

O impacto do efluxo na suscetibilidade reduzida a biocidas e resistência a fluoroquinolonas em *Staphylococcus pseudintermedius*

The impact of efflux on reduced susceptibility to biocides and fluoroquinolone resistance in Staphylococcus pseudintermedius

L'impact de l'efflux sur la susceptibilité réduite aux biocides et la résistance aux fluoroquinolones chez Staphylococcus pseudintermedius

Marta Leal

Global Health and Tropical Medicine, GHTM, Associate Laboratory in Translation and Innovation Towards Global Health, LA-REAL, Instituto de Higiene e Medicina Tropical, IHMT, Universidade NOVA de Lisboa, UNL, Portugal; a21001253@ihmt.unl.pt

Catarina Morais

Global Health and Tropical Medicine, GHTM, Associate Laboratory in Translation and Innovation Towards Global Health, LA-REAL, Instituto de Higiene e Medicina Tropical, IHMT, Universidade NOVA de Lisboa, UNL, Portugal; a21000758@ihmt.unl.pt

Bárbara Ramos

Global Health and Tropical Medicine, GHTM, Associate Laboratory in Translation and Innovation Towards Global Health, LA-REAL, Instituto de Higiene e Medicina Tropical, IHMT, Universidade NOVA de Lisboa, UNL, Portugal; bdramos7@gmail.com

Patrícia Abrantes

Global Health and Tropical Medicine, GHTM, Associate Laboratory in Translation and Innovation Towards Global Health, LA-REAL, Instituto de Higiene e Medicina Tropical, IHMT, Universidade NOVA de Lisboa, UNL, Portugal; patriciaabrantes@ihmt.unl.pt

Constança Pomba

CIISA, Centre of Interdisciplinary Research in Animal Health, Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade de Lisboa, Portugal; cpomba@fmv.ulisboa.pt
GeneVet, Laboratório de Diagnóstico Molecular Veterinário, Carnaxide, Portugal

Sofia Santos Costa

Global Health and Tropical Medicine, GHTM, Associate Laboratory in Translation and Innovation Towards Global Health, LA-REAL, Instituto de Higiene e Medicina Tropical, IHMT, Universidade NOVA de Lisboa, UNL, Portugal; scosta@ihmt.unl.pt

Isabel Couto

Global Health and Tropical Medicine, GHTM, Associate Laboratory in Translation and Innovation Towards Global Health, LA-REAL, Instituto de Higiene e Medicina Tropical, IHMT, Universidade NOVA de Lisboa, UNL, Portugal; icouto@ihmt.unl.pt

Resumo

Staphylococcus pseudintermedius é o principal agente bacteriano de infeções de pele e tecidos moles (SSTI) em animais de companhia. O escalar da resistência aos compostos antimicrobianos, associada a fenótipos de multirresistência, coloca em risco a terapêutica a aplicar no controlo de infeções de pele causadas por este agente patogénico. O efluxo como mecanismo de resistência tem sido negligenciado para esta espécie. O objetivo deste estudo consistiu em avaliar a contribuição do efluxo para a suscetibilidade reduzida a biocidas e fluoroquinolonas. A estimativa de valores de *cut-off* (CO_{WT}) permitiu identificar uma população de *S. pseudintermedius* com suscetibilidade reduzida ao biocida brometo de tetrafenilfosfónio (TPP). A caracterização da atividade de efluxo foi avaliada por dois métodos: determinação de concentrações mínimas inibitórias (CMI) na presença de inibidores de

efluxo e ensaios de acumulação/efluxo de brometo de etídeo por fluorometria em tempo real. A utilização destas duas metodologias permitiu associar este fenótipo de suscetibilidade reduzida a um aumento da atividade de efluxo. Relativamente à fluoroquinolona ciprofloxacina, a resistência é mediada primariamente pela ocorrência de mutações nos genes alvo deste antibiótico, o que pode mascarar a contribuição do efluxo neste fenótipo. Este estudo evidencia a relevância da resistência mediada por efluxo em estirpes clínicas de *S. pseudintermedius*, em particular a biocidas, o que pode comprometer a terapêutica a aplicar no controlo de infeções da pele e tecidos moles em animais de companhia.

Palavras-chave: *Staphylococcus pseudintermedius*, efluxo, biocidas, fluoroquinolonas, resistência, animais de companhia.

Abstract

Staphylococcus pseudintermedius is the main bacterial agent causing skin and soft tissue infections (SSTIs) in companion animals. The increasing resistance to antimicrobial compounds, associated with multidrug resistance phenotypes, poses a risk for the therapeutic control of skin infections caused by this pathogenic agent. Until now, efflux as a resistance mechanism has been overlooked for this species. The aim of this study was to evaluate the contribution of efflux to the reduced susceptibility to biocides and fluoroquinolones. The determination of cut-off values (CO_{WT}) allowed identifying a population of *S. pseudintermedius* with reduced susceptibility to the biocide tetraphenylphosphonium bromide (TPP). The efflux activity was characterized by two methods: determination of minimum inhibitory concentration and real time fluorometric assays. The use of both methodologies linked this reduced susceptibility phenotype to increased efflux activity. Regarding the fluoroquinolone ciprofloxacin, the resistance was shown to be primarily mediated by the presence of mutations in target genes, which may mask the contribution of efflux to this phenotype. This study highlights the relevance of efflux-mediated resistance in clinical strains of *S. pseudintermedius*, particularly to biocides, which could compromise the therapeutic approach for controlling SSTI infections in companion animals.

Keywords: *Staphylococcus pseudintermedius*, efflux, biocides, fluoroquinolones, resistance, companion animals.

Résumé

Staphylococcus pseudintermedius est le principal agent bactérien responsable des infections cutanées et des tissus mous (SSTI) chez les animaux de compagnie. La montée de la résistance aux composés antimicrobiens, associée à des phénotypes de multirésistance, constitue un risque pour le contrôle thérapeutique des infections cutanées causées par cet agent pathogène. Jusqu'à présent, l'efflux en tant que mécanisme de résistance a été négligé pour cette espèce. L'objectif de cette étude était d'évaluer la contribution de l'efflux à la susceptibilité réduite aux biocides et aux fluoroquinolones. La détermination des valeurs *cut-off* (CO_{WT}) a permis d'identifier une population de *S. pseudintermedius* présentant une susceptibilité réduite au biocide bromure de tétraphénylphosphonium (TPP). La caractérisation de l'activité d'efflux a été évaluée par deux méthodes: la détermination des concentrations minimales inhibitrices (CMI) et les essais de fluorométrie en temps réel. L'utilisation des deux méthodologies, ont permis de relier ce phénotype de susceptibilité réduite à une augmentation de l'activité de l'efflux. En ce qui concerne la ciprofloxacine, la résistance est principalement

mediée par des mutations dans les gènes cibles de cet antibiotique, ce qui peut masquer la contribution de l'efflux à ce phénotype. Cette étude met en évidence la pertinence de la résistance médiée par l'efflux dans les souches cliniques de *S. pseudintermedius*, en particulier aux biocides, ce qui pourrait compromettre l'approche thérapeutique pour contrôler les infections SSTI chez les animaux de compagnie.

Mots-clés: *Staphylococcus pseudintermedius*, efflux, biocides, fluoroquinolones, résistance, animaux de compagnie.

1. Introdução

Staphylococcus pseudintermedius é uma bactéria comensal da pele e mucosas de animais de companhia, encontrando-se com maior frequência em cães [1,2]. É também um agente patogénico oportunista, responsável por diversas infeções, destacando-se as infeções de pele e tecidos moles (SSTIs, *skin and soft tissue infections*) [3]. O tratamento recomendado para este tipo de infeções baseia-se no uso de terapêutica tópica e/ou sistémica [3], consoante a gravidade das lesões [4]. Estas infeções podem apresentar um carácter recorrente e prolongado [5], promovendo a seleção e disseminação de estirpes resistentes aos compostos antimicrobianos, limitando assim a terapia disponível para o tratamento destas infeções.

Nos últimos anos, tem-se vindo a observar, à semelhança de *Staphylococcus aureus*, a emergência de estirpes de *S. pseudintermedius* resistentes à metilina (MRSP, *methicillin resistant S. pseudintermedius*), que se caracterizam por serem resistentes a todos os beta-lactâmicos. As estirpes MRSP são frequentemente multirresistentes (MDR, *multidrug resistant*, ie, resistentes a três ou mais classes de antibióticos), tornando-se assim, um problema de saúde pública [6]. De forma a mitigar o escalar da resistência antimicrobiana, têm-se utilizado biocidas no tratamento tópico de SSTIs [4, 7].

A resposta bacteriana à exposição a agentes antimicrobianos, inclui frequentemente como primeiro mecanismo de defesa, a ativação e/ou sobreexpressão de sistemas de efluxo, o que pode resultar em fenótipos de multirresistência [8]. O efluxo como mecanismo de resistência a antimicrobianos, encon-

tra-se pouco caracterizado em *S. pseudintermedius*, quando comparado com *S. aureus* [8]. Em *S. pseudintermedius*, os sistemas de efluxo mais conhecidos são Qac/Smr e NorA. As bombas de efluxo Qac/Smr, codificadas por genes localizados em plasmídeos, estão associadas a suscetibilidade reduzida a biocidas [8, 9]. A bomba de efluxo NorA, codificada pelo gene cromossômico NorA, é capaz de efetuar a extrusão de diversos compostos químicos. Em *S. aureus*, NorA encontra-se extensivamente caracterizada, estando a sobreexpressão de NorA associada à suscetibilidade reduzida a biocidas e fluoroquinolonas [8, 10]. Em *S. pseudintermedius*, o papel de NorA encontra-se apenas parcialmente caracterizado [11–13] parecendo estar associado à resistência e/ou suscetibilidade reduzida aos mesmos agentes antimicrobianos que em *S. aureus* [13]. Apesar da relevância dos sistemas de efluxo na emergência de resistência aos compostos antimicrobianos e o impacto das estirpes MRSP-MDR num contexto Uma Só Saúde/*One Health*, a compreensão do papel do efluxo na resistência aos compostos antimicrobianos ainda é escassa em *S. pseudintermedius*.

O objetivo deste trabalho, detalhadamente descrito em Leal *et al.* [14], consistiu em analisar uma coleção de *S. pseudintermedius* provenientes de SSTIs em animais de companhia, com o intuito de avaliar qual a contribuição do efluxo na suscetibilidade reduzida a biocidas e resistência a fluoroquinolonas.

2. Materiais e métodos

Neste estudo analisou-se uma coleção de 155 estirpes de *S. pseudintermedius*, associadas a SSTI em animais de companhia (cães= 141, gatos= 3, coelho=1), proveniente da região de Lisboa, Portugal. Esta coleção foi previamente caracterizada por Moraes *et al.* [15]. A presença de atividade de efluxo aumentada foi avaliada por dois métodos; determinação de concentrações mínimas inibitórias (CMI) na presença/ausência de compostos conhecidos como inibidores de efluxo (IEs); e ensaios de fluorometria em tempo real. Determinaram-se as CMIs de três substratos de bombas de efluxo: brometo de etídio (EtBr), brometo de tetrafenilfosfônio (TPP) e ciprofloxacina (CIP), na ausência e presença dos inibidores de efluxo tioridazina (TZ) e verapamil (VER) (12,5 e 400 mg/L, respetivamente), pelo método de microdiluição [16]. Nos ensaios de fluo-

rometria em tempo real, foi avaliado o perfil de acumulação de EtBr das estirpes em estudo, utilizando concentrações crescentes de EtBr, na ausência e presença de glucose 0,4%, como descrito em Viveiros *et al.* [17].

As distribuições dos valores de CMI_{EtBr} e CMI_{TPP} foram utilizadas para estimar valores de *cut-off* (CO_{WT}) para estes compostos. Este parâmetro diferencia estirpes *wild type* (WT, sem mecanismos de resistência adquiridos fenotipicamente detetáveis) de estirpes *non-wild type* (NWT, com mecanismos de resistência adquiridos fenotipicamente detetáveis). Nas distribuições de CMIs, o CO_{WT} corresponde ao valor de CMI mais elevado apresentado pela população WT [18]. Os CO_{WT} foram estimados através do método iterativo estatístico, que se encontra disponível no programa ECOFFinder (http://www.eucast.org/mic_distributions_and_ecoffs/) [19].

As estirpes *S. pseudintermedius* DSM21284^T, *S. aureus* ATCC®25923TM e *S. aureus* ATCC25923_EtBr [20] foram utilizadas como controlo em todos os ensaios efetuados.

3. Resultados

3.1. Distribuição de CMIs para EtBr e TPP e identificação de populações *non-wild type* (NWT)

Os perfis de suscetibilidade para o EtBr e TPP foram avaliados através da determinação de CMIs para toda a coleção (n=155). As distribuições de CMI_{EtBr} e CMI_{TPP} foram utilizadas para estimar os valores de CO_{WT} , tendo-se obtido um CO_{WT} para as combinações *S. pseudintermedius*-EtBr e *S. pseudintermedius*-TPP de 4 e 16 mg/L, respetivamente.

A estimativa dos valores de CO_{WT} permitiu identificar uma população *non-wild type* para o TPP (TPP^{NWT}), cujas estirpes apresentaram valores de CMI superiores a 16 mg/L. Esta população NWT corresponde a 11,6% da coleção (18/155) e caracteriza-se por incluir maioritariamente estirpes MRSP com fenótipos de multirresistência. A identificação de uma população NWT para o TPP, sugere a presença de um mecanismo de resistência para este substrato, potencialmente associado a uma maior atividade de efluxo.

3.2. Caracterização da atividade de efluxo

O efeito dos inibidores de efluxo, TZ e VER, nos perfis de suscetibilidade ao EtBr e TPP foi avaliado para um subgrupo de estirpes de *S. pseudintermedius* (n=70), no qual se incluíram as estirpes da população TPP^{NWT}. Considerou-se efeito inibitório da atividade de efluxo, a redução da CMI para, pelo menos, ¼ do valor de CMI original, na presença dos inibidores [21].

Os dois inibidores de efluxo reduziram significativamente ($\geq 4x$) os valores de CMI_{EtBr} e CMI_{TPP} nas

duas populações (TPP^{WT} e TPP^{NWT}), em particular, o inibidor VER, que mostrou efeito para um maior número de estirpes. No entanto, o efeito dos inibidores de efluxo foi mais relevante na população TPP^{NWT}, reduzindo o valor de CMI para valores inferiores ao CO_{WT} (16 mg/L) [Figura 1A], indicando que na população TPP^{NWT}, a suscetibilidade reduzida ao TPP resulta de uma maior atividade de efluxo.

Os ensaios de fluorometria em tempo real [Figura 1B], permitiram comparar a atividade de efluxo nas populações TPP^{WT} e TPP^{NWT}.

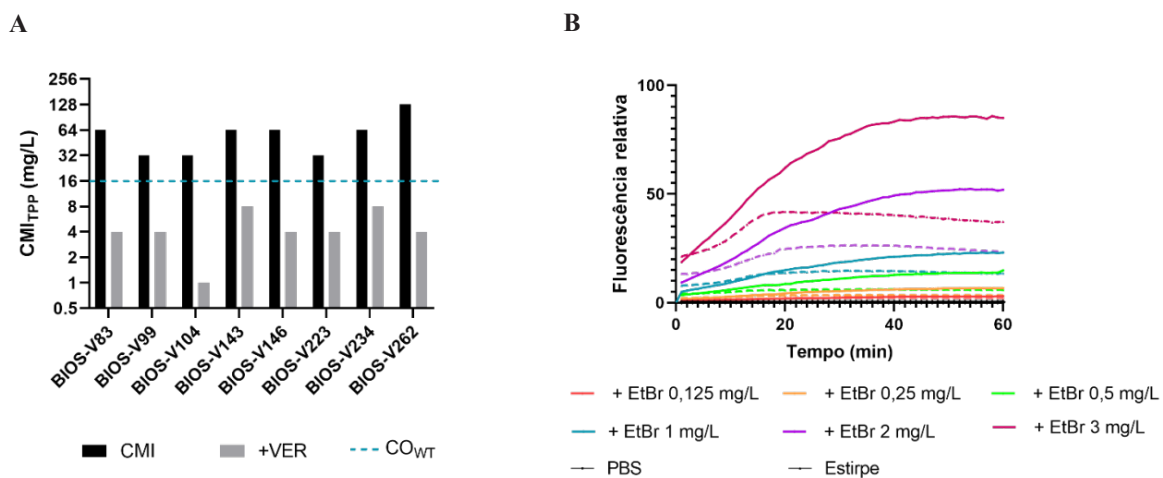


Figura 1: Caracterização da atividade de efluxo em estirpes clínicas de *S. pseudintermedius* pela (A) determinação de CMI_{TPP} na presença de verapamil e (B) ensaio de acumulação de EtBr por fluorometria em tempo real de uma estirpe da população TPP^{NWT}, na ausência (linhas contínuas) e presença de glicose a 0,4% (G) (linhas a tracejado)

As estirpes com atividade de efluxo basal (população TPP^{WT}), evidenciaram uma acumulação de EtBr proporcional ao aumento da concentração de EtBr.

Na ausência de glicose, as estirpes da população TPP^{NWT} têm perfis de acumulação similares às das estirpes com atividade de efluxo basal. Por outro lado, na presença de glicose, essencial para o funcionamento dos sistemas de efluxo, observou-se uma menor acumulação de EtBr. Como uma menor acumulação de EtBr é indicativa da extrusão desta molécula da célula, estes resultados sugerem que a população TPP^{NWT} apresenta uma maior atividade de efluxo, quando comparada com as estirpes da população TPP^{WT}.

3.3. Relação entre a atividade de efluxo e a resistência às fluoroquinolonas

Em *Staphylococcus*, a resistência às fluoroquinolonas

pode ser mediada por dois mecanismos; ocorrência de mutações nos genes alvo (*grlA/gyrA*) e/ou aumento da atividade de efluxo [22]. A resistência associada ao aumento de atividade de efluxo deve-se às bombas de efluxo MDR cromossômicas, como é o caso de NorA. A ativação de bombas MDR pode ser efetuada pela exposição a qualquer substrato utilizado por estas bombas de efluxo, traduzindo-se na resistência cruzada a todos os substratos, nos quais se incluem as fluoroquinolonas [8, 23].

Numa caracterização prévia desta coleção de *S. pseudintermedius*, verificou-se que 25% das estirpes apresentavam resistência às fluoroquinolonas, incluindo a ciprofloxacina [15]. A pesquisa de mutações nos genes alvo revelou que este era o principal mecanismo de resistência, uma vez que a presença de inibidores de efluxo não diminuiu o valor de CMI_{CIP} de forma significativa (reduções até 2x).

4. Discussão

A utilização de biocidas é frequentemente recomendada na terapêutica de SSTIs. Face à emergência de estirpes MRSP-MDR, é aconselhada a utilização exclusiva de biocidas em infecções causadas por estas estirpes [24], devido ao menor potencial de emergência de resistência a estes compostos que possa comprometer a sua elevada eficácia clínica [3, 4].

Porém, os resultados obtidos neste trabalho sugerem que a frequente utilização de biocidas pode promover a seleção de estirpes MRSP-MDR com suscetibilidade reduzida a estes compostos. Através da aplicação de dois métodos, verificou-se que a suscetibilidade reduzida ao biocida TPP é mediada pelo aumento da atividade de efluxo. O efluxo tem um papel fulcral no desenvolvimento de fenótipos de multiresistência [8, 20], e, por conseguinte, pode ter impacto na terapêutica de SSTIs em medicina veterinária.

A diminuição da suscetibilidade ao TPP, mediada por efluxo, pode ser multifatorial. A aplicação do TPP em ambiente clínico é maioritariamente focada na desinfeção de superfícies [25]. Uma desinfeção incorreta/deficiente de superfícies e objetos, com os quais os animais de companhia contactam, pode permitir a adaptação bacteriana a concentrações residuais (eventualmente sub-inibitórias) destes agentes antimicrobianos. Este evento pode induzir a ativação de bombas de efluxo MDR, que conferem uma suscetibilidade reduzida a biocidas e/ou resistência aos antibióticos, permitindo a sua disseminação [23]. De igual modo, uma incorreta utilização de biocidas no tratamento/desinfeção de SSTIs poderá levar a um resultado similar. Em *S. pseudintermedius*, já foi descrito o aumento dos valores de CMI para a clorexidina [26], um biocida frequentemente aplicado na terapêutica de SSTIs [4]. Apesar desta observação, este evento não é considerado clinicamente relevante na medicina veterinária, dado que as concentrações de uso deste biocida são muito superiores (até ~40.000x) a estes valores de CMI aumentados [26].

A resistência mediada por efluxo pode impactar igualmente na aplicação de antibioterapia em infecções mais severas causadas por *S. pseudintermedius* [4], nomeadamente quanto à utilização de fluoroquinolonas, por serem substratos de bombas de efluxo MDR. Embora esta classe de antibióticos seja recomendada como se-

gunda linha terapêutica em SSTIs [4], é frequentemente usada no tratamento destas infecções [27], contribuindo para os elevados níveis de resistência já verificados em *S. pseudintermedius* [15]. Os resultados obtidos evidenciam que em *S. pseudintermedius*, a resistência à ciprofloxacina é principalmente mediada pela presença de mutações, em particular, a dupla mutação GrlA:Ser80Ile/GyrA:Ser84Leu [15], que confere elevados níveis de resistência, tal como reportado por outros autores [28, 29]. Estes resultados são passíveis de extrapolação para outras fluoroquinolonas [28, 29], limitando a sua utilização em infecções causadas por *S. pseudintermedius*. Embora não estabelecida neste trabalho, a contribuição do efluxo para a resistência às fluoroquinolonas em *S. pseudintermedius* não deve ser excluída, uma vez que a presença de mutações nos genes alvo poderá mascarar o seu efeito.

5. Considerações finais

Este estudo evidencia a necessidade urgente da consciencialização e caracterização da atividade de efluxo como um mecanismo de emergência de resistência, particularmente a biocidas, em *S. pseudintermedius*. A contribuição do efluxo para a resistência a fluoroquinolonas é difícil de avaliar devido à frequente ocorrência de mutações em genes alvo, as quais conferem um nível de resistência elevado e estável. A utilização dos biocidas como estratégia alternativa ao escalar da resistência antimicrobiana na medicina veterinária, pode ser comprometida pela emergência de estirpes com suscetibilidade reduzida. Algumas das abordagens metodológicas descritas poderão ser utilizadas na vigilância da emergência de estirpes com suscetibilidade reduzida a biocidas comumente aplicados na terapêutica veterinária, contribuindo assim para uma deteção mais precoce do incremento da resistência antimicrobiana e um controlo mais eficaz das infecções causadas por este agente patogénico em animais de companhia.

Financiamento

Este trabalho foi suportado pelo projeto BIOSAFE, financiado pela FEDER, através do Programa Operacional Fatores de Competitividade—COMPETE e pela Fundação da Ciência e Tecnologia (FCT, Portugal), ref^a LISBOA-01-0145-FEDER-030713, PTDC/CAL-EST/30713/2017. Apoio adicional da FCT ao GHTM - UID/04413/2020, LA-REAL—LA/P/0117/2020, CII-SA (UID/CVT/00276/2020) e bolsas de doutoramento 2023.02437.BD (ML) e BD/151061/2021 (CM).

Aprovação por comité de ética

Não aplicável. Este estudo não envolveu a manipulação de animais de companhia; as estirpes de *S. pseudintermedius* estudadas foram recolhidas previamente por laboratórios de diagnóstico.

Conflitos de interesse

Os autores declaram que não existem conflitos de interesse relacionados com o presente artigo.

Bibliografia

- [1] Bhooshan S, Negi V, Khatri P. *Staphylococcus pseudintermedius*: an undocumented, emerging pathogen in humans. *GMS Hyg Infect Control*. 2020;15:1–11
- [2] Ripa L, Simón C, Ceballos S, Ortega C. *S. pseudintermedius* and *S. aureus* lineages with transmission ability circulate as causative agents of infections in pets for years. *BMC Vet Res*. 2021;17(42):1–10
- [3] Lynch SA, Helbig KJ. The Complex Diseases of *Staphylococcus pseudintermedius* in Canines: Where to Next? *Vet Sci*. 2021;8(1):1–19
- [4] Hillier A, Lloyd DH, Weese J, Blondeau J, Boothe D. Guidelines for the diagnosis and antimicrobial therapy of canine superficial bacterial folliculitis (Antimicrobial Guidelines Working Group of the International Society for Companion Animal Infectious Diseases). *Vet Dermatol*. 2014;25:163–e43
- [5] Bierowicz K, Miszczak M, Korzeniowska-Kowal A, Wzorek A, Plókarz D, Gaminian A. Epidemiology of *Staphylococcus pseudintermedius* in cats in Poland. *Sci Rep*. 2021 Sep;11(1):18898
- [6] Pomba C, Rantala M, Greko C, Baptiste KE, Catry B, van Duijkeren E, et al. Public health risk of antimicrobial resistance transfer from companion animals. *J Antimicrob Chemother*. 2017 Apr;72(4):957–68
- [7] Morris DO, Boston RC, O’Shea K, Rankin SC. The prevalence of carriage of methicillin-resistant staphylococci by veterinary dermatology practice staff and their respective pets. *Vet Dermatol*. 2010;21:400–7
- [8] Costa SS, Viveiros M, Amaral L, Couto I. Multidrug Efflux Pumps in *Staphylococcus aureus*: an Update. *Open Microbiol J*. 2013;7:59–71
- [9] Worthing KA, Marcus A, Abraham S, Trott DJ, Norris JM. *Qac* genes and biocide tolerance in clinical veterinary methicillin-resistant and methicillin-susceptible *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus pseudintermedius*. *Vet Microbiol*. 2018 Mar;216:153–8
- [10] DeMarco CE, Cushing LA, Frempong-Manso E, Seo SM, Jaravaza TAA, Kaatz GW. Efflux-related resistance to norfloxacin, dyes, and biocides in bloodstream isolates of *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob Agents Chemother*. 2007 Sep;51(9):3235–9
- [11] Gagetti P, Rosato RR, Rosato AE. *Staphylococcus pseudintermedius*’s PBP4 Is Directly Associated with the Dissociated Oxacillin and Cefoxitin Phenotype. *Antibiot (Basel, Switzerland)*. 2021 Oct;10(11)
- [12] Couto N, Belas A, Oliveira M, Almeida P, Clemente C, Pomba C. Comparative RNA-seq-Based Transcriptome Analysis of the Virulence Characteristics of Methicillin-Resistant and -Susceptible *Staphylococcus pseudintermedius* Strains Isolated from Small Animals. *Antimicrob Agents Chemother*. 2016 Feb;60(2):962–7
- [13] Rampacci E, Felicetti T, Pietrella D, Sabatini S, Passamonti F. Drug efflux transporters in *Staphylococcus pseudintermedius*: in silico prediction and characterization of resistance. *J Antimicrob Chemother*. 2022;77:3283–90
- [14] Leal M, Morais C, Ramos B, Pomba C, Abrantes P, Costa SS, et al. Exploring efflux as mechanism of reduced susceptibility towards biocides and fluoroquinolones in *Staphylococcus pseudintermedius*. *Animals*. 2023;13(7):1–20
- [15] Morais C, Costa SS, Leal M, Ramos B, Andrade M, Ferreira C, et al. Genetic diversity and antimicrobial resistance profiles of *Staphylococcus pseudintermedius* associated to skin and soft-tissue infections in companion animals in Lisbon, Portugal. *Front Microbiol*. 2023;14:1–15
- [16] European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST). Media Preparation for Disk Diffusion Testing and for Determination of MIC values by the Broth Microdilution Method, version 7.0. 2022
- [17] Viveiros M, Martins M, Couto I, Rodrigues L, Spengler G, Martins A. New Methods for the Identification of Efflux Mediated MDR Bacteria, Genetic Assessment of Regulators and Efflux Pump Constituents, Characterization of Efflux Systems and Screening for Inhibitors of Efflux Pumps. *Curr Drugs Targets*. 2008;9(9):760–78
- [18] European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST). Standard Operating Procedure. MIC distributions and the setting of epidemiological cutoff (ECOFF) values. Växjö; 2021
- [19] Turnidge J, Kahlmeter G, Kronvall G. Statistical characterisation of bacterial wild-type MIC value distributions and the determination of epidemiological cut-off values. *Clin Microbiol Infect*. 2006;12(5):418–25
- [20] Couto I, Costa SS, Viveiros M, Martins M, Amaral L. Efflux-mediated response of *Staphylococcus aureus* exposed to ethidium bromide. *J Antimicrob Chemother*. 2008 Sep;62(3):504–13
- [21] Martins M, McCusker M, Viveiros M, Couto I, Fanning S, Pagès JM. A Simple Method for Assessment of MDR Bacteria for Over-Expressed Efflux Pumps. *Open Microbiol J*. 2013;7(1):72–82
- [22] Kang M, Chae M, Yoon J, Lee S, Yoo J, Park H. Resistance to fluoroquinolones and methicillin in ophthalmic isolates of *Staphylococcus pseudintermedius* from companion animals. *Can Vet J La Rev vétérinaire Can*. 2014;55(7):678–82
- [23] Buffet-Bataillon S, Tattevin P, Maillard JY, Bonnaure-Mallet M, Jolivet-Gougeon A. Efflux pump induction by quaternary ammonium compounds and fluoroquinolone resistance in bacteria. *Future Microbiol*. 2016;11(1):81–92
- [24] Morris DO, Loeffler A, Davis MF, Guardabassi L, Weese JS. Recommendations for approaches to methicillin-resistant staphylococcal infections of small animals: diagnosis, therapeutic considerations and preventative measures.: Clinical Consensus Guidelines of the World Association for Veterinary Dermatology. *Vet Dermatol*. 2017 Jun;28(3):304–e69
- [25] Martín-Rodríguez AJ, Babarro JMF, Lahoz F, Sansón M, Martín VS, Norte M, et al. From broad-spectrum biocides to quorum sensing disruptors and mussel repellents: antifouling profile of alkyl triphenylphosphonium salts. *PLoS One*. 2015;10(4):e0123652
- [26] Frosini SM, Bond R, Rantala M, Grönthal T, Rankin SC, O’Shea K, et al. Genetic resistance determinants to fusidic acid and chlorhexidine in variably susceptible staphylococci from dogs. *BMC Microbiol*. 2019 Apr;19(1):81
- [27] Oliveira A, Devesa JSP, Hill PB, Silva V, Poeta P. Treatment of Selected Canine Dermatological Conditions in Portugal - A Research Survey. *J Vet Res*. 2018 Dec;62(4):563–70
- [28] Onuma K, Tanabe T, Sato H. Antimicrobial resistance of *Staphylococcus pseudintermedius* isolates from healthy dogs and dogs affected with pyoderma in Japan. *Vet Dermatol*. 2011;23:17–e5
- [29] Azzariti S, Bond R, Loeffler A, Zendri F, Timofte D, Chang YM, et al. Investigation of *In Vitro* Susceptibility and Resistance Mechanisms in Skin Pathogens: Perspectives for Fluoroquinolone Therapy in Canine Pyoderma. *Antibiot (Basel, Switzerland)*. 2022 Sep;11(9)