SECKERDIECK; MUELLER, 2018). A terapia apropriada deve levar em consideração a gravidade das lesões, características do paciente (como pelagem, temperamento e ambiente), comorbidades e a habilidade e possibilidade do tutor em realizar a terapia tópica ou sistêmica, todos os quais podem afetar a aderência ao protocolo médico e, conseqüentemente, a eficácia da terapia (HILLIER *et al.*, 2014).

2.3.4.1 Terapia tópica

A terapia tópica ainda parece ser pouco usada nos consultórios veterinários (MUELLER *et al.*, 2012), seja pela menor aderência dos tutores, uma vez que demanda um pouco mais de tempo em relação à terapia sistêmica, seja pelo desconhecimento da diversidade de substâncias de uso tópico que apresentam resultados tão bons quanto os de uso por via oral ou injetável (MORRIS *et al.*, 2017). Em estudo do Reino Unido sobre práticas no controle das piodermites na saúde primária, 64% dos 683 casos avaliados usaram apenas terapia sistêmica, 27% usaram a terapia sistêmica e tópica ao mesmo tempo, e apenas 4,7% usaram apenas tópicos como tratamento (SUMMERS; HENDRICKS; BRODBELT, 2014).

O tratamento tópico apresenta certas vantagens sobre o sistêmico, como a remoção física de microrganismos patogênicos, debris celulares e substâncias alergênicas, efeitos adversos reduzidos, menor probabilidade do surgimento de bactérias resistentes (LOEFFLER *et al.*, 2008), além de, ao mesmo tempo em que combate diretamente o patógeno, pode ajudar a restaurar a barreira cutânea, atuando em uma das principais causas de base das piodermites (HILLIER *et al.*, 2014).

Com o tratamento tópico, a substância ativa alcança diretamente o local da infecção, evitando os efeitos metabólicos da passagem hepática do fígado e evitando quaisquer efeitos de diluição relacionados à perfusão sanguínea, além de poupar a microbiota intestinal (FROSINI; LOEFFLER, 2020). Estudos também atestam que a aplicação de uma substância sobre o local da infecção atinge uma concentração imensamente superior às maiores concentrações inibitórias mínimas descritas para o *S. pseudintermedius* (FROSINI *et al.*, 2017). A terapia tópica de forma isolada, usando agentes antibacterianos com eficácia anti-estafilocócica comprovada, é a abordagem desejável para lesões de piodermites de superfície e superficiais (BAJWA, 2016). Antissépticos com eficácia contra estafilococos incluem: clorexidina, ácidos acético e bórico, peróxido de benzoíla, ácido salicílico, sulfadiazina de prata e hipoclorito de

sódio (FROSINI; LOEFFLER, 2020). Antimicrobianos, incluindo bacitracina, ácido fusídico e mupirocina, também podem ser usados (HILLIER *et al.*, 2014).

2.3.4.2 Terapia sistêmica

Nas piodermites profundas, generalizadas ou graves, assim como em animais que não aceitam a terapia tópica, o tratamento sistêmico é indicado, sempre baseado em cultura e padrões de susceptibilidade do agente (MORRIS *et al.*, 2017). Os antimicrobianos são divididos de acordo com a sua prioridade de uso, probabilidade de resistência e importância para saúde humana (PAPICH, 2021). Os antibióticos de primeira escolha são aqueles em que o risco de resistência é baixo e podem ser selecionados para terapia empírica, caso não haja dados de susceptibilidade e incluem: cefalexina, amoxicilina com clavulanato de potássio, clindamicina, lincomicina e cefovecina (BECO *et al.*, 2013).

Serão considerados de segunda escolha quando os de primeira escolha não são apropriados para o perfil de resistência do patógeno ou quando o risco de resistência é considerado alto, na falta de cultura e antibiograma. Estão nessa classe a enrofloxacin, marbofloxacin, pradofloxacin e orbifloxacin (HILLIER *et al.*, 2014). Esses antibióticos não devem ser usados de forma empírica, pois possuem um alto índice de resistência (BECO *et al.*, 2013). Os antibióticos de terceira escolha só devem ser prescritos quando nenhuma das opções anteriores seja apropriada e quando houver antibiograma com o perfil de susceptibilidade disponível. Estão nesta categoria aminoglicosídeos, azitromicina, cloranfenicol, claritromicina, rifamicina e imipenem (NUTTALL, 2013). Os antibióticos de terceira escolha são cruciais para a saúde humana, indicados no tratamento de infecções multirresistentes, frequentemente fatais. Portanto, seu uso deve ser restrito a casos excepcionais (PATERSON, 2017)

Tendo em vista que nos últimos 23 anos apenas seis antimicrobianos foram aprovados pelo Centro de Administração de Alimentos e Medicamentos para a Medicina Veterinária dos Estados Unidos (FDA), os altos índices de resistência aos antibióticos já existentes e, ainda a tendência de organizações de saúde mundiais em limitar os antibióticos usados em animais (PAPICH, 2021), é imprescindível o investimento em terapias alternativas de tratamento contra tais infecções.

2.3.4.3 Vacinas

As vacinas estafilocócicas são uma alternativa terapêutica ao controle de piodermites de repetição, aumentando a imunidade do animal a patógenos específicos e com mínimos efeitos colaterais e podem ser desenvolvidas a partir de bactérias vivas atenuadas, inativadas (bacterinas) ou de subunidades da bactéria (STEPHANIE A. LYNCH; HELBIG, 2021). No entanto, não são indicadas como agente isolado. A bacterina, por exemplo, deve ser associada a outro tratamento, seja ele tópico ou sistêmico, nas primeiras semanas de tratamento e seu sucesso avaliado após 18 semanas (GLOS; MUELLER, 2011). Todavia, já foi documentado que o gene de resistência *mecA* não é destruído durante a produção do produto, sendo a dispersão desse gene extremamente indesejável e preocupante (LOEFFLER; SCOTT; FROSINI, 2021). Atualmente, no Brasil, essa opção terapêutica não está disponível.

2.3.4.4 Bacteriófagos

Os bacteriófagos, ou fagos, são vírus hospedeiro-específicos, sendo direcionados apenas a determinadas bactérias, autolimitantes, têm baixa toxicidade e não perturbam a microbiota do hospedeiro, matando o patógeno por lise celular (FUNGO *et al.*, 2023). O fago, por ser altamente específico, é capaz de destruir uma bactéria patogênica mas não trazer qualquer dano à microbiota comensal (GALTIER *et al.*, 2016). Estudos com as bactérias *Listeria monocytogenes* (JAKOBSEN *et al.*, 2022) e *Escherichia coli* (GALTIER *et al.*, 2016) demonstraram que o uso de fagos foi capaz de reduzir os níveis da forma patogênica dessas bactérias sem, no entanto, afetar as não patogênicas ou a diversidade das comensais, o que não acontece durante o uso de antibióticos, onde há uma redução generalizada da população bacteriana (STEPHANIE A. LYNCH; HELBIG, 2021). Embora os ensaios clínicos em humanos pareçam promissores, não há estudo veterinário publicado sobre a administração de fagos em cães com piodermite causada por *S. pseudintermedius* até o momento (LYNCH; HELBIG, 2021b).

2.3.4.5 Peptídeos antimicrobianos

Os peptídeos antimicrobianos (PAMs) existem em todos os reinos vivos e são substâncias expressas por células epiteliais e do sistema imune, que controlam o crescimento dos microrganismos na superfície da pele, sendo reguladas por meio de estímulos externos, como microrganismos e citocinas (HERMAN; HERMAN, 2019).

Os PAMs se apresentam como pequenas moléculas de aminoácidos, de carga elétrica positiva, possuindo regiões hidrofóbicas e hidrofílicas, facilmente se ligando à membrana celular do patógeno (LEI *et al.*, 2019). O mecanismo pelo qual o peptídeo irá atuar sob o patógeno irá depender de sua sequência específica de aminoácidos, carga elétrica, propriedade anfipática e de sua estrutura tridimensional (SEYFI *et al.*, 2020). Poderá atuar diretamente sobre a membrana celular ou sobre estruturas intracelulares, ligando-se a enzimas que participam diretamente do processo de transcrição (ROQUE-BORDA *et al.*, 2021). Uma vez que a forma de ação dos PAMs se relaciona diretamente com a conformação da membrana, a indução à resistência seria muito mais difícil, pois teria que passar por uma mudança na própria formação de membrana celular (MANGONI; MCDERMOTT; ZASLOFF, 2016). As duas principais famílias dessas substâncias em mamíferos são as catelicidinas e as defensinas, de acordo com sua estrutura e características biológicas (LEONARD; AFFOLTER; BEVINS, 2012b). Além de sua atividade antimicrobiana, os PAMs também participam da regulação do sistema imune, angiogênese, cicatrização de feridas e apresentam atividade anti-tumorais (ZHANG *et al.*, 2021).

A maioria das bactérias produzem pelo menos um tipo de PAM com ação bactericida, as bacteriocinas, que agem também em sinergia com os antibióticos, aumentando seus efeitos terapêuticos e diminuindo o surgimento de cepas resistentes (SIVARAJ *et al.*, 2018). Apesar da existência de evidências da eficiência antimicrobiana *in vitro*, as bacteriocinas ainda não foram totalmente integradas à prática clínica pela falta de um número robusto de estudos que atestem sua segurança e de uma forma de administração eficaz que mantenha sua estabilidade. (ARTHUR; CAVERA; CHIKINDAS, 2014).

2.3.4.6 Probióticos

Os probióticos são microrganismos vivos que conferem benefício à saúde do hospedeiro quando administrados em quantidades adequadas (HILL *et al.*, 2014). Essas bactérias podem ajudar na competição com patógenos por nutrientes e na modulação do sistema imune (DELANGHE *et al.*, 2021). Estudos propõem que um dos mecanismos de ação dos probióticos é através da restauração do equilíbrio imunológico entre as respostas Th1 e Th2, aumento da produção de células Treg, IgA e a citocina antiinflamatória IL-10 e diminuição da secreção de citocinas pró-inflamatórias, como IL-4 e IL-6 (HUIDROM, 2021).

Muitos estudos têm demonstrado o potencial dos probióticos contra muitas doenças, como doenças alérgicas, diarreia, doença inflamatória intestinal e infecções (ROBLES ALONSO; GUARNER, 2013). No entanto, a definição de um probiótico não esclarece que tipo de benefícios à saúde ele concede. Além disso, nem todos os probióticos influenciam o sistema imunológico da mesma maneira (FANFARET *et al.*, 2021). Os benefícios dos probióticos são atingidos por vias complementares entre si, seja pela produção de substâncias antimicrobianas, as bacteriocinas, seja pela competição com patógenos pela adesão às células epiteliais e nutrientes, pela inibição de toxinas bacterianas ou pela modulação do sistema imune do hospedeiro (MANZOOR *et al.*, 2022). Bactérias benéficas interagem com o sistema imunológico através das mesmas vias que as bactérias comensais, pela interação com células epiteliais para influenciar as respostas das células dendríticas e T reguladoras, modulando a produção de citocinas, suprimindo assim as respostas inflamatórias sistêmicas.

O efeito do probiótico nas respostas Th e Tregs são específicos de cada espécie, sendo que algumas cepas de *Lactobacillus*, por exemplo, demonstraram estimular a produção de citocinas Th1, enquanto outras aumentam as respostas Th2 (FUCHS-TARLOVSKY; MARQUEZ-BARBA; SRIRAM, 2016). Os probióticos mais estudados são *Lactobacillus*, *Bifidobacterium*, e *Saccharomyces boulardii*, sendo os dois primeiros bactérias e o último uma levedura. (UN-NISA *et al.*, 2022)

Os probióticos são usados no cuidado da pele desde o início do século XX, mas a partir da última década houve um grande aumento no mercado de produtos tópicos (LEE *et al.*, 2019). Estudos em humanos pesquisaram o papel dos probióticos tópicos em várias afecções da pele, como dermatite atópica, seborreia e acne, e as estirpes bacterianas que mais aparecem nos estudos incluem *Streptococcus thermophilus*, *Vitreoscilla filiformis*, *Enterococcus faecalis*, *Lactobacillus plantarum*, *Bifidobacteria infantis* e *Lactobacillus johnsonii* (HABEEBUDDIN *et al.*, 2022). Em estudo clínico prospectivo, duplo-cego, controlado por placebo, indivíduos foram selecionados para receber um creme contendo 5% de lisado da bactéria não patogênica *Vitreoscilla filiformis* ou um creme veículo por 30 dias (GUENICHE, A. *et al.*, 2008). O grupo que recebeu o creme de lisado de *V. filiformis* apresentou uma redução na abundância de *Staphylococcus aureus*. Na mesma linha, o trabalho publicado por Myles (2018) demonstrou a capacidade da bactéria comensal *Roseomonas mucosa* em diminuir a carga de *S. aureus* na pele tratada.

Um trabalho americano (NAKATSUJI *et al.*, 2017) avaliou a capacidade do *S. epidermidis*, comensal da pele humana, em inibir a proliferação de *S. aureus* por meio da aplicação tópica de uma concentração conhecida de 1×10^5 CFU/cm² de bactérias misturada a um veículo creme e aplicada em dose única sobre a pele colonizada por *S. Aureus*. O mesmo estudo demonstrou a diminuição significativa da abundância da bactéria patogênica em comparação ao grupo controle.

2.3.4.6.1 Bactérias ácido-lácticas

As bactérias ácido-lácticas (BAL) fazem parte de um grupo não patogênico de microrganismos, Gram-positivas, catalase-negativas e que não formam esporos, sendo assim denominadas por produzirem ácido láctico resultante da fermentação do açúcar, resultante do seu metabolismo anaeróbico (ANJANA; TIWARI, 2022). São também produtoras de outras substâncias capazes de exercer efeitos antimicrobianos, tais como peróxido de hidrogênio e diacetil, além das bacteriocinas (KHALFALLAH *et al.*, 2021), e metabólitos como ácido γ -aminobutírico (GABA), exopolissacarídeos (EPSs) e ácido linoléico conjugado (CLA) (ABEDIN *et al.*, 2023). São muito utilizadas na indústria farmacêutica e alimentícia por serem consideradas seguras, com grande abrangência nas formas de uso e maneiras de atuação (HE *et al.*, 2018), com muitos estudos demonstrando a atividade antimicrobiana das BAL contra um grande número de patógenos, além de exercer um papel probiótico (SIVARAJ *et al.*, 2018).

O ácido láctico gerado inibe certos microrganismos através da sua entrada através da membrana, interferindo nas funções metabólicas do patógeno, e, ao mesmo tempo, a diminuição do pH intracelular leva à ruptura da membrana (SUSKOVIC, 2010). O peróxido de hidrogênio exerce sua função oxidando os lipídios da membrana plasmática do microrganismo, aumentando sua permeabilidade e levando ao desarranjo e desnaturação de proteínas importantes, causando a morte celular (LAU; LIONG, 2014). O diacetil produzido pelas BAL é capaz de inibir o crescimento de bactérias Gram-negativas e Gram-positivas, tais como *Bacillus cereus*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Salmonella anatum*, *Listeria monocytogenes*, *Yersinia* e *Aeromonas* (TESHOME *et al.*, 2022).

As BAL mais estudadas pertencem ao filo Firmicutes, classe Bacilli, família Lactobacillaceae e gênero *Lactobacillus*, sendo nutricionalmente exigentes e são cultivadas em meio ágar De Man, Rogosa e Sharpe (MRS)(UN-NISA *et al.*, 2022). Os *Lactobacillus* possuem a forma de bacilos curtos ou alongados, dispostos em cadeia

ou isoladamente e são aerotolerantes ou aneróbicos estritos (JARAMILLO, 2014). Pesquisas têm demonstrado que cepas específicas de lactobacilos têm um papel benéfico na defesa contra os processos inflamatórios que afetam a pele, bem como na resistência a infecções (KNACKSTEDT; KNACKSTEDT; GATHERWRIGHT, 2020). Diferentes espécies da família Lactobacillaceae estão diminuídas na pele de pacientes com dermatite atópica, humana e canina, e acne *vulgaris*, por exemplo, e estudos demonstrando sua aplicação tópica como forma de tratamento tem crescido, mas ainda há muito espaço a ser explorado (DELANGHE *et al.*, 2021).

Recentemente, foi mostrado que o *Lactobacillus reuteri* exerce um efeito anti-inflamatório sobre os queratinócitos infectados, reduzindo a transcrição de interleucinas inflamatórias (WIDYARMAN *et al.*, 2018); enquanto o *Lactobacillus plantarum* inibe o fator de necrose tumoral (JEON, 2016). Além disso, o *Lactobacillus reuteri* protege os queratinócitos da morte celular induzida por *S. Aureus* por exclusão competitiva do patógeno de seus locais de ligação nas células (PRINCE, 2012). O efeito de uma loção contendo a cepa probiótica de *Lactobacillus johnsonii* NCC 533 foi investigado em trabalho de Blanchet (2017). Os resultados demonstraram que a aplicação da loção por três semanas controlou a colonização por *S. aureus* e foi associada à melhora clínica. Quando aplicado sobre queratinócitos, os lactobacilos demonstram uma alta aderência através do pilus bacteriano, o que pode aumentar o seu tempo de atuação na pele (DELANGHE *et al.*, 2021). A aplicação tópica de lactobacilos também está associada à melhora da função de barreira da pele, que é fundamental para prevenir e tratar condições associadas à quebra da barreira cutânea (SUN *et al.*, 2015).

2.3.4.6.1.1 *Lactobacillus casei*

O grupo dos *Lactobacillus casei* (GLC) é composto por espécies com características fenotípicas e filogenéticas muito similares, o *L. casei*, *L. paracasei*, e *L. rhamnosus* (TOH *et al.*, 2013), sendo necessário testes moleculares que determinem corretamente de qual espécie se trata para estudo da evolução, filogenética e de substâncias produzidas por cada um (SUN *et al.*, 2015). Com o surgimento do MALDI-TOF MS foi possível identificar essas espécies de forma mais eficiente e rápida (HILL *et al.*, 2018). O *Lactobacillus casei* faz parte da microbiota natural humana e animal, estando presente no trato gastrointestinal, boca e pele (KANG *et al.*, 2017). Os benefícios desse microrganismo estão bem documentados quando usado por via oral, principalmente na ativação do sistema imunológico da mucosa

intestinal e efeitos antimicrobianos no trato gastrointestinal, no tratamento da diabetes, artrite reumatoide, e na constipação crônica em humanos (KANG *et al.*, 2017).

Estudos demonstraram que a estrutura com pilus do *L. casei* é mais facilmente aderida à mucosa intestinal, reduz a expressão de interleucinas (IL) pró-inflamatórias, como a IL-6, e previnem a ativação mastocitária (QIN *et al.*, 2022). Partindo do pressuposto que a pele e o intestino possuem características comuns, tais como microbiotas taxonomicamente diversas, atuam como uma barreira entre os ambientes interno e externo, e como meio de imunomodulação, investigações sugerem que os probióticos podem também ser valiosos como tratamentos quando aplicados diretamente sobre a pele (SULTANA; MCBAIN; O'NEILL, 2013).

Segundo Karska (2010), o *Lactobacillus casei* LBC80R é capaz de inibir o crescimento do *S. aureus* resistente à meticilina em meio de cultura líquido. Um estudo francês testou a habilidade do *L. casei* em prevenir a invasão do *S. aureus* em células epiteliais mamárias, provando que o lactobacilo pode inibir a adesão e internalização do patógeno, tornando o probiótico um aliado na prevenção e tratamento das mastites (BOUCHARD *et al.*, 2013). A atividade do *Lactobacillus casei* NA-2 foi acessada por Xu *et al.* (2020) e os resultados sugerem que o mesmo não só foi capaz de inibir o crescimento do *S. aureus* como também inibiu a formação de biofilme através da produção de exopolissacarídeos (EPS), o que pode aumentar a suscetibilidade do patógeno a antimicrobianos.

Biossurfactantes são compostos que possuem uma parte hidrofílica e outra hidrofóbica (anfifílicos) e exibem propriedades antimicrobianas e anti-adesivas (SAMBANTHAMOORTHY *et al.*, 2014). Biossurfactantes isolados do *Lactobacillus casei* exerceram um efeito antioxidante, antiproliferativo e inibidor da formação de biofilme quando desafiados pelo *S. aureus* (MERGHNI *et al.*, 2017). Estudos avaliando a produção de peptídeos antimicrobianos pelo *L. casei* HZ1 caracterizaram dois novos PAMs, LGH1 (He *et al.*, 2018). e LGH2 (He *et al.*, 2020), capazes de induzir danos à membrana plasmática do *S. aureus*, destruindo-o. No entanto, não há experimentos publicados relatando o uso desta BAL contra o patógeno mais prevalente nas piодermites caninas, o *S. pseudintermedius*.

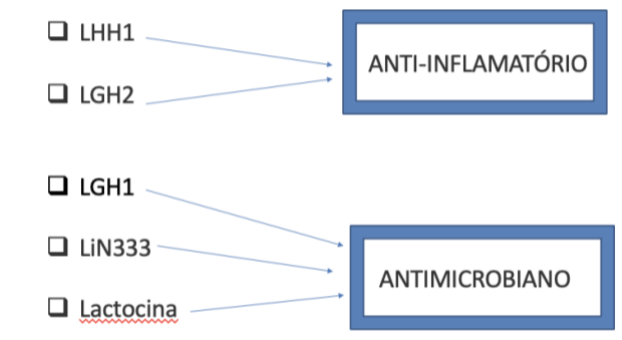


Figura 7. Bacteriocinas produzidas pelo *L.casei*. Criado pela autora em BioRender.com.

3 OBJETIVOS

3.1. Geral

Avaliar o potencial antimicrobiano *in vitro* de *Lactobacillus casei*, sobre isolados clínicos de *S. pseudintermedius*.

3.2. Específicos

Isolar bactéria ácido-láctica do microbioma cutâneo comensal de cães saudáveis;

Determinar a segurança do uso de bactérias ácido lácticas;

Avaliar a inibição de *Lactobacillus casei*, sobre isolados clínicos de *S. pseudintermedius*.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Origem e coleta das amostras

Os isolados de *Staphylococcus pseudintermedius* foram colhidos pela médica veterinária Mariana de Araújo Carvalho, segundo aprovação da CEUA nº 0149/2018, totalizando 115 amostras, as quais foram coletadas entre setembro de 2018 e janeiro de 2020 no Hospital Veterinário da FMVZ-UNESP, Botucatu/São Paulo. São provenientes de cães com piodermite superficial ou profunda, apresentando ou não doença concomitante, sem predileção por raça, sexo ou idade.

O material foi colhido após o rompimento de pústulas íntegras com auxílio de uma agulha estéril (25 x 5,5mm) sem desinfecção prévia. Após o rompimento, o conteúdo purulento foi imediatamente recolhido com o auxílio de haste de algodão estéril e acondicionado em meio Stuart (Oxoid®). Após serem cultivadas em meio

Ligni eres para caracteriza o, as amostras foram transferidas para microtubos de 1,5 mL contendo meio BHI (Oxoid®) e glicerol aquecido a 30%, e colocadas em freezer de armazenamento a -80°C até reutiliza o. Do total de amostras, 30 foram utilizadas no presente projeto, sendo uma delas portadora do gene *mecA* de resistência. Uma cepa *S. pseudintermedius* ATCC (American Type Culture Collection) de origem comercial foi utilizada como controle.

O isolado de *Lactobacillus casei* foi obtido de amostras cutâneas coletadas por meio de haste de algodão estéril, levemente friccionada sobre a pele de cães saudáveis e acondicionado em meio Stuart (Oxoid®) até seu processamento. Os animais utilizados não apresentavam doença dermatológica concomitante, e foram selecionados independentes da predile o por raça, sexo ou idade. Foram eleitos três locais para realiza o da coleta: axila, face côncava de pavilhão auricular e região toracodorsal. O consentimento dos tutores foi firmado por meio de termo de assinado.

4.2. Identifica o das amostras de *S. pseudintermedius*

As bactérias utilizadas neste estudo tiveram sua identifica o confirmadas com base na técnica de MALDI-TOF MS, realizada pelo Laboratório de Pesquisa em Qualidade do Leite do Departamento de Nutri o e Produ o Animal da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, Pirassununga/SP. Todas as amostras de *S. pseudintermedius* tiveram seus perfis de sensibilidade a fármacos determinados por meio da técnica de difusão em disco, avaliando-se o tamanho do halo de inibi o. Foram avaliados diferentes antibióticos para cada isolado, descritos na tabela 1. A técnica de PCR foi empregada para detectar o gene *mecA*, usando o par de primers *mecA1* e *mecA2*, seguindo o protocolo descrito por Murakami *et al.* (1991).

Tabela 1. Perfil de susceptibilidade dos isolados de *S. pseudintermedius*.

Isolado	Antibi�tico																		
	#	Ami	Amo	Amp	Azi	Cfv	Cfu	Cfx	Cip	Cli	Clo	Dox	Enr	Eri	Gnt	Lev	Neo	Oxa	Pen
#3	s	s	r	s	s	s	s	s	s	s	s	r	s	s	s	s	s	s	s
#4	s	s	s	s	s	s	s	s	s	s	s	s	s	s	s	s	s	s	s
#6	s	s	r	s	s	s	s	s	s	s	s	s	s	s	s	s	s	s	r
#8	s	s	r	s	s	s	s	s	s	s	s	s	s	ps	s	s	s	s	s

Isolado	Antibiótico																		
	#	Ami	Amo	Amp	Azi	Cfv	Cfu	Cfx	Cip	Cli	Clo	Dox	Enr	Eri	Gnt	Lev	Neo	Oxa	Pen
#10	s	s	r	s	s	s	s	r	s	s	r	r	s	s	r	ps	s	r	
#11	s	s	s	s	s	s	s	s	s	s	s	s	ps	s	s	ps	s	s	
#13	s	s	r	r	s	s	s	r	r	r	r	r	r	s	r	r	s	r	
#17	s	s	r	s	s	s	s	s	s	s	r	s	s	s	s	s	s	s	
#18	s	s	r	s	s	s	s	s	s	s	r	s	s	s	s	s	s	r	
#20	s	s	r	ps	s	s	s	s	r	s	s	s	r	s	s	r	s	s	
#21	s	s	r	s	s	s	s	s	s	s	r	s	s	s	s	s	s	s	
#23	s	s	r	s	s	r	ps	s	r	s	s	s	r	s	s	s	s	s	
#24	s	s	s	s	s	s	s	s	s	s	s	s	s	s	s	s	s	s	
#25	s	s	r	s	s	ps	s	s	s	s	s	s	s	s	s	s	s	r	
#27	s	s	r	s	s	s	s	s	s	s	s	ps	s	s	s	s	s	r	
#29	s	s	r	s	s	s	s	s	s	s	s	s	s	s	s	s	s	s	
#30	s	s	s	s	s	s	s	s	s	s	s	s	s	s	s	s	s	s	
#31	s	s	s	s	s	s	s	s	s	s	r	s	s	s	s	s	s	s	
#33	s	s	s	s	s	s	s	s	s	s	s	s	s	s	s	s	s	s	
#34	s	s	s	s	s	s	s	s	s	s	s	s	s	s	s	s	s	s	
#35	s	s	r	s	s	s	s	s	s	s	s	s	s	s	s	s	s	s	
#38	s	s	r	s	s	s	s	s	s	s	r	s	s	s	s	s	s	r	
#41	s	s	s	s	s	s	s	s	s	s	s	s	s	s	s	s	s	s	
#48	s	s	s	s	s	s	s	s	s	s	ps	s	s	s	s	s	s	s	
#49	s	s	s	s	s	s	s	s	s	s	s	s	s	s	s	s	s	s	
#50	s	s	s	s	s	s	s	s	s	s	s	s	s	s	s	s	s	s	
#51	s	s	r	s	s	s	s	s	s	s	s	s	s	s	s	s	s	r	
#55	s	s	r	s	s	s	s	s	s	s	r	s	s	s	s	s	s	s	

Isolado	Antibiótico																		
	#	Ami	Amo	Amp	Azi	Cfv	Cfu	Cfx	Cip	Cli	Clo	Dox	Enr	Eri	Gnt	Lev	Neo	Oxa	Pen
#57	s	s	s	s	s	s	s	s	s	s	s	s	ps	s	s	s	s	s	s
#58	s	r	r	r	r	r	r	r	r	r	r	r	r	r	r	r	r	r	r

#: isolado; r: resistente; s: sensível; ps: parcialmente sensível
 Ami: amicacina; Amo: amoxicilina + ácido clavulânico; Amp: ampicilina; Azi: azitromicina; Cfv: cefovecina; Cfu: Cefotur; Cfx: ceftriaxona; Cip: ciprofloxacino; Cli: clindamicina; Clo: Cloranfenicol; Dox: doxiciclina; Enr: enrofloxacina; Eri: eritromicina; Gnt: gentamicina; Lev: levofloxacino; Neo: neomicina; Oxa: oxacilina; Pen: penicilina

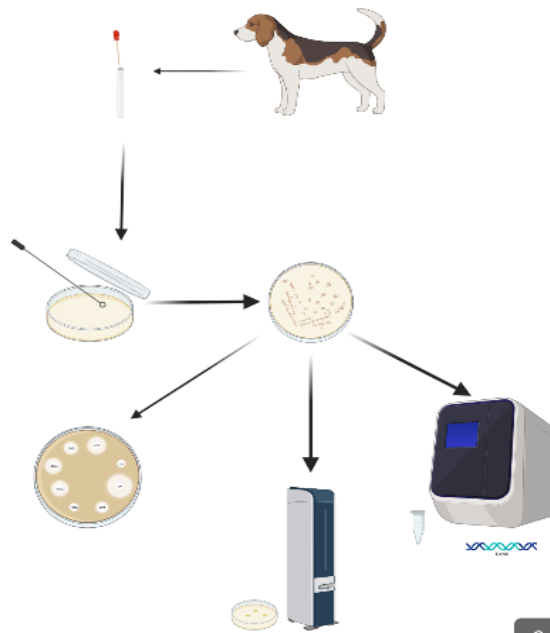


Figura 8. Ilustração do processo de coleta e identificação de amostras de *S. pseudintermedius*. Criado pela autora em BioRender.com.

4.3. Identificação do *Lactobacillus casei*

As hastes de algodão contendo o material biológico coletado foram emergidas por alguns segundos em tubos (Falcon®) contendo 10 mL de caldo MRS (Kasvi®) estéreis e incubados a 37°C por 24 horas. Após a incubação o caldo MRS foi semeado em ágar MRS (Kasvi®), e incubado nas mesmas condições. As culturas com colônias de cor creme e com bordas lisas, compatíveis fenotipicamente com lactobacilos, foram separadas e realizada a coloração de Gram segundo Tripathi (2023).

Os isolados de bactérias Gram-positivas e de forma bacilar avaliadas no exame microscópico foram selecionados, inoculados em caldo MRS e incubados por 24 horas. No dia seguinte, 1 mL do caldo foi transferido a um tubo (Eppendorf) de 1,5 mL junto

a 0,3 mL de glicerol líquido, homogeneizado e armazenados a -80 °C até a sua reutilização. Antes de cada análise, os isolados foram ativados em caldo MRS. A amostra contendo colônias de bacilos Gram-positivos teve sua espécie confirmada com base na técnica MALDI-TOF MS.

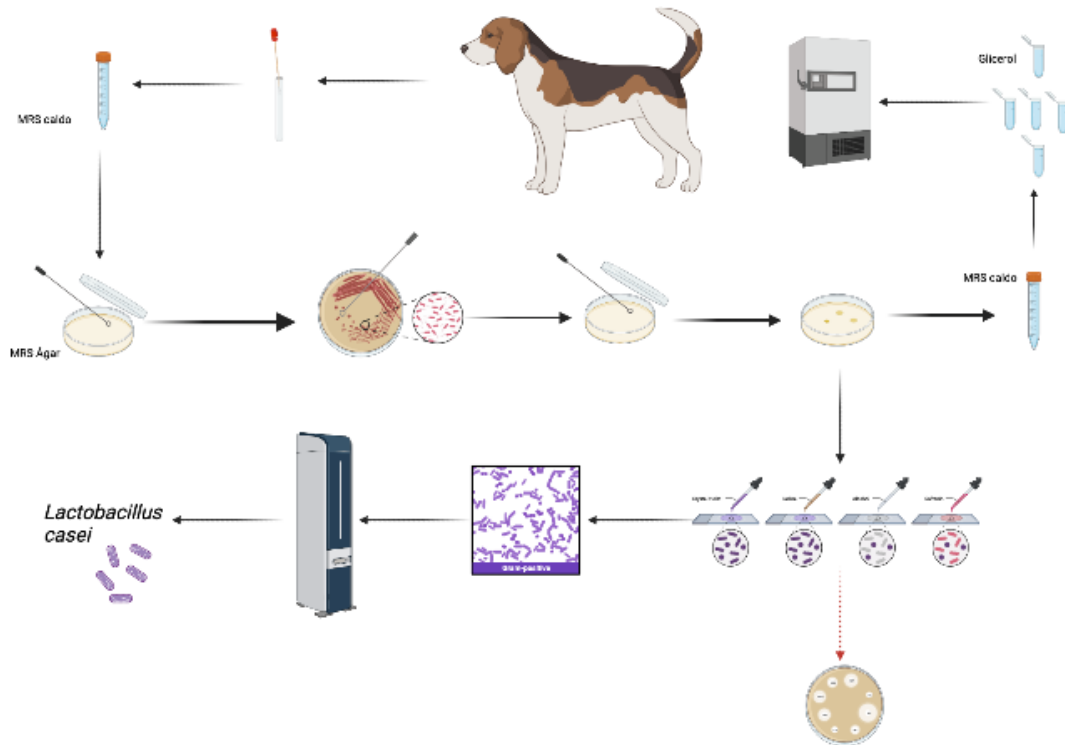


Figura 9. Ilustração do processo de coleta e identificação de amostras de *L. casei*. Criado pela autora em BioRender..com.

4.4 Contagem de Unidades Formadoras de colônias

Para a obtenção do número real de colônias presentes, uma placa com 66 colônias na diluição de 10^{-6} foi utilizada. A conta foi feita da seguinte forma: UFC= 66 (colônias na placa) $\times 10^6 / 10^{-1}$, totalizando 66×10^7 , ou $6,6 \times 10^8$ UFC/mL.

4.5 Determinação de segurança e caracterização probiótica

A concentração da amostra de *Lactobacillus casei* aplicada no spot foi avaliada mediante cultivo em caldo MRS a 37°C e posterior contagem em ágar MRS. A alíquota de 0,1 mL do caldo inoculado foi adicionada a um tubo (Eppendorf®) de 1,5mL e diluída em 0,9 mL de solução tampão *phosphate-bufferid saline* (PBS), obtendo-se a primeira diluição (10^{-1}), da qual foram feitas mais oito diluições seriadas. De todas as diluições foi retirado 0,1 mL, semeado em placas de Petri (90mmx15mm) contendo ágar MRS,

homogeneizado com alça de Drigalski de vidro e levado à estufa, por 24 horas a 37°C. Em seguida, foi realizada a contagem de unidades formadoras de colônias (UFC) na placa onde havia de 20 a 200 colônias. O cálculo de UFC foi realizado através da fórmula: UFC= Número de colônias na placa X fator de diluição/ volume do inóculo.

A fim de determinar a suscetibilidade a antimicrobianos do isolado de *L. casei* foi realizado um ensaio usando o método de difusão em disco, com adaptação do método de Kirby Bauer (BAUER et al., 1966). Discos padronizados com os seguintes antibióticos foram utilizados: amoxicilina com clavulanato, doxiciclina, azitromicina, penicilina, enrofloxacina, ciprofloxacina, oxacilina, ampicilina, amicacina, eritromicina e cloranfenicol. Resumidamente, com o auxílio de uma alça bacteriológica foram colhidas algumas colônias de *L. casei* cultivadas em ágar MRS, anteriormente incubadas a 37°C por 48h, e suspendidas em solução salina estéril, a fim de se obter uma turvação correspondente a 0,5 da escala de McFarland.

Após a homogeneização do inóculo, um swab estéril foi introduzido no tubo e, em seguida, a inoculação foi feita em forma de estrias na superfície de uma placa de Petri com ágar Mueller Hinton. Após a secagem das placas, os discos de antibióticos foram aplicados com auxílio de uma pinça estéril e levados à estufa por 48 horas. O diâmetro das zonas de inibição foi medido com auxílio de uma régua, para se determinar se a bactéria em análise foi sensível (S), moderadamente sensível (MS) ou resistente (R) aos antimicrobianos já citados, quando comparado com uma tabela padrão de antibiograma (CHARTERIS et al., 1998).

A avaliação da atividade antimicrobiana foi realizada pelo método de *Spot on the Lawn*, ou difusão em ágar, que consiste em semear as amostras de *Lactobacillus* em 5mL de caldo MRS a 37°C por 24 horas e, em seguida, adicionar delicadamente 10uL do mesmo em forma de quatro pequenos pontos em placas de Petri contendo 15mL de ágar MRS. Após estarem completamente secas, as placas foram incubadas por 24 horas a 37°C. Cada uma das 30 amostras de *S. pseudintermedius* foi semeada em caldo BHI e incubada a 37°C por 24 horas no mesmo dia, e no dia seguinte foi transferida para novos tubos contendo caldo BHI e adicionado 0,9% de ágar-ágar (BHA) a cada tubo. Ainda em estado líquido o meio contendo o inóculo foi vertido lentamente sobre as placas de ágar MRS com os spots das bactérias ácido-lácticas. Após a completa solidificação, as placas foram novamente incubadas a 37°C por 24 horas. Após esse período foi mensurado o tamanho do halo de inibição formado a partir da borda da colônia dos *Lactobacillus*. Cada teste foi repetido oito vezes com cada isolado.

Como controle negativo, foram feitos spots contendo apenas o meio de cultura MRS sobre cada um dos isolados de *S. pseudintermedius* e incubados a 37°C por 24 horas. Como controle positivo, o spot foi feito com discos de antibiograma padronizados com 6,35 mm de diâmetro, contendo 30Mcg de amoxicilina com ácido clavulânico, sobre cada cultura de *S. pseudintermedius*.

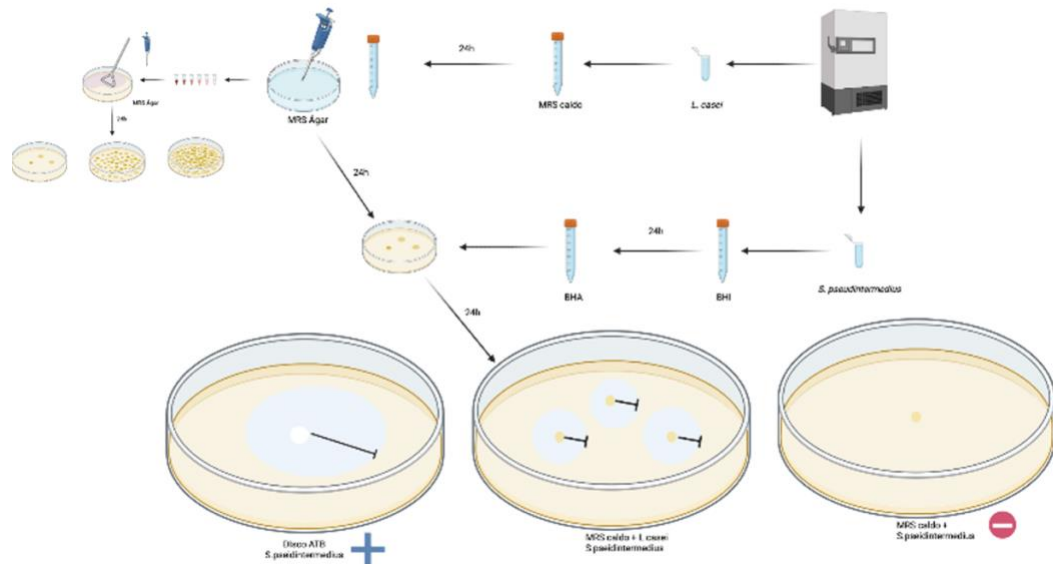


Figura 10. Ilustração do processo de caracterização probiótica. Criado pela autora em BioRender.com.

4.6 Análise estatística

Os dados obtidos com resultados quantitativos foram expressos como média \pm desvio padrão. As comparações estatísticas foram realizadas usando regressão linear e um teste ANOVA, seguidas pelo teste de Comparação Múltipla de Tukey. Uma diferença significativa é marcada como $p \leq 0,05$.

5 RESULTADOS

5.1 Identificação do *Lactobacillus*

Das amostras coletadas e cultivadas, apenas uma, proveniente da face côncava de pavilhão auditivo, apresentou crescimento com características de bactéria ácido-láctica (Figura 1). Foi realizada a coloração de Gram em uma amostra deste isolado e em seguida feita a avaliação microscópica. As bactérias avaliadas se mostraram Gram-positivas e de morfologia bacilar (Figura 2). A identificação bacteriana foi feita por MALDI-TOF MS, sendo reconhecida como *Lactobacillus casei*.

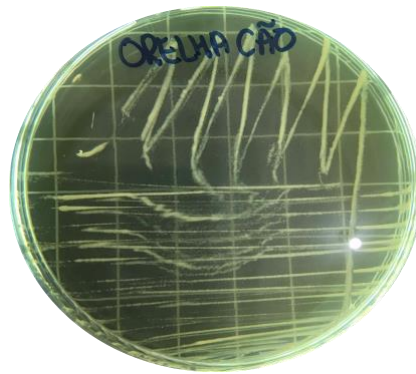


Figura 11. Cultura de amostra proveniente de pavilhão auricular, apresentando colônias de cor creme e com bordas lisas, compatível com bactéria ácido láctica.

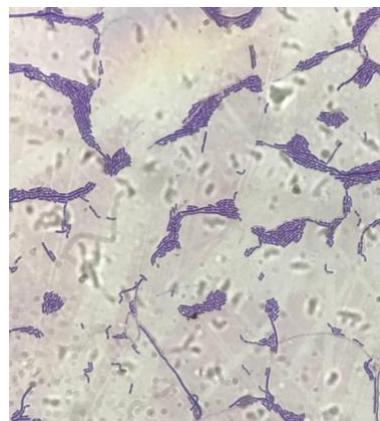


Figura 12. Microscopia de isolado de bactérias Gram-positivas, de forma bacilar e dispostas em cadeia.

5.2 Avaliação antimicrobiana

O tamanho do halo de inibição (Figura 3) formado a partir da borda da colônia dos *Lactobacillus* e os valores são apresentados na Tabela 2.

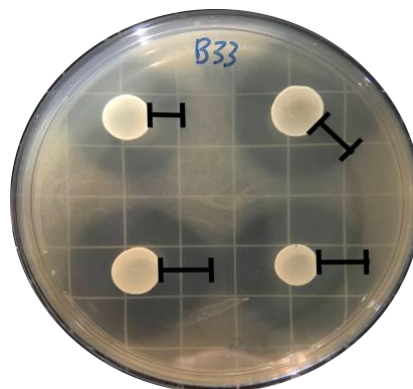


Figura 13. Atividade inibitória de *Lactobacillus casei* em isolado #33 demonstrada pela presença de halo sem crescimento de *S. pseudintermedius*.

Tabela 2. Valores do tamanho dos halos de inibição formados a partir da borda da colônia dos *Lactobacillus* sobre cada isolado de *S. pseudintermedius*.

Isolado	M1	M2	M3	M4	M5	M6	M7	M8	MD	CP	CN
#3	10	11	11	11	11	10	8	8	10	31	0
#4	11	13	13	10	15	13	14	15	13	22	0
#6	11	11	9	9	10	11	11	13	11	30	0,4
#8	12	18	12	19	19	20	17	13	16	31	0
#10	10	9	9	15	10	9	12	9	10	25	0
#11	12	10	12	16	12	11	9	9	11	35	0
#13	10	11	13	9	13	10	12	15	12	30	0
#17	9	9	13	10	9	11	9	13	10	31	0
#18	10	11	9	9	8	9	12	12	10	27	0
#20	9	8	9	15	9	8	12	10	10	24	0
#21	9	8	10	12	10	9	12	14	10	26	0
#23	13	11	9	11	9	15	11	11	11	21	0
#24	9	9	8	7	10	8	8	6	8	31	0
#25	11	11	10	14	11	14	13	11	12	31	0
#27	15	15	15	15	18	14	13	13	15	35	0
#29	9	10	11	12	10	11	11	13	11	31	0
#30	11	10	10	9	8	9	10	11	10	37	0
#31	13	13	9	9	14	19	10	16	13	31	0
#33	10	8	9	9	12	11	10	11	10	34	0
#34	10	11	12	12	14	14	14	17	13	21	0
#35	10	11	10	14	13	10	11	9	11	31	0
#38	11	9	7	14	18	19	19	13	14	31	0
#41	12	9	12	11	11	12	13	14	12	31	0
#48	11	11	10	11	13	13	15	15	12	34	0
#49	12	12	14	16	9	15	13	12	13	35	0
#50	12	12	13	14	15	14	15	13	13	35	0
#51	12	14	16	15	15	15	11	13	14	33	0
#55	11	9	6	9	11	12	11	10	10	30	0
#57	12	11	11	11	7	7	9	11	10	35	0
#58**	6	6	6	7	6	5	0	0	6	0	0
ATCC	9	11	9	11	9	10	9	10	9,5	20	0
MD									11,3	31	0

*Valor em milímetros; **MRSP; ATCC: American Type Culture Collection; M: medida; MD: média; CP: controle positivo; CN: controle negativo

Usando os dados da Tabela 2, calculou-se a média e o desvio padrão das 8 repetições feitas para cada isolado de *S. pseudintermedius*, e os resultados são apresentados na Fig. 14, onde fica demonstrado que são compatíveis entre si. Apenas a amostra #8 apresenta uma resposta maior, e a #58 apresenta maior resistência.

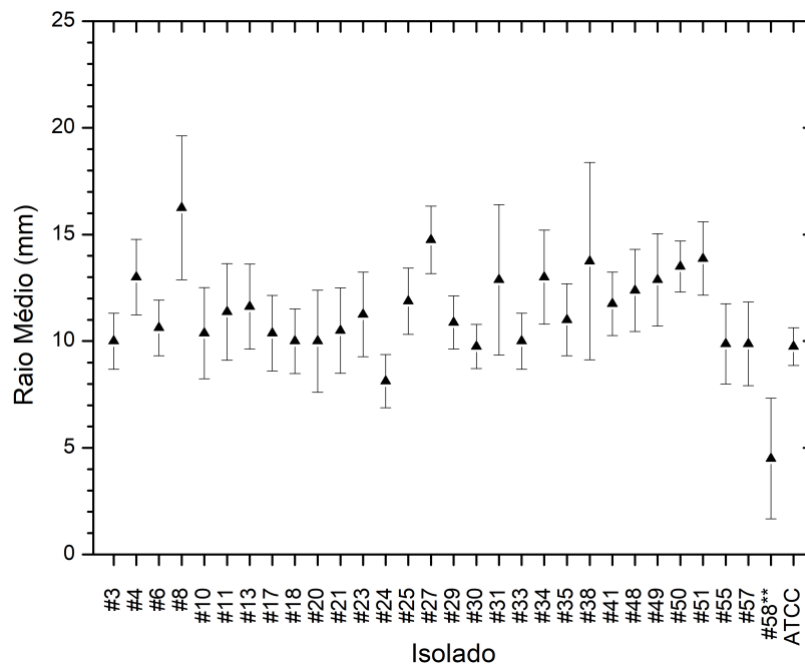


Figura 14. Raio médio dos halos de inibição para cada isolado de *S. pseudintermedius*.

Para verificar se a resposta das amostras é consistente com a resposta para o controle positivo (CP), foi feita uma regressão linear (Fig. 15); o coeficiente angular obtido foi de $0,10 \pm 0,05$, e um teste de ANOVA apresentou $p=0,05$, indicando que dentro de um intervalo de confiança de 95% a resposta obtida para as amostras é diretamente proporcional à resposta obtida para o controle positivo.

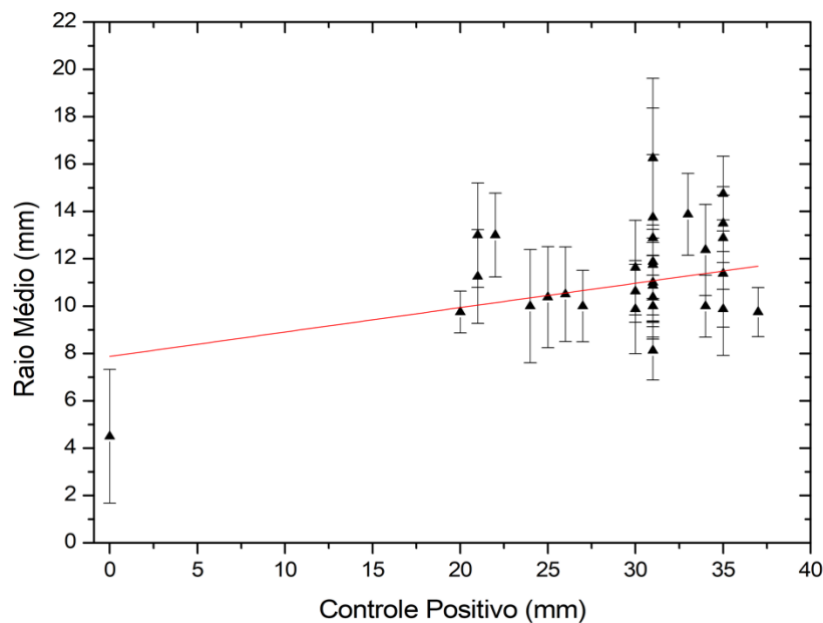


Figura 15. Raio médio do halo de inibição obtido em cada isolado, empregando-se *Lactobacillus* em função do raio médio obtido para o controle positivo no mesmo isolado.

Também foi feito um teste de ANOVA com teste de Tukey para verificar a similaridade das respostas, cujos resultados são apresentados na Tabela X, onde um valor 0 (verde) significa que as respostas são compatíveis num nível de significância de 95%, enquanto um valor 1 (vermelho) significa que as amostras não são compatíveis, no mesmo nível de significância.

Tabela 3. Resultado do teste de Tukey entre os pares de amostras; um valor 0 (verde) significa que as respostas das amostras são compatíveis entre si num nível de significância de 95%, enquanto um valor 1 (vermelho) significa que as respostas das amostras não são compatíveis entre si, no mesmo nível de significância; “SOMA” indica o número de amostras com as quais cada amostra se mostrou incompatível

Isolado	#3	#4	#6	#8	#10	#11	#13	#17	#18	#20	#21	#23	#24	#25	#27	#29	#30	#31	#33	#34	#35	#38	#41	#48	#49	#50	#51	#55	#57	#58**	ATCC		
#3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0	1	0		
#4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	
#6	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	
#8	0	0	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	0	1	0	1	0	1	1	0	0	0	1	1	1	1	1	
#10	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0	
#11	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	
#13	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	
#17	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0	
#18	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0	1	0	
#20	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0	1	0	
#21	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	
#23	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	
#24	0	1	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	1	0	1	0	1	0	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0
#25	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	
#27	1	1	0	0	1	0	0	1	1	1	1	1	1	1	0	0	1	1	0	1	0	1	0	1	0	0	0	0	1	1	1	1	
#29	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	
#30	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	1	0	0	1	0	
#31	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	
#33	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0	1	0	
#34	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	
#35	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	
#38	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	
#41	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	
#48	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	
#49	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	
#50	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1
#51	1	0	0	0	1	0	0	0	1	1	1	0	0	0	1	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1
#55	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	1	0	0	1	0	
#57	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	1	0	0	1	0	
#58**	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
ATCC	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	1	0	0	1	0	
SOMA	4	3	2	21	4	2	3	4	5	5	3	3	13	3	17	3	6	2	5	2	3	10	3	3	3	2	6	12	6	6	29	6	

A média total de inibição de todos os isolados foi de 11,3 mm, com desvio padrão de 2,0 (s²). As zonas de inibição formadas pelo controle positivo com discos de antibiótico variaram entre 0mm (MRSP) e 37 mm no isolado #30 (MSSP), com média de 31 mm. Dos controles negativos, apenas um deles apresentou pequena inibição na cultura contendo o isolado #6.

5.3 Susceptibilidade a antimicrobianos

O tamanho do diâmetro dos halos formados pelos discos (Figura 4) e seu perfil de susceptibilidade são descritos nas Tabelas 3 e 4. O isolado se apresentou sensível a todos os antimicrobianos testados.

Tabela 4. Diâmetro de inibição dos antimicrobianos sobre o isolado de *L.casei*.

Antimicrobiano	Diâmetro de inibição (mm)
Amicacina	35
Amoxicilina + Ácido clavulânico	20
Ampicilina	30
Azitromicina	30
Ciprofloxacino	27
Cloranfenicol	29
Doxiciclina	37
Enrofloxacina	28
Eritromicina	33
Oxacilina	20
Penicilina	35

Tabela 5. Perfil de susceptibilidade de *L. casei*.

Antimicrobiano	Amo	Oxa	Dox	Amp	Azi	Enr	Cip	Ami	Pen	Eri
Susceptibilidade	s	s	s	s	s	s	s	s	s	s

s: sensível; Ami: amicacina; Amo: amoxicilina + ácido clavulânico; Amp: ampicilina; Azi: azitromicina; Cip: ciprofloxacino; Clo: Cloranfenicol; Dox: doxiciclina; Enr: enrofloxacina; Eri: eritromicina; Oxa: oxacilina; Pen: penicilina.

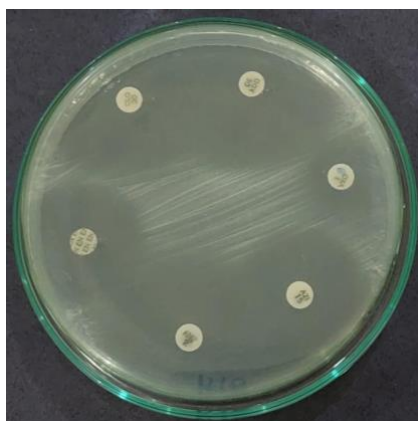


Figura 16. Atividade inibitória dos antimicrobianos demonstrada pela presença de halo sem crescimento de *L. casei*.

6 DISCUSSÃO

O objetivo do presente trabalho foi avaliar a ação antimicrobiana do *Lactobacillus casei* comensal da pele de cães saudáveis como forma de possível tratamento de piodermites causadas por *S. pseudintermedius*. Ao testar 30 isolados clínicos de *S. pseudintermedius*, utilizando o método de difusão em ágar, houve resultados promissores. O *Lactobacillus casei* foi capaz de formar zonas de inibição em todos os isolados testados, o que indica uma ação antimicrobiana efetiva contra *S. pseudintermedius*. Este resultado corrobora com achados de estudos semelhantes,

testando a atividade antimicrobiana de cepas de *L. casei* sobre culturas de *S. aureus* (KARSKA-WYSOCKI; BAZO; SMORAGIEWICZ, 2010; XU *et al.*, 2020).

A atividade do *Lactobacillus casei* sobre patógenos pode ocorrer por diferentes formas, seja por competição por nutrientes, seja pela produção de ácido láctico, biossurfactantes (SAMBANTHAMOORTHY *et al.*, 2014), peptídeos antimicrobianos (He *et al.*, 2018) peróxido de hidrogênio, diacetil, além de metabólitos como ácido γ -aminobutírico (GABA), exopolissacarídeos (EPSs), ácido linoléico conjugado (CLA) (ABEDIN *et al.*, 2023). No entanto, o exato mecanismo pelo qual a inibição do patógeno foi alcançada vai além do escopo deste estudo.

A medida dos halos inibitórios formados pelo *L. casei* sobre os isolados de *S. pseudintermedius* apresentou uma correlação positiva com os halos produzidos pelos discos da amoxicilina potencializada com ácido clavulânico, de maneira que quando a primeira aumenta, a última também aumenta. Desta forma, o conhecimento de uma dessas medidas poderá gerar uma previsão da medida da outra.

Comparando o tamanho dos halos de inibição do *L. casei* com os dos discos de antibiótico, constatamos que a média das zonas de inibição formadas pelos discos foi maior que a média das zonas de inibição formadas pelos *Lactobacillus*. Essa diferença pode ser atribuída à falta de padronização sobre a concentração ideal do *Lactobacillus casei* para garantir resultados precisos e comparáveis com os dos antibióticos. Uma concentração baixa pode resultar em uma atividade insuficiente para produzir um halo detectável, enquanto uma concentração muito alta pode levar à formação de um halo maior do que o esperado.

Portanto, a falta de estudos que estabeleçam a concentração adequada do *Lactobacillus casei* para realização da técnica pode ter influenciado os resultados obtidos. Além disso, é importante considerar que o mecanismo de ação do *Lactobacillus casei* pode ser diferente dos antibióticos convencionais, o que também pode contribuir para as diferenças observadas.

Através do teste ANOVA e teste de Tukey, foi possível inferir que a maior parte das zonas de inibição formadas pelo *L. casei*, agrupadas duas a duas, eram estatisticamente iguais, sendo compatíveis entre si, ou seja, têm a mesma resposta à presença dos *Lactobacillus casei*.

Ao analisar o comportamento apresentado na Tabela 3, fica claro que o isolado de *S. pseudintermedius* #58, como esperado, é muito mais resistente a ação do *L. casei* que as demais, o que pode estar relacionado ao seu perfil de susceptibilidade a antimicrobianos, sendo resistente a todos os antibióticos testados, com exceção da

Amicacina. Da mesma forma, as amostras #8 e #27, com um perfil mais sensível aos antibióticos testados, se mostraram consideravelmente mais susceptíveis à presença dos *L. casei*. Assim é possível inferir que quanto mais resistente aos antibióticos, menos sensível será também ao *L. casei*.

Neste estudo, realizamos diluições seriadas do *L. casei* para encontrar a concentração bacteriana utilizada no experimento, o que pode desempenhar um papel fundamental na eficácia e no resultado das atividades observadas. Partindo do pressuposto que uma concentração de BAL mais elevada pode promover uma maior inibição ao *S. pseudintermedius*, futuros estudos podem ser realizados aumentando a concentração de *L. casei* utilizada no presente experimento para futura comparação com os discos de antibiograma ou estabelecimento de concentração inibitória mínima (MIC), por exemplo, e posterior padronização.

É importante ressaltar que a média dos controles negativos foi igual a zero. Isso sugere que a atividade antimicrobiana observada nos experimentos está diretamente relacionada à presença do *L. casei* e não é devida ao meio de cultura ou contaminação.

A avaliação da resistência dos probióticos a antibióticos é uma medida de segurança, uma vez que existe a possibilidade de transferência horizontal de genes de resistência entre bactérias e uma disseminação destas estirpes. A última década testemunhou um aumento no número de relatórios que documentam a resistência aos antibióticos em estirpes de LAB. Embora as BAL sejam seguras, existe a preocupação com a possível mobilidade de determinantes de resistência a bactérias patogênicas e oportunistas humanas e animais. Nesse sentido, o isolado de *L. casei* se mostrou seguro para uso, uma vez que foi sensível a todos os antibióticos testados, o que pode estar relacionado a origem da cepa, sendo ela comensal e de um animal que não tinha histórico de piodermite anteriores e, provavelmente, não tenha sido exposto a tratamentos com antibióticos por via oral.

Observamos que apenas uma das amostras coletadas, especificamente da face côncava do pavilhão auditivo, apresentou crescimento com características de BAL. Esse resultado demonstra os desafios enfrentados no isolamento e caracterização de bactérias que não fazem parte do grupo mais abundante de uma microbiota tão complexa por meio do método de cultura tradicional, sofrendo influência de uma grande diversidade bacteriana. A identificação precisa da espécie por meio da técnica de espectrometria de massa MALDI-TOF MS se torna fundamental para entender a sua possível aplicação clínica. Essa técnica confirmou que as bactérias isoladas são,

de fato, *L. casei*. As bactérias ácido-lácticas são consideradas exigentes com crescimento ótimo em anaerobiose, o que também pode ter limitado o seu isolamento.

7 CONCLUSÃO

Esses resultados indicam que o *Lactobacillus casei* isolado da microbiota comensal de cão possui potencial antimicrobiano contra *S. pseudintermedius* e pode ser considerado como um possível agente terapêutico alternativo no tratamento de infecções causadas por essa bactéria em cães. No entanto, estudos adicionais são necessários para padronizar a concentração a ser utilizada e para definir os mecanismos subjacentes à atividade antimicrobiana observada.

O presente estudo demonstra que o uso de bactérias comensais da pele do cão, especificamente o *L. casei*, no controle de infecções bacterianas causadas por *S. pseudintermedius* é uma terapia promissora, com relevância significativa para a saúde animal e humana. A aplicação de microrganismos probióticos na prática clínica pode representar um avanço importante na luta contra infecções resistentes, ao mesmo tempo que pode contribuir para a prevenção de infecções em seres humanos. Essa abordagem inovadora preenche uma lacuna importante na pesquisa antimicrobiana e aponta para novas direções na busca por soluções eficazes e seguras para o controle de infecções bacterianas no contexto da Saúde Única. Pelo conhecimento do autor, esse é o primeiro estudo que testa a inibição de *Staphylococcus pseudintermedius* por *L. casei* da microbiota da pele de cão.

Experimentos futuros poderiam explorar diferentes concentrações do *Lactobacillus casei* e avaliar a formação de halos de inibição em relação aos antibióticos em concentrações padronizadas.

8 BIBLIOGRAFIA

ABEDIN, M. M. et al. Lactic acid bacteria in the functional food industry: biotechnological properties and potential applications. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 0, n. 0, p. 1–19, 5 jul. 2023.

AMERICAN ACADEMY OF MICROBIOLOGY; CHELSIE, G. **Applications of Clinical Microbial Next-Generation Sequencing**. [s.l.] American Society for Microbiology, abr. 2015. Disponível em: <<https://www.asm.org/index.php/colloquium-reports/item/4462-applications-of-clinical-microbial-next-generation-sequencing>>. Acesso em: 7 abr. 2022.

ANJANA; TIWARI, S. K. Bacteriocin-Producing Probiotic Lactic Acid Bacteria in Controlling Dysbiosis of the Gut Microbiota. **Frontiers in cellular and infection microbiology**, v. 12, p. 851140, 2022.

ARTHUR, T. D.; CAVERA, V. L.; CHIKINDAS, M. L. On bacteriocin delivery systems and potential applications. **Future Microbiology**, v. 9, n. 2, p. 235–248, fev. 2014.

BAJWA, J. Canine superficial pyoderma and therapeutic considerations. **The Canadian Veterinary Journal**, v. 57, n. 2, p. 204–206, fev. 2016.

BANNOEHR, J.; GUARDABASSI, L. *Staphylococcus pseudintermedius* in the dog: taxonomy, diagnostics, ecology, epidemiology and pathogenicity. **Veterinary Dermatology**, v. 23, n. 4, p. 253-e52, 2012.

BECO, L. et al. Suggested guidelines for using systemic antimicrobials in bacterial skin infections: part 2— antimicrobial choice, treatment regimens and compliance. **Veterinary Record**, v. 172, n. 6, p. 156–160, 2013.

BLANCHET-RÉTHORÉ, S. et al. Effect of a lotion containing the heat-treated probiotic strain *Lactobacillus johnsonii* NCC 533 on *Staphylococcus aureus* colonization in atopic dermatitis. **Clinical, Cosmetic and Investigational Dermatology**, v. 10, p. 249–257, 2017.

BLONDEAU, L. D. et al. Zoonotic *Staphylococcus pseudintermedius*: an underestimated human pathogen? **Future Microbiology**, v. 18, n. 6, p. 311–315, abr. 2023.

BLOOM, P. Canine superficial bacterial folliculitis: current understanding of its etiology, diagnosis and treatment. **Veterinary journal (London, England : 1997)**, v. 199, n. 2, p. 217–222, fev. 2014.

BOUCHARD, D. S. et al. Inhibition of *Staphylococcus aureus* invasion into bovine mammary epithelial cells by contact with live *Lactobacillus casei*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 79, n. 3, p. 877–885, fev. 2013.

CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE, 2018. Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Tests for Bacteria Isolated from Animals, **CLSI**, 4th ed.

- COATES, M. et al. The Skin and Intestinal Microbiota and Their Specific Innate Immune Systems. **Frontiers in Immunology**, v. 10, p. 2950, 17 dez. 2019.
- COX, H. U. et al. Species of *Staphylococcus* isolated from animal infections. **The Cornell veterinarian**, v. 74, n. 2, p. 124–135, 1984.
- DEBOER, D. J. Strategies for management of recurrent pyoderma in dogs. **The Veterinary clinics of North America. Small animal practice**, v. 20, n. 6, p. 1509–1524, nov. 1990.
- DELANGHE, L. et al. The role of lactobacilli in inhibiting skin pathogens. **Biochemical Society Transactions**, v. 49, n. 2, p. 617–627, 30 abr. 2021.
- DEVRIESE, L. A. et al. *Staphylococcus pseudintermedius* sp. nov., a coagulase-positive species from animals. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 55, n. 4, p. 1569–1573, 2005.
- DRAIZE, J. H. The Determination of the pH of the Skin of Man and Common Laboratory Animals. **Journal of Investigative Dermatology**, v. 5, n. 2, p. 77–85, abr. 1942.
- ELIAS, P. M. Structure and Function of the Stratum Corneum Extracellular Matrix. **Journal of Investigative Dermatology**, v. 132, n. 9, p. 2131–2133, set. 2012.
- ELIAS, P. M. The how, why and clinical importance of stratum corneum acidification. **Experimental Dermatology**, v. 26, n. 11, p. 999–1003, nov. 2017.
- ELIAS, P. M.; HATANO, Y.; WILLIAMS, M. L. Basis for the barrier abnormality in atopic dermatitis: outside-inside-outside pathogenic mechanisms. **The Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 121, n. 6, p. 1337–1343, jun. 2008.
- EYERICH, S. et al. Cutaneous Barriers and Skin Immunity: Differentiating A Connected Network. **Trends in Immunology**, v. 39, n. 4, p. 315–327, abr. 2018.
- FACCIN, M. et al. Common superficial and deep cutaneous bacterial infections in domestic animals: A review. **Veterinary Pathology**, p. 3009858231176558, 2 jun. 2023.
- FERNANDES, A. et al. A systematic review of natural products for skin applications: Targeting inflammation, wound healing, and photo-aging. **Phytomedicine**, v. 115, p. 154824, 1 jul. 2023.
- FROSINI, S.-M. et al. Opportunities for topical antimicrobial therapy: permeation of canine skin by fusidic acid. **BMC veterinary research**, v. 13, n. 1, p. 345, 21 nov. 2017.
- FROSINI, S.-M.; LOEFFLER, A. Treating canine pyoderma with topical antibacterial therapy. **In Practice**, v. 42, n. 6, p. 323–330, 2020.
- FUNGO, G. B. N. et al. “Two Is Better Than One”: The Multifactorial Nature of Phage-Antibiotic Combinatorial Treatments Against ESKAPE-Induced Infections. **PHAGE**, v. 4, n. 2, p. 55–67, jun. 2023.

GALTIER, M. et al. Bacteriophages to reduce gut carriage of antibiotic resistant uropathogens with low impact on microbiota composition. **Environmental Microbiology**, v. 18, n. 7, p. 2237–2245, jul. 2016.

GANTZIAS, C. MALDI-TOF MS profiling of non-starter lactic acid bacteria from artisanal cheeses of the Greek island of Naxos. **International Journal of Food Microbiology**, p. 6, 2020.

GEBRAYEL, P. et al. Microbiota medicine: towards clinical revolution. **Journal of translational medicine**, v. 20, n. 1, p. 111, 7 mar. 2022.

GLOS, K.; MUELLER, R. S. [Treatment of chronic recurrent idiopathic pyoderma in the dog with vaccines containing bacterial antigens]. **Tierärztliche Praxis. Ausgabe K, Kleintiere/Heimtiere**, v. 39, n. 6, p. 425–428, 2011.

GORTEL, K. Recognizing pyoderma: more difficult than it may seem. **The Veterinary clinics of North America. Small animal practice**, v. 43, n. 1, p. 1–18, jan. 2013.

GRIFFETH, G. C. et al. Screening for skin carriage of methicillin-resistant coagulase-positive staphylococci and *Staphylococcus schleiferi* in dogs with healthy and inflamed skin. **Veterinary Dermatology**, v. 19, n. 3, p. 142–149, jun. 2008.

HARTANTYO, S. H. P. et al. Sick pets as potential reservoirs of antibiotic-resistant bacteria in Singapore. **Antimicrobial Resistance & Infection Control**, v. 7, n. 1, p. 106, 31 ago. 2018.

HE, J. et al. Identification, Recombinant Expression, and Characterization of LHG2, a Novel Antimicrobial Peptide of *Lactobacillus casei* HZ1. **Molecules (Basel, Switzerland)**, v. 23, n. 9, p. 2246, 3 set. 2018.

HERMAN, A.; HERMAN, A. P. Antimicrobial peptides activity in the skin. **Skin Research and Technology**, v. 25, n. 2, p. 111–117, 2019.

HILL, C. et al. The International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics consensus statement on the scope and appropriate use of the term probiotic. **Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology**, v. 11, n. 8, p. 506–514, ago. 2014.

HILL, D. et al. The *Lactobacillus casei* Group: History and Health Related Applications. **Frontiers in Microbiology**, v. 9, p. 2107, 2018.

HILLIER, A. et al. Guidelines for the diagnosis and antimicrobial therapy of canine superficial bacterial folliculitis (Antimicrobial Guidelines Working Group of the International Society for Companion Animal Infectious Diseases). **Veterinary Dermatology**, v. 25, n. 3, p. 163-e43, 2014.

JACOBSEN, C. N. et al. Screening of probiotic activities of forty-seven strains of *Lactobacillus* spp. by in vitro techniques and evaluation of the colonization ability of five selected strains in humans. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 65, n. 11, p. 4949–4956, nov. 1999.

JAKOBSEN, R. R. et al. Bacteriophage Cocktail Significantly Reduces *Listeria monocytogenes* without Deleterious Impact on the Commensal Gut Microbiota under Simulated Gastrointestinal Conditions. **Viruses**, v. 14, n. 2, p. 190, fev. 2022.

JARAMILLO, L. Y. A. AVALIAÇÃO DO POTENCIAL BIOTECNOLÓGICO DE LINHAGENS. 2014.

JEON, B. et al. In vitro and in vivo downregulation of C3 by lipoteichoic acid isolated from *Lactobacillus plantarum* K8 suppressed cytokine-mediated complement system activation. **FEMS microbiology letters**, v. 363, n. 14, p. fnw140, jul. 2016.

KANG, J. et al. Complete Genome Sequence of *Lactobacillus casei* LC5, a Potential Probiotics for Atopic Dermatitis. **Frontiers in immunology**, v. 8, p. 413, 2017.

KARSKA-WYSOCKI, B.; BAZO, M.; SMORAGIEWICZ, W. Antibacterial activity of *Lactobacillus acidophilus* and *Lactobacillus casei* against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). **Microbiological Research**, v. 165, n. 8, p. 674–686, 20 out. 2010.

KHALFALLAH, G. et al. A New Approach to Harness Probiotics Against Common Bacterial Skin Pathogens: Towards Living Antimicrobials. **Probiotics and Antimicrobial Proteins**, v. 13, n. 6, p. 1557–1571, dez. 2021.

KNACKSTEDT, R.; KNACKSTEDT, T.; GATHERWRIGHT, J. The role of topical probiotics in skin conditions: A systematic review of animal and human studies and implications for future therapies. **Experimental Dermatology**, v. 29, n. 1, p. 15–21, jan. 2020.

LAU, A.-S.-Y.; LIONG, M.-T. Lactic Acid Bacteria and Bifidobacteria-Inhibited *Staphylococcus epidermidis*. **Wounds: A Compendium of Clinical Research and Practice**, v. 26, n. 5, p. 121–131, maio 2014.

LEFÈVRE-UTILE, A. et al. Five Functional Aspects of the Epidermal Barrier. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 22, n. 21, p. 11676, 28 out. 2021.

LEI, J. et al. The antimicrobial peptides and their potential clinical applications. **American Journal of Translational Research**, v. 11, n. 7, p. 3919–3931, 15 jul. 2019.

LEONARD, B. C.; AFFOLTER, V. K.; BEVINS, C. L. Antimicrobial peptides: agents of border protection for companion animals. **Veterinary dermatology**, v. 23, n. 3, p. 177-e36, jun. 2012a.

LEONARD, B. C.; AFFOLTER, V. K.; BEVINS, C. L. Antimicrobial peptides: agents of border protection for companion animals. **Veterinary Dermatology**, v. 23, n. 3, p. 177-e36, jun. 2012b.

LI, L. et al. Probiotic Supplementation for Prevention of Atopic Dermatitis in Infants and Children: A Systematic Review and Meta-analysis. **American journal of clinical dermatology**, v. 20, n. 3, p. 367–377, jun. 2019.

LOEFFLER, A. et al. In vitro activity of fusidic acid and mupirocin against coagulase-positive staphylococci from pets. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 62, n. 6, p. 1301–1304, 1 dez. 2008.

LOEFFLER, A.; SCOTT, C.; FROSINI, S.-M. Canine pyoderma: mecA persists

autogenous bacterin formulation from methicillin-resistant *Staphylococcus pseudintermedius* (MRSP) and *S. aureus* (MRSA). **Tierärztliche Praxis. Ausgabe K, Kleintiere/Heimtiere**, v. 49, n. 6, p. 437–440, nov. 2021.

LOZANO, C. et al. *Staphylococcus pseudintermedius* Human Infection Cases in Spain: Dog-to-Human Transmission. **Vector-Borne and Zoonotic Diseases**, v. 17, n. 4, p. 268–270, abr. 2017.

LYNCH, S. A.; HELBIG, K. J. The Complex Diseases of *Staphylococcus pseudintermedius* in Canines: Where to Next? **Veterinary sciences**, v. 8, n. 1, 18 jan. 2021a.

LYNCH, S. A.; HELBIG, K. J. The Complex Diseases of *Staphylococcus pseudintermedius* in Canines: Where to Next? **Veterinary sciences**, v. 8, n. 1, 18 jan. 2021b.

MA, G. C. et al. Commensal Staphylococci Including Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* from Dogs and Cats in Remote New South Wales, Australia. **Microbial Ecology**, v. 79, n. 1, p. 164–174, 1 jan. 2020.

MANGONI, M. L.; MCDERMOTT, A. M.; ZASLOFF, M. Antimicrobial peptides and wound healing: biological and therapeutic considerations. **Experimental Dermatology**, v. 25, n. 3, p. 167–173, mar. 2016.

MCLOUGHLIN, I. J. et al. Skin Microbiome-The Next Frontier for Probiotic Intervention. **Probiotics and antimicrobial proteins**, v. 14, n. 4, p. 630–647, ago. 2022.

MERGHNI, A. et al. Antioxidant and antiproliferative potential of biosurfactants isolated from *Lactobacillus casei* and their anti-biofilm effect in oral *Staphylococcus aureus* strains. **Microbial Pathogenesis**, v. 104, p. 84–89, mar. 2017.

MORRIS, D. O. et al. Recommendations for approaches to methicillin-resistant staphylococcal infections of small animals: diagnosis, therapeutic considerations and preventative measures. **Veterinary Dermatology**, v. 28, n. 3, p. 304-e69, 2017.

MUELLER, R. S. et al. A review of topical therapy for skin infections with bacteria and yeast. **Veterinary Dermatology**, v. 23, n. 4, p. 330-e62, 2012.

MURAKAMI, K; MINAMIDE, W; WADA, K; NAKAMURA, E; TERAOKA, H; WATANABE, S. Identification of methicillin-resistant strains of staphylococci by polymerase chain reaction. **J Clin Microbiol**. 1991;29(10):2240-4.

MYLES, I. A. et al. First-in-human topical microbiome transplantation with *Roseomonas mucosa* for atopic dermatitis. **JCI Insight**, v. 3, n. 9, p. e120608, 3 maio 2018.

NAKATSUJI, T. et al. Antimicrobials from human skin commensal bacteria protect against *Staphylococcus aureus* and are deficient in atopic dermatitis. **Science Translational Medicine**, v. 9, n. 378, p. eaah4680, 22 fev. 2017.

NUTTALL, T. Update on treating canine staphylococcal skin infections. **In Practice**, v. 35, n. S1, p. 12–17, 2013.

NUTTALL, T. J. et al. Update on pathogenesis, diagnosis, and treatment of atopic dermatitis in dogs. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 254, n. 11, p. 1291–1300, 1 jun. 2019.

PAPICH, M. G. Antimicrobial agent use in small animals what are the prescribing practices, use of PK-PD principles, and extralabel use in the United States? **Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics**, v. 44, n. 2, p. 238–249, 2021.

PATERSON, S. Rational use of antibiotics in skin disease. **Companion Animal**, v. 22, n. 11, p. 632–639, 2 nov. 2017.

PATERSON, S.; PATERSON, S.; PATERSON, S. **Manual of skin diseases of the dog and cat**. 2nd ed ed. Oxford: Blackwell Pub, 2008.

PRINCE, T.; MCBAIN, A. J.; O'NEILL, C. A. *Lactobacillus reuteri* Protects Epidermal Keratinocytes from *Staphylococcus aureus*-Induced Cell Death by Competitive Exclusion. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 78, n. 15, p. 5119–5126, ago. 2012.

ROBLES ALONSO, V.; GUARNER, F. Linking the gut microbiota to human health. **The British Journal of Nutrition**, v. 109 Suppl 2, p. S21-26, jan. 2013.

ROQUE-BORDA, C. A. et al. Challenge in the Discovery of New Drugs: Antimicrobial Peptides against WHO-List of Critical and High-Priority Bacteria. **Pharmaceutics**, v. 13, n. 6, p. 773, jun. 2021.

SAMBANTHAMOORTHY, K. et al. Antimicrobial and antibiofilm potential of biosurfactants isolated from lactobacilli against multi-drug-resistant pathogens. **BMC Microbiology**, v. 14, n. 1, 2014.

SANTORO, D.; ARCHER, L.; KELLEY, K. A defective release of host defense peptides is present in canine atopic skin. **Comparative immunology, microbiology and infectious diseases**, v. 65, p. 65–69, ago. 2019.

SASAKI, T. et al. Multiplex-PCR Method for Species Identification of Coagulase-Positive Staphylococci. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 48, n. 3, p. 765–769, mar. 2010.

SCHLAKE, A. et al. Influence of age, sex, body condition score, rectal temperature, anatomical location and hair on skin pH in dogs. **Veterinary Dermatology**, v. 33, n. 1, p. 3, fev. 2022.

SECKERDIECK, F.; MUELLER, R. S. Recurrent pyoderma and its underlying primary diseases: a retrospective evaluation of 157 dogs. **Veterinary Record**, v. 182, n. 15, p. 434–434, 2018.

SEYFI, R. et al. Antimicrobial Peptides (AMPs): Roles, Functions and Mechanism of Action. **International Journal of Peptide Research and Therapeutics**, v. 26, n. 3, p. 1451–1463, 1 set. 2020.

SIVARAJ, A. et al. Potential applications of lactic acid bacteria and bacteriocins in anti-

- mycobacterial therapy. **Asian Pacific Journal of Tropical Medicine**, v. 11, n. 8, p. 453, 8 jan. 2018.
- STARLANDER, G. et al. Cluster of Infections Caused by Methicillin-Resistant *Staphylococcus pseudintermedius* in Humans in a Tertiary Hospital. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 52, n. 8, p. 3118–3120, 21 dez. 2020.
- STEPHANIE A. LYNCH; HELBIG, K. J. The Complex Diseases of *Staphylococcus pseudintermedius* in Canines: Where to Next? **Veterinary Sciences**, v. 8, n. 1, p. 11, 18 jan. 2021.
- SULTANA, R.; MCBAIN, A. J.; O'NEILL, C. A. Strain-Dependent Augmentation of Tight-Junction Barrier Function in Human Primary Epidermal Keratinocytes by *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* Lysates. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 79, n. 16, p. 4887–4894, 15 ago. 2013.
- SUMMERS, J. F.; HENDRICKS, A.; BRODBELT, D. C. Prescribing practices of primary-care veterinary practitioners in dogs diagnosed with bacterial pyoderma. **BMC Veterinary Research**, v. 10, n. 1, p. 240, 8 out. 2014.
- SUN, Z. et al. Expanding the biotechnology potential of lactobacilli through comparative genomics of 213 strains and associated genera. **Nature Communications**, v. 6, p. 8322, 29 set. 2015.
- TESHOME, E. et al. Potentials of Natural Preservatives to Enhance Food Safety and Shelf Life: A Review. **The Scientific World Journal**, v. 2022, p. 9901018, 23 set. 2022.
- TOH, H. et al. Genomic Adaptation of the *Lactobacillus casei* Group. **PLoS ONE**, v. 8, n. 10, p. e75073, 8 out. 2013.
- TRIPATHI, N.; SAPRA, A. Gram Staining. Em: **StatPearls**. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing, 2023.
- UN-NISA, A. et al. Updates on the Role of Probiotics against Different Health Issues: Focus on *Lactobacillus*. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 24, n. 1, p. 142, 21 dez. 2022.
- VAN HOOVELS, L. et al. First Case of *Staphylococcus pseudintermedius* Infection in a Human. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 44, n. 12, p. 4609–4612, dez. 2006.
- VIAU, R. et al. Are *Staphylococcus intermedius* Infections in Humans Cases of Mistaken Identity? A Case Series and Literature Review. **Open Forum Infectious Diseases**, v. 2, n. 3, p. ofv110, 1 set. 2015.
- WANKE, I. et al. Skin Commensals Amplify the Innate Immune Response to Pathogens by Activation of Distinct Signaling Pathways. **Journal of Investigative Dermatology**, v. 131, n. 2, p. 382–390, fev. 2011.
- WEESE, J. S. The canine and feline skin microbiome in health and disease. **Veterinary dermatology**, v. 24, n. 1, p. 137- 145.e31, fev. 2013.
- WIDYARMAN, A. S. et al. Isolation and identification of Indonesian *Lactobacillus*

reuteri strain from the saliva of young adults. **Scientific Dental Journal**, v. 2, n. 2, p. 67, 5 jan. 2018.

XU, X. et al. Antibacterial potential of a novel *Lactobacillus casei* strain isolated from Chinese northeast sauerkraut and the antibiofilm activity of its exopolysaccharides. **Food & Function**, v. 11, n. 5, p. 4697–4706, 2020.

YARBROUGH, M. L.; LAINHART, W.; BURNHAM, C.-A. D. Epidemiology, Clinical Characteristics, and Antimicrobial Susceptibility Profiles of Human Clinical Isolates of *Staphylococcus intermedius* Group. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 56, n. 3, p. 10.1128/jcm.01788-17, 22 fev. 2018.

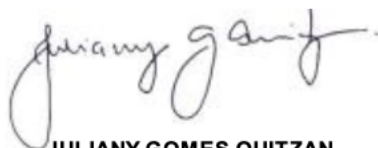
ZHANG, Q.-Y. et al. Antimicrobial peptides: mechanism of action, activity and clinical potential. **Military Medical Research**, v. 8, n. 1, p. 48, 9 set. 2021.

ATESTADO

Atesto que o Projeto "ISOLAMENTO E AVALIAÇÃO DO POTENCIAL PROBIÓTICO DE BACTÉRIA ÁCIDO- LÁTICA SOBRE CULTURA DE STAPHYLOCOCCUS PSEUDINTERMEDIUS" **Protocolo CEUA 0330/2023**, a ser conduzido por DANIELLE CAVALCANTI DE CARVALHO DINIZ, responsável/orientador Luiz Henrique de Araújo Machado, para fins de pesquisa científica/ensino - encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 08 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal - CONCEA.

Finalidade	PESQUISA CIENTÍFICA
Vigência do projeto	16/03/2023 a 18/05/2023
Nome Comum / Espécie / Linhagem	CANINA / CANIS LUPUS FAMILIARIS / Indefinida
Raça	Indefinida
Nº de animais machos	0
Nº de animais fêmeas	0
Nº de animais sexo indefinido	10
Peso médio de animais machos	0
Peso médio de animais fêmeas	0
Peso médio de animais sexo indefinido	10
Idade	5 ano(s) e 0 mes(es) e 0 dia(s).
Procedência	Amostras coletadas entre set. 2018 a jan. 2020

Projeto de Pesquisa aprovado em reunião da CEUA em 06/03/2023



JULIANY GOMES QUITZAN

Presidente da CEUA da FMVZ, UNESP - Campus de Botucatu

9 Artigo Científico

* Trabalho a ser enviado para a revista *Veterinary Dermatology*

Identification and antimicrobial evaluation of *Lactobacillus casei* against *Staphylococcus pseudintermedius* clinical isolates.

Danielle Cavalcanti de Carvalho Diniz^a, Marcio Garcia Ribeiro^a, Gabriele Silva Dias^a, Guilherme de Brito Viana^a, Adriano Sakari Okamoto^a, Luiz Henrique de Araújo Machado^a

^aDepartment of Veterinary Clinic, School of Veterinary Medicine and Animal Science, São Paulo State University (UNESP), Botucatu, Brazil

*correspondence: d.diniz@unesp.br; Tel.: +55-81-997850599

Abstract

Background

The antimicrobials available in the market are becoming increasingly scarce, and the development of new drugs is much slower, generating enormous concern about the future health scenario and control of these pathogens. Therefore, researching new means of combating pathogenic bacteria, resistant or not, becomes imperative. Probiotics emerge as an alternative to antibiotics, acting not only by inhibiting and competing with pathogenic microorganisms but also by assisting regulation of the immune system.

Objectives

To isolate and identify lactic bacteria from healthy canine skin and investigate its antibacterial effect on cultures of *Staphylococcus pseudintermedius*, originating from dogs with pyoderma, as a potential complementary or alternative therapy to the use of antimicrobials.

Methods

Tirty clinical isolates of *Staphylococcus pseudintermedius* were tested using agar diffusion method, with a strain of *Lactobacillus casei* isolated from a canine healthy skin. The inhibition zone was measured after 24 h.

Results

The *Lactobacillus casei* strain inhibited the growth of all 30 isolates of *S. pseudintermedius*, including a methicilin resistant one. The clearing zone ranged from 6mm to 20 millimeters from *L.casei* border.

Conclusions

The present study demonstrates that the use of commensal bacteria from canine skin, specifically *L. casei*, in the control of bacterial infections caused by *S. pseudintermedius*, is a promising therapy with significant relevance for animal and human health.

Keywords: pyoderma, bacteriotherapy, probiotic, dermatology

Introduction

Staphylococcus pseudintermedius is an opportunistic bacteria found in the skin microbiome of healthy humans and animals, while also a significant cause of disease (1). This coagulase-positive staphylococcal species is mainly associated with skin infections and otitis but can be involved in virtually all types of infections and plays a role in the worldwide dissemination of strains resistant to many of the antimicrobial agents available in veterinary medicine (2). Methicillin-resistant strains of *S. pseudintermedius* (MRSP) have made the treatment of these infections even more challenging, and as the rate of antibiotic resistance is exponentially increasing, the discovery of new antibacterial agents has decreased in recent decades (1). Under the concept of One Health, this fact cannot be ignored, as dogs live in close contact with humans and can serve as a reservoir for antibiotic-resistant zoonotic bacteria (3). In this context, it becomes imperative to find alternatives to the use of antibiotics for the treatment of these diseases, and probiotics emerge as a good option. Awareness of antibiotic use and its relationship with One Health, along with the search for alternatives with lower costs and fewer side effects than traditional therapies, has created a billion-dollar market for probiotics, estimated at 58 billion dollars in 2021 and projected to grow at an annual growth rate of 7.5% from 2021 to 2030. However, only 10% of this market belongs to products for veterinary use (Verified Market Research, 2022). Probiotics are live microorganisms that confer health benefits to the host when administered in adequate amounts (4). These bacteria can assist in the local and systemic modulation of the host's immune system, wound healing, combating infections, and even cosmetic use (5). Many studies have demonstrated the potential of probiotics against various diseases, such as allergic pathologies, diarrhea, inflammatory bowel disease, and viral infections (6). For these reasons, there is a growing interest in the development of adjuvant or alternative therapies using probiotics, which could be used as supplements to improve the functional properties of products and therapeutic preparations. The most well-known probiotic microorganisms belong to the *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* genera. *Lactobacillus* strains have been shown to play a beneficial role in defending against inflammatory processes affecting the skin and in resistance to infections by directly and indirectly interfering with pathogens (5). Recently, it has been found that *Lactobacillus reuteri* has an anti-inflammatory effect on infected keratinocytes, reducing the transcription of inflammatory interleukins (7), and also protects keratinocytes from *S. aureus*-induced cell death by competitively excluding their binding sites on the cells (8); *Lactobacillus plantarum* is capable of inhibiting tumor necrosis factor (9). All these results support the development of treatments containing probiotics. With that said, this project aims to isolate and characterize lactic acid bacteria (LAB) from the canine skin commensal microbiota and evaluate their antibacterial efficacy against *S. pseudintermedius* clinical isolates.

Material and methods

Staphylococcus pseudintermedius isolates

The thirty *S. pseudintermedius* samples were obtained in the routine of the Veterinary Hospital of FMVZ - UNESP / Botucatu –SP and collected from dogs with superficial or deep pyoderma, with no predilection for race, sex or age. Staphylococcal isolates were processed for routine bacterial culture and sensitivity (see Table in Supporting information) as per Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) guidelines (10). Isolates were identified based on biochemical reactions and subsequently underwent matrix-assisted laser desorption ionization-time of light mass spectrometry (MALDI-TOF MS) and Polymerase Chain Reaction (PCR), for species identification and

detection of the *mecA* gene, respectively (11,12). The American Type Culture Collection (ATCC) *S. pseudintermedius* (ATCC) strain was tested as internal control.

L. casei isolates

The *Lactobacillus casei* isolate was obtained from skin samples collected using a sterile cotton swab gently rubbed on the skin of healthy dogs without concurrent dermatological disease, with no preference for breed, gender, or age. Three locations were selected for sample collection: axilla, concave face of the auricular pavilion, and thoracodorsal region. The cotton swabs containing the biological material were immersed in tubes containing 10 ml of sterile DeMan-Rogosa-Sharpe (MRS) broth and incubated at 37°C for 24 hours. After incubation, the MRS broth was streaked onto MRS agar and incubated under the same conditions. Cultures with cream-colored colonies and smooth edges, phenotypically consistent with lactobacilli, were selected, and a Gram stain was performed following Tripathi (2023). Gram-positive, rod-shaped bacterial isolates identified during the microscopic examination were chosen and inoculated in MRS broth, then incubated for 24 hours. The next day, 1 mL of the broth culture was transferred to a 1.5 mL Eppendorf tube along with 0.3 mL of liquid glycerol, homogenized, and stored at -80°C until further use. Before each analysis, the isolates were activated in MRS broth. The sample containing Gram-positive rod-shaped colonies was confirmed at the species level using the MALDI-TOF MS technique. The concentration of *Lactobacillus casei* samples was evaluated by culturing them in MRS broth at 37°C and subsequently counting on MRS agar plates. A 0.1 mL aliquot of the inoculated broth was added to a 1.5 mL Eppendorf tube and diluted in 0.9 mL of phosphate-buffered saline (PBS) solution, resulting in the first dilution (10⁻¹). From this dilution, eight additional serial dilutions were made. From each dilution, 0.1 mL was taken and plated on Petri dishes containing MRS agar. The plates were then homogenized using a glass Drigalski loop and incubated at 37°C for 24 hours. Subsequently, the colony-forming units (CFUs) of each dilution were counted.

Antimicrobial activity and BAL concentration

To assess the antagonistic activity of *L. casei* against *S. pseudintermedius*, the “spot on the lawn” method was performed. The test was a modification of that described by (13). On day 1, the *L. casei* samples were inoculated in 5 mL of MRS broth at 37°C, aerobically, for 24 hours. On day 2, 10 µL of the same broth was gently added in the form of small spots on Petri dishes containing 15 mL of solid MRS agar. After completely drying, the plates were incubated for 24 hours, aerobically, at 37°C. On the same day, each of the 30 samples of *S. pseudintermedius* was mixed on 10 mL of brain heart infusion (BHI) and incubated at 37°C, aerobically, for 24 hours. On day 3, 100 µL of each indicator culture was transferred to new tubes containing BHI broth with 0.9% agar added to each tube. While still in a liquid state, the inoculated medium was poured slowly onto the MRS agar plates with the developed spots of lactic acid bacteria. After complete solidification, the plates were incubated at 37°C, aerobically, for 24 hours. On day 4, the size of the inhibition halo formed around the edge of the *Lactobacillus* colony was measured. A growth-free zone larger than 2 mm around a spot was classified as positive according to Jacobsen et al. (1999). Each test was repeated eight times with each isolate. The inhibitory effect of MRS was tested as a negative control in a different Petri dish. As a positive control, a spot was made using standardized antibiotic discs with a diameter of 6.35 mm, containing 30 µg of amoxicillin with clavulanic acid, on each culture of *S. pseudintermedius*.

Antibiotic susceptibility profile

To determine the antimicrobial susceptibility of the *L. casei* isolate, an assay was conducted using the disk diffusion method, adapted from the Kirby Bauer method (BAUER et al., 1966). Standardized disks containing the following antibiotics were employed: amoxicillin with clavulanate, doxycycline, azithromycin, penicillin, enrofloxacin, ciprofloxacin, oxacillin, ampicillin, amikacin, erythromycin, and chloramphenicol. In summary, using a bacteriological loop, a few colonies of *L. casei* cultured on MRS agar, previously incubated at 37°C for 48 hours, were collected and suspended in sterile saline solution to achieve a turbidity corresponding to 0.5 on the McFarland scale. After inoculum homogenization, a sterile swab was introduced into the tube, and then the inoculation was streaked on the surface of a Petri dish containing Mueller Hinton agar. After the plates dried, antibiotic disks were applied using sterile forceps and incubated in an oven for 48 hours. The diameter of the inhibition zones was measured with a ruler to determine whether the bacterium under analysis was susceptible (S), moderately susceptible (MS), or resistant (R) to the antimicrobials, compared to a standard antibiogram table (CHARTERIS et al., 1998).

The assessment of antimicrobial activity was conducted using the Spot on the Lawn method, or agar diffusion, which involved seeding *Lactobacillus* samples in 5 mL of MRS broth at 37°C for 24 hours. Subsequently, 10 µL of the same culture was gently added in four small spots on Petri dishes containing 15 mL of MRS agar. Once fully dried, the plates were incubated for 24 hours at 37°C. Each of the 30 *S. pseudintermedius* samples was cultured in BHI broth and incubated at 37°C for 24 hours on the same day, and the following day, they were transferred to new tubes containing BHI broth with 0.9% agar-agar (BHA) added to each tube. While still in liquid form, the medium containing the inoculum was slowly poured over the MRS agar plates with the spots of lactic acid bacteria. After complete solidification, the plates were incubated again at 37°C for 24 hours. Following this period, the size of the inhibition zone formed from the edge of the *Lactobacillus* colonies was measured. Each test was repeated eight times with each isolate.

As a negative control, spots containing only MRS culture medium were applied to each of the *S. pseudintermedius* isolates and incubated at 37°C for 24 hours. As a positive control, the spot was made with standardized antibiogram disks with a diameter of 6.35 mm, containing 30 µg of amoxicillin with clavulanic acid, on each *S. pseudintermedius* culture.

Results

The antimicrobial effects of strains tested, as determined by the spot on the lawn test, are showed in Table 2. The *L. casei* strain was able to form an inhibition zone in all 30 isolates of *S. pseudintermedius*, ranging from 6mm in isolate #58 (MRSP) to 20 millimeters in isolate #8 (MSSP). The overall average inhibition across all isolates was 11mm. The inhibition zones formed by the positive control with antibiotic discs ranged from 0mm (MRSP) to 37mm in isolate #30 (MSSP), with an average of 29mm. Among the negative controls, only one of them showed slight inhibition in the culture containing isolate #6. To obtain the actual number of colonies present in the sample, a Petri dish with 66 colonies at the 10⁻⁶ dilution was used, resulting in 6.6 x 10⁻⁸ CFU/mL.

Discussion

The objective of this study was to evaluate the antimicrobial action of commensal *Lactobacillus casei* from the skin of healthy dogs as a potential treatment for pyodermatitis caused by *S. pseudintermedius*. When testing 30 clinical isolates of *S. pseudintermedius* using the agar diffusion method, we observed promising results. *L. casei* was capable of forming inhibition zones in all tested isolates, indicating effective antimicrobial action against *S. pseudintermedius*. This result is consistent with findings from similar studies testing the antimicrobial activity of *L. casei* strains against *S. aureus* (KARSKA-WYSOCKI; BAZO; SMORAGIEWICZ, 2010; XU et al., 2020). The activity of *Lactobacillus casei* against pathogens can occur through various mechanisms, such as competition for nutrients, production of lactic acid, biosurfactants (SAMBANTHAMOORTHY et al., 2014), antimicrobial peptides (He et al., 2018), hydrogen peroxide, diacetyl, as well as metabolites like γ -aminobutyric acid (GABA), exopolysaccharides (EPSs), conjugated linoleic acid (CLA) (ABEDIN et al., 2023). However, the exact mechanism by which pathogen inhibition was achieved goes beyond the scope of this study.

The measurement of inhibition zones formed by *L. casei* on *S. pseudintermedius* isolates showed a positive correlation with the zones produced by antibiotic disks on the same isolates, such that when the former increased, the latter also increased. Therefore, knowledge of one of these measurements could generate a prediction of the other.

Comparing the size of the inhibition zones of *L. casei* with those of antibiotic disks, we found that the average inhibition zones formed by the disks were larger than the average inhibition zones formed by *Lactobacillus*. This difference may be attributed to the lack of standardization regarding the ideal concentration of *Lactobacillus casei* to ensure precise and comparable results with antibiotics. A low concentration may result in insufficient activity to produce a detectable halo, while a very high concentration may lead to a larger halo than expected. Therefore, the lack of studies establishing the appropriate concentration of *Lactobacillus casei* for the technique may have influenced the results obtained. Future experiments could explore different concentrations of *Lactobacillus casei* and assess the formation of inhibition zones in relation to antibiotics at standardized concentrations. Additionally, it is important to consider that the mechanism of action of *Lactobacillus casei* may be different from that of conventional antibiotics, which may also contribute to the observed differences.

In this study, serial dilutions of *L. casei* were performed to find the bacterial concentration used in the experiment, which may play a fundamental role in the efficacy and outcome of the observed activities. Assuming that a higher LAB concentration may promote greater inhibition of *S. pseudintermedius*, future studies could be conducted by increasing the concentration of *L. casei* used in the current experiment for future comparison with antibiogram disks or the establishment of minimum inhibitory concentration (MIC), for example, and subsequent standardization.

It is important to note that out of all the assays conducted, only one of the negative controls showed a small inhibition zone. This suggests that the observed antimicrobial activity in the experiments is directly related to the presence of *L. casei* and is not due to the culture medium or contamination.

The assessment of probiotic resistance to antibiotics is an important safety measure for evaluating the risk of resistance gene transfer. In this regard, the *L. casei* isolate proved to be safe for use, as it was sensitive to all tested antibiotics. This may be related to the origin of the strain, being commensal and from an animal with no previous history of pyodermitis and likely not exposed to many oral antibiotic treatments.

We observed that only one of the collected samples, specifically from the concave face of the auricular pinna, showed growth with LAB-like characteristics. This result highlights the challenges in isolating and characterizing bacteria that are not part of the most abundant group in such a complex microbiota using traditional culture methods, influenced by a wide bacterial diversity. Precise species identification through the MALDI-TOF MS mass spectrometry technique is essential for understanding its possible clinical application. These lactic acid bacteria are considered anaerobes with optimal growth conditions, which may have also limited their isolation.

Conclusion

These results indicate that *Lactobacillus casei* isolated from the commensal skin microbiota of dogs possesses antimicrobial potential against *S. pseudintermedius* and can be considered as a possible alternative therapeutic agent in the treatment of infections caused by this bacterium in dogs. However, additional studies are needed to standardize the concentration to be used and to define the mechanisms underlying the observed antimicrobial activity. This study demonstrates that the use of commensal skin bacteria of dogs, specifically *L. casei*, in the control of bacterial infections caused by *S. pseudintermedius*, is a promising therapy, with significant relevance to animal and human health. The application of probiotic microorganisms in clinical practice may represent an important advancement in the fight against resistant infections while also contributing to the prevention of infections in humans. This innovative approach fills an important gap in antimicrobial research and points to new directions in the search for effective and safe solutions for the control of bacterial infections in the context of One Health.

Source of Funding: This study was self-funded

Conflicts of Interest: There are no conflicts of interest.

References

1. Bannoehr J, Guardabassi L. Staphylococcus pseudintermedius in the dog: taxonomy, diagnostics, ecology, epidemiology and pathogenicity. Vet Dermatol [Internet]. 2012 [citado 4 de junho de 2023];23(4):253-e52. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/j.1365-3164.2012.01046.x>
2. Weese JS, van Duijkeren E. Methicillin-resistant Staphylococcus aureus and Staphylococcus pseudintermedius in veterinary medicine. Vet Microbiol [Internet]. 27 de janeiro de 2010 [citado 4 de junho de 2023];140(3):418–29. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0378113509000753>
3. Hartantyo SHP, Chau ML, Fillon L, Ariff AZBM, Kang JSL, Aung KT, et al. Sick pets as potential reservoirs of antibiotic-resistant bacteria in Singapore. Antimicrob Resist Infect Control [Internet]. 31 de agosto de 2018 [citado 5 de junho de 2023];7(1):106. Disponível em: <https://doi.org/10.1186/s13756-018-0399-9>
4. Delanghe L, Spacova I, Van Malderen J, Oerlemans E, Claes I, Lebeer S. The role of

lactobacilli in inhibiting skin pathogens. *Biochem Soc Trans.* 30 de abril de 2021;49(2):617–27.

5. Knackstedt R, Knackstedt T, Gatherwright J. The role of topical probiotics in skin conditions: A systematic review of animal and human studies and implications for future therapies. *Exp Dermatol.* janeiro de 2020;29(1):15–21.
6. Robles Alonso V, Guarner F. Linking the gut microbiota to human health. *Br J Nutr.* janeiro de 2013;109 Suppl 2:S21-26.
7. Widyarman AS, Pranoto S, Theodorea CF, Bachtiar EW, Bachtiar BM. Isolation and identification of Indonesian *Lactobacillus reuteri* strain from the saliva of young adults. *Sci Dent J [Internet].* 5 de janeiro de 2018 [citado 20 de julho de 2023];2(2):67. Disponível em: <https://www.scidentj.com/article.asp?issn=2580-6548;year=2018;volume=2;issue=2;spage=67;epage=75;aulast=Widyarman;type=0>
8. Prince T, McBain AJ, O'Neill CA. *Lactobacillus reuteri* Protects Epidermal Keratinocytes from *Staphylococcus aureus*-Induced Cell Death by Competitive Exclusion. *Appl Environ Microbiol [Internet].* agosto de 2012 [citado 27 de junho de 2023];78(15):5119–26. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3416415/>
9. Jeon B, Kim HR, Kim H, Chung DK. In vitro and in vivo downregulation of C3 by lipoteichoic acid isolated from *Lactobacillus plantarum* K8 suppressed cytokine-mediated complement system activation. *FEMS Microbiol Lett.* julho de 2016;363(14):fnw140.
10. Watts JL, Shryock TR, Apley M, Bade DJ, Brown SD, Gray JT, et al. Performance Standards for Antimicrobial Disk and Dilution Susceptibility Tests for Bacteria Isolated From Animals; Approved Standard—Third Edition. 28.
11. Bannoehr J, Franco A, Iurescia M, Battisti A, Fitzgerald JR. Molecular Diagnostic Identification of *Staphylococcus pseudintermedius*. *J Clin Microbiol [Internet].* fevereiro de 2009 [citado 20 de julho de 2023];47(2):469–71. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2643665/>
12. Barreiro JR, Ferreira CR, Sanvido GB, Kostrzewa M, Maier T, Wegemann B, et al. Short communication: Identification of subclinical cow mastitis pathogens in milk by matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry. *J Dairy Sci [Internet].* 1º de dezembro de 2010 [citado 20 de julho de 2023];93(12):5661–7. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0022030210006156>
13. Jacobsen CN, Rosenfeldt Nielsen V, Hayford AE, Møller PL, Michaelsen KF, Paerregaard A, et al. Screening of probiotic activities of forty-seven strains of *Lactobacillus* spp. by in vitro techniques and evaluation of the colonization ability of five selected strains in humans. *Appl Environ Microbiol.* novembro de 1999;65(11):4949–56.

Table 1. Susceptibility profile of *S. pseudintermedius* isolates.

#	Ami	Amo	Amp	Azi	Cfv	Cfu	Cfx	Cip	Cli	Clo	Dox	Enr	Eri	Gnt	Lev	Neo	Oxa	Pen
#3	s	s	r	s	s	s	s	s	s	s	r	s	s	s	s	s	s	s
#4	s	s	s	s	s	s	s	s	s	s	s	s	s	s	s	s	s	s
#6	s	s	r	s	s	s	s	s	s	s	s	s	s	s	s	s	s	r
#8	s	s	r	s	s	s	s	s	s	s	s	s	ps	s	s	s	s	s
#10	s	s	r	s	s	s	s	r	s	s	r	r	s	s	r	ps	s	r
#11	s	s	s	s	s	s	s	s	s	s	s	s	ps	s	s	ps	s	s
#13	s	s	r	r	s	s	s	r	r	r	r	r	r	s	r	r	s	r

#	Ami	Amo	Amp	Azi	Cfv	Cfu	Cfx	Cip	Cli	Clo	Dox	Enr	Eri	Gnt	Lev	Neo	Oxa	Pen
#17	s	s	r	s	s	s	s	s	s	s	r	s	s	s	s	s	s	s
#18	s	s	r	s	s	s	s	s	s	s	r	s	s	s	s	s	s	r
#20	s	s	r	ps	s	s	s	s	r	s	s	s	r	s	s	r	s	s
#21	s	s	r	s	s	s	s	s	s	s	r	s	s	s	s	s	s	s
#23	s	s	r	s	s	r	ps	s	r	s	s	s	r	s	s	s	s	s
#24	s	s	s	s	s	s	s	s	s	s	s	s	s	s	s	s	s	s
#25	s	s	r	s	s	ps	s	s	s	s	s	s	s	s	s	s	s	r
#27	s	s	r	s	s	s	s	s	s	s	s	ps	s	s	s	s	s	r
#29	s	s	r	s	s	s	s	s	s	s	s	s	s	s	s	s	s	s
#30	s	s	s	s	s	s	s	s	s	s	s	s	s	s	s	s	s	s
#31	s	s	s	s	s	s	s	s	s	s	r	s	s	s	s	s	s	s
#33	s	s	s	s	s	s	s	s	s	s	s	s	s	s	s	s	s	s
#34	s	s	s	s	s	s	s	s	s	s	s	s	s	s	s	s	s	s
#35	s	s	r	s	s	s	s	s	s	s	s	s	s	s	s	s	s	s
#38	s	s	r	s	s	s	s	s	s	s	r	s	s	s	s	s	s	r
#41	s	s	s	s	s	s	s	s	s	s	s	s	s	s	s	s	s	s
#48	s	s	s	s	s	s	s	s	s	s	ps	s	s	s	s	s	s	s
#49	s	s	s	s	s	s	s	s	s	s	s	s	s	s	s	s	s	s
#50	s	s	s	s	s	s	s	s	s	s	s	s	s	s	s	s	s	s
#51	s	s	r	s	s	s	s	s	s	s	s	s	s	s	s	s	s	r
#55	s	s	r	s	s	s	s	s	s	s	r	s	s	s	s	s	s	s
#57	s	s	s	s	s	s	s	s	s	s	s	ps	s	s	s	s	s	s
#58	s	r	r	r	r	r	r	r	r	r	r	r	r	r	r	r	r	r

#: isolate; r: resistant; s: sensitive; ps: partially sensitive

Ami: amikacin; Amo: amoxicillin + clavulanic acid; Amp: ampicillin; Azi: azithromycin; Cfv: cefovecin; Cfu: Cefotur;
Cfx: ceftriaxone; Cip: ciprofloxacin; Cli: clindamycin; Clo: chloramphenicol; Dox: doxycycline; Enr: enrofloxacin;
Eri: erythromycin; Gnt: gentamicin; Lev: levofloxacin; Neo: neomycin; Oxa: oxacillin; Pen: penicillin



Figure 1. Culture of a sample from the auricular pavilion, showing cream-colored colonies with smooth edges, consistent with lactic acid bacteria.

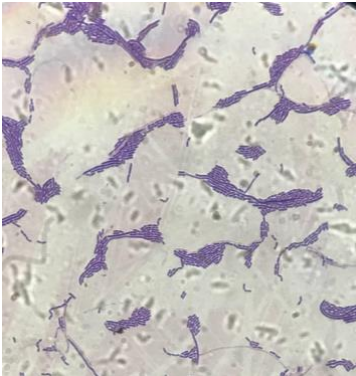


Figure 2. Microscopy of Gram-positive bacterial isolate, rod-shaped and arranged in chains.

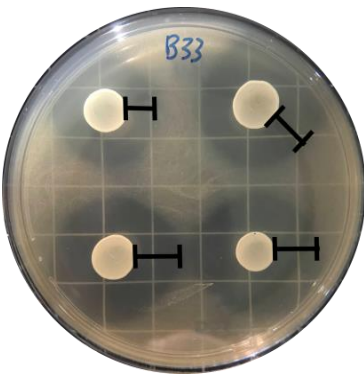


Figure 3. Inhibitory activity of *Lactobacillus casei* against isolate #33.

Table 2. Values of the inhibition halo size formed from the edge of the colony of *Lactobacillus casei* on each *S. pseudintermedius* isolate.

ISOLATE	M1	M2	M3	M4	M5	M6	M7	M8	MD	PC	NC
#3	10	11	11	11	11	10	8	8	10	31	0
#4	11	13	13	10	15	13	14	15	13	22	0
#6	11	11	9	9	10	11	11	13	11	30	0,4
#8	12	18	12	19	19	20	17	13	16	31	0
#10	10	9	9	15	10	9	12	9	10	25	0

#11	12	10	12	16	12	11	9	9	11	35	0
#13	10	11	13	9	13	10	12	15	12	30	0
#17	9	9	13	10	9	11	9	13	10	31	0
#18	10	11	9	9	8	9	12	12	10	27	0
#20	9	8	9	15	9	8	12	10	10	24	0
#21	9	8	10	12	10	9	12	14	10	26	0
#23	13	11	9	11	9	15	11	11	11	21	0
#24	9	9	8	7	10	8	8	6	8	31	0
#25	11	11	10	14	11	14	13	11	12	31	0
#27	15	15	15	15	18	14	13	13	15	35	0
#29	9	10	11	12	10	11	11	13	11	31	0
#30	11	10	10	9	8	9	10	11	10	37	0
#31	13	13	9	9	14	19	10	16	13	31	0
#33	10	8	9	9	12	11	10	11	10	34	0
#34	10	11	12	12	14	14	14	17	13	21	0
#35	10	11	10	14	13	10	11	9	11	31	0
#38	11	9	7	14	18	19	19	13	14	31	0
#41	12	9	12	11	11	12	13	14	12	31	0
#48	11	11	10	11	13	13	15	15	12	34	0
#49	12	12	14	16	9	15	13	12	13	35	0
#50	12	12	13	14	15	14	15	13	13	35	0
#51	12	14	16	15	15	15	11	13	14	33	0
#55	11	9	6	9	11	12	11	10	10	30	0
#571	12	11	11	11	7	7	9	11	10	35	0
#58 [‡]	6	6	6	7	6	5	-	-	6	0	0

† Values in millimeters; ‡MRSP

M: measure; PC: positive control; NC: negative control;