

UNIVERSIDADE FEDERAL DE JATAÍ (UFJ)  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS (ICA)  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOCÊNCIA ANIMAL (PPGBA)

**LUCAS ZAIDEN**

***STAPHYLOCOCCUS PSEUDINTERMEDIUS* EM CÃES  
COM PIODERMITE SUPERFICIAL: PERFIL DE  
VIRULÊNCIA E RESISTÊNCIA**

JATAÍ  
2024

LUCAS ZAIDEN

***STAPHYLOCOCCUS PSEUDINTERMEDIUS* EM CÃES  
COM PIODERMITE SUPERFICIAL: PERFIL DE  
VIRULÊNCIA E RESISTÊNCIA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biociência Animal do Instituto de Ciências Agrárias da Universidade Federal de Jataí (UFJ), como requisito para obtenção do título de Mestre em Biociência Animal.

**Área de concentração:** Saúde e Produção Animal

**Linha de pesquisa:** Morfofisiologia, Clínica e Cirurgia Animal

**Orientador:** Prof. Dr. Ariel Eurides Stella.

JATAÍ

2024

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor, através do Programa de Geração Automática do Sistema de Bibliotecas da UFJ.

Zaiden, Lucas  
Staphylococcus pseudintermedius em Cães com Piodermite Superficial : Perfil de Virulência e Resistência / Lucas Zaiden. - 2024. XLIII, 43 f.

Orientador: Prof. Dr. Ariel Eurides Stella.  
Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Jataí, Instituto de Ciências Agrárias, Jataí, Programa de Pós-Graduação em Biociência Animal, Jataí, 2024.  
Bibliografia. Anexos.  
Inclui abreviaturas, gráfico, tabelas.

1. dermatologia. 2. infecção. 3. medicina veterinária. 4. microbiologia. I. Stella, Ariel Eurides, orient. II. Título.

CDU 63



UNIVERSIDADE FEDERAL DE JATAÍ

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOCÊNCIA ANIMAL

## ATA DE DEFESA DE DISSERTAÇÃO

Ata nº 10 da sessão de Defesa de Dissertação de **Lucas Zaiden**, que confere o título de Mestre em **Biociência Animal**, na área de concentração em **Saúde e Produção Animal**.

Aos **dez** dias do mês de **maio** do ano de dois mil **vinte e quatro**, a partir das **14** horas, realizou-se a sessão pública de Defesa de Dissertação intitulada “ Staphylococcus pseudintermedius em cães com piodermite superficial: perfil de virulência e resistência.” Os trabalhos foram instalados pelo Orientador, Professor Doutor Ariel Eurides Stella (UFJ/PPGBA) com a participação dos demais membros da Banca Examinadora: Professora Doutora **Luma Tatiana Silva Castro (UFJ)**, membro titular externo; Professora Doutora **Mayara Bocchi Fernandes (UFJ)**, membro titular externo. Durante a arguição, os membros da banca **não fizeram** sugestão de alteração do título do trabalho. A Banca Examinadora reuniu-se em sessão secreta a fim de concluir o julgamento da Dissertação, tendo sido o candidato aprovado pelos seus membros. Proclamados os resultados pelo Professor Doutor **Ariel Eurides Stella (UFJ/PPGBA)**, Presidente da Banca Examinadora, foram encerrados os trabalhos e, para constar, lavrou-se a presente ata que é assinada pelos Membros da Banca Examinadora, aos **dez** dias do mês de **maio** do ano de dois mil e **vinte e quatro**.

## TÍTULO SUGERIDO PELA BANCA



Documento assinado eletronicamente por **ARIEL EURIDES STELLA, Orientador**, em 10/05/2024, às 16:31, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Mayara Bocchi Fernandes, Usuário Externo**, em 13/05/2024, às 09:36, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **LUMA TATIANA SILVA CASTRO, Professor do Magistério Superior**, em 14/05/2024, às 09:32, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site [https://sei.ufj.edu.br/sei/controlador\\_externo.php?acao=documento\\_conferir&id\\_orgao\\_acesso\\_externo=0](https://sei.ufj.edu.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0), informando o código verificador **0281410** e o código CRC **2C52C59D**.

## RESUMO

A piodermite superficial canina é uma doença bacteriana de pele frequentemente observada na clínica de pequenos animais. Ocorre de maneira secundária a fatores internos ou externos ao hospedeiro e, geralmente, requer antimicrobianos para o tratamento. Embora de baixo potencial zoonótico, essa dermatopatia pode afetar, de forma indireta, os seres humanos, gerando custos com tratamentos, necessidade de desenvolvimento de novas terapias e prescrição de antimicrobianos, o que pode favorecer o desenvolvimento de cepas resistentes. Nesse sentido, o presente estudo teve como objetivo investigar os fatores de virulência e resistência a antimicrobianos relacionados ao *Staphylococcus pseudintermedius* oriundo de cães com piodermite superficial. Assim, foram caracterizadas 29 cepas de *S. pseudintermedius* isoladas de cães com piodermite. Utilizou-se a técnica de reação em cadeia polimerase (PCR) para a investigação de genes relacionados a fatores de virulência e resistência. No geral, uma cepa foi positiva para o gene *mecA* (3,45%), uma para *blaZ* (3,45%), 26 para *icaA* (89,65%), 28 para *icaD* (96,55%), 23 para *SJET* (79,31%), 15 para *luk-F* (51,72%), 17 para *luk-S* (58,62%) e uma para *TEM* (3,45%). Além disso, foi realizado o teste de concentração inibitória mínima (MIC) para os antibióticos: oxacilina, vancomicina, clindamicina, penicilina, trimetoprima-sulfametoxazol e azitromicina. Este revelou 28 amostras (96,55%) resistentes a pelo menos um dos antibióticos testados e 16 amostras (55,17%) foram multirresistentes. Os antibióticos com mais cepas resistentes foram a oxacilina (86,21%), trimetoprima-sulfametoxazol (65,52%), penicilina (55,17%), azitromicina (41,38%) e clindamicina (13,80%). Os resultados desse estudo, além de caracterizar o *Staphylococcus pseudintermedius*, confirmam a importância de um monitoramento regular dessa bactéria, tendo em vista que esse microrganismo pode infectar o homem e transferir genes de resistência para outras bactérias.

**Palavras-chave:** dermatologia, infecção, medicina veterinária, microbiologia

## ABSTRACT

Canine superficial pyoderma is a bacterial skin disease frequently seen in small animal clinics. It occurs secondary to factors internal or external to the host and generally requires antimicrobials for treatment. Although it has low zoonotic potential, this dermatopathy can indirectly affect humans, generating treatment costs, the need to develop new therapies and prescribe antimicrobials, which can favor the development of resistant strains. In this sense, the present study aimed to investigate the virulence factors and antimicrobial resistance related to *Staphylococcus pseudintermedius* from dogs with superficial pyoderma. Thus, 29 strains of *S. pseudintermedius* isolated from dogs with pyoderma were characterized. The polymerase chain reaction (PCR) technique was used to investigate genes related to virulence and resistance factors. Overall, one strain was positive for the *mecA* gene (3.45%), one for *blaZ* (3.45%), 26 for *icaA* (89.65%), 28 for *icaD* (96.55%), 23 for *SIET* (79.31%), 15 for *luk-F* (51.72%), 17 for *luk-S* (58.62%) and one for *TEM* (3.45%). In addition, the minimum inhibitory concentration (MIC) test was performed for the antibiotics: oxacillin, vancomycin, clindamycin, penicillin, trimethoprim-sulfamethoxazole and azithromycin. This revealed 28 samples (96.55%) resistant to at least one of the antibiotics tested and 16 samples (55.17%) were multiresistant. The antibiotics with the most resistant strains were oxacillin (86.21%), trimethoprim-sulfamethoxazole (65.52%), penicillin (55.17%), azithromycin (41.38%) and clindamycin (13.80%). The results of this study, in addition to characterizing *Staphylococcus pseudintermedius*, confirm the importance of regular monitoring of this bacterium, considering that this microorganism can infect humans and transfer resistance genes to other bacteria.

**Key words:** dermatology, infection, veterinary medicine, microbiology

## SUMÁRIO

<b>LISTA DE ABREVIATURAS .....</b>	<b>VII</b>
<b>CAPÍTULO 1: INTRODUÇÃO GERAL .....</b>	<b>1</b>
1.1. Pele:.....	1
1.2. Piodermite Superficial Canina:.....	1
1.3. Antibióticos e Perfil de Resistência do <i>S. pseudintermedius</i> :.....	2
<b>CAPÍTULO 2: ARTIGO .....</b>	<b>8</b>
<b>1. INTRODUÇÃO .....</b>	<b>9</b>
<b>2. MATERIAL E MÉTODOS.....</b>	<b>11</b>
2.1. Obtenção das Amostras:.....	11
2.2. Extração de DNA: .....	11
2.3. Identificação Molecular: .....	12
2.4. Preparo dos Antibióticos para o Teste da Concentração Inibitória Mínima: ....	13
2.5. Obtenção do Inóculo para a o Teste da Concentração Inibitória Mínima: .....	13
2.6. Concentração Inibitória Mínima (MIC):.....	13
2.7. Análise Estatística: .....	14
<b>3. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....</b>	<b>15</b>
<b>4. DISCUSSÃO .....</b>	<b>18</b>
<b>5. CONCLUSÃO .....</b>	<b>22</b>
<b>6. REFERÊNCIAS</b>	
<b>ANEXO</b>	

**LISTA DE ABREVIATURAS**

<b>µL</b>	Microlitros;
<b>µg</b>	Microgramas;
<b>mL</b>	Mililitros;
<b>°C</b>	Graus Celsius;
<b>Az</b>	Azitromicina;
<b>Clin</b>	Clindamicina;
<b>CLSI</b>	Clinical & Laboratory Standards Institute;
<b>ESBL</b>	β-lactamases de espectro estendido;
<b>MIC</b>	Concentração Inibitória Mínima;
<b>MRSA</b>	<i>Staphylococcus aureus</i> Resistente à Meticilina;
<b>MRSP</b>	<i>Staphylococcus pseudintermedius</i> Resistentes à Meticilina;
<b>MSSP</b>	<i>Staphylococcus pseudintermedius</i> Suscetível à Meticilina;
<b>Oxa</b>	Oxacilina;
<b>PBP</b>	Proteínas de Ligação à Penicilina;
<b>PCR</b>	Reação em Cadeia da Polimerase;
<b>Pen</b>	Penicilina;
<b>Rpm</b>	Rotações por minuto;
<b>S+T</b>	Sulfametoxazol-Trimetoprim.

## **CAPÍTULO 1: INTRODUÇÃO GERAL**

### **1.1. Pele:**

A pele é comumente classificada como o maior órgão do corpo, sendo atribuída a ela inúmeras funções como: barreira física; sensações, por ser um órgão altamente vascularizado e innervado; secreção; síntese de vitamina D; dentre outros (Espadale and Santoro 2021). A pele também é uma interface com o ambiente externo e, como tal, é colonizada por uma coleção diversificada de microrganismos, como bactérias, fungos, vírus e ácaros, de modo a formar um verdadeiro ecossistema (Grice and Segre 2011).

Apesar da microbiota da pele variar de acordo com as características individuais do hospedeiro, a maioria desses microrganismos são comensais e atuam na proteção contra a invasão de organismos patogênicos ou prejudiciais. Além disso, participam diretamente na homeostase do sistema imunológico (Byrd et al. 2018; Zeeuwen et al. 2013).

À vista disso, a diminuição da biodiversidade do microbioma da pele e o aumento da presença de *Staphylococcus* sp. estão associados à indução de respostas inflamatórias exacerbadas e/ou função de barreira cutânea perturbada. Isso pode provocar crises clínicas de dermatite atópica (Marsella 2021; Zeeuwen et al. 2013).

### **1.2. Piodermite Superficial Canina:**

No que se refere à piodermite, a qual é definida como uma inflamação purulenta na pele, a maioria dos casos em cães envolve a infecção por bactérias residentes, em particular as do gênero *Staphylococcus* sp., que são comumente encontradas na pele e mucosa de indivíduos saudáveis. Essa afecção geralmente surge devido a uma doença sistêmica ou cutânea subjacente que torna o microambiente cutâneo favorável à proliferação e infecção bacteriana (Loeffler and Morris 2021).

Desse modo, é importante salientar que o tratamento da piodermite superficial canina varia de acordo com o caso, incluindo geralmente antibióticos sistêmicos e terapia tópica, além da investigação e tratamento de doenças subjacentes (Loeffler and Lhoyd 2018). Portanto, torna-se relevante o estudo mais

detalhado do principal agente envolvido dessa doença, assim como a monitoração de cepas resistentes circulantes.

Na espécie canina, o principal agente isolado nas piодermites é o *Staphylococcus pseudintermedius*. Esse agente também é encontrado na pele de cães saudáveis (Tang et al. 2020; Weese 2013), o que reforça a ideia de que a doença pode ser majoritariamente secundária a outro evento.

Dentre os fatores de risco para o desenvolvimento da doença, destacam-se as reações de hipersensibilidade, como a dermatite alérgica à saliva de pulgas e a dermatite atópica; reações a parasitas, especialmente *Demodex* spp.; infecção fúngica, sendo a dermatofitose mais comum; doenças endócrinas, como o hipotireoidismo e hiperadrenocorticismos; imunossupressão, podendo ser causada pela administração excessiva de corticoides; seborreia; e traumas físicos. Por fim, vale destacar que alguns casos em cães são idiopáticos (Rhodes and Werner 2018).

A piодermite superficial canina traz um evidente prejuízo à saúde e bem-estar do animal afetado. Além disso, é importante destacar os custos gerados com tratamento e, sobretudo, a preocupação do ponto de vista da saúde humana quanto ao uso de antibióticos, de forma a favorecer eventual desenvolvimento de cepas resistentes, com potencial de transmissão para outros animais, pessoas e ao ambiente (Klein et al. 2018; Loeffler and Morris 2021).

### **1.3. Antibióticos e Perfil de Resistência do *S. pseudintermedius*:**

Além dos crescentes relatos de seres humanos infectados com *S. pseudintermedius* (Moses et al. 2023), já é sabido que as bactérias também possuem capacidade de transferência de genes de resistência de forma horizontal, ou seja, adquirindo genes de outras células para si, sendo este um mecanismo majoritário para adaptação da bactéria (Heuer and Smalla 2007), o que torna ainda mais relevante os estudos nessa área.

De maneira geral, existem três estratégias pelas quais um patógeno pode desenvolver resistência a fármacos: transformar o alvo molecular do fármaco; produzir uma enzima que modifique ou destrua o fármaco; ou impedir o acesso do fármaco ao seu alvo, como por exemplo, ao lançar ativamente o fármaco para fora do patógeno (Alberts et al. 2017). Essas estratégias de resistência variam conforme a espécie bacteriana e o mecanismo de ação dos antibióticos.

Além disso, frequentemente, testes laboratoriais com amostras clínicas são realizados para identificar a resistência bacteriana. Tais testes se mostram importantes tanto no ponto de vista clínico, ao direcionar para o melhor protocolo terapêutico e evitar o uso de fármacos já resistentes; como do ponto de vista epidemiológico ao proporcionar a monitoração de cepas resistentes circulantes (Frey et al. 2022).

Vale destacar que a resistência antimicrobiana pode ser medida por testes fenotípicos, determinados pela técnica de difusão em disco ou pela concentração inibitória mínima (MIC), os quais utilizam pontos de corte para classificar a cepa testada como resistente, intermediária ou sensível a determinado antibiótico. Ainda, essa caracterização pode se dar por testes genotípicos como a técnica de reação em cadeia polimerase (PCR), a qual busca por genes de virulência e/ou resistência nas cepas testadas. Uma vez identificado o gene relacionado à resistência em uma cepa bacteriana, existe a possibilidade de esta expressar resistência fenotípica a tal antimicrobiano (CLSI 2024; Louie and Crockerill 2001).

Outrossim, a resistência aos antibióticos pode ocorrer tanto em ambientes hospitalares como comunitário. O surgimento de infecções nosocomiais ou associadas aos cuidados de saúde é um problema de saúde pública que ameaça a vida. Devido a isso, muitas estratégias são adotadas para controlar a resistência bacteriana, como a utilização de novas gerações de antibióticos, terapia combinada, substâncias naturais com propriedades antibacterianas e sistemas de administração de medicamentos direcionados (Khameneh et al. 2016). Tais abordagens se mostram necessárias, porém devem estar sempre aliadas ao uso racional dos antibióticos.

É importante ressaltar que cada classe antimicrobiana age de maneira diferente nos microrganismos, os quais podem, conseqüentemente, desenvolver resistência por meio de diferentes mecanismos (Ritter et al. 2020). Dessa forma, compreender essa relação farmacológica torna-se de grande importância para o entendimento da resistência bacteriana como um todo.

Além disso, alguns antibióticos devem ser considerados ao realizar os testes de resistência *in vitro*, visto que, dentre estes, existem os que são frequentemente recomendados para o tratamento sistêmico em cães acometidos com piodermite superficial canina (Hillier et al. 2014), de forma a contribuir com as pressões de seleção antimicrobiana. Ao lidar com testes primários e de rotina de cepas

estafilocócicas, existem agentes antimicrobianos apropriados a serem testados, e dentre eles, estão envolvidos a classe dos  $\beta$ -lactâmicos, macrolídeos, licosamidas, glicopeptídeos e sulfonamidas (CLSI 2024).

Em relação aos antibióticos  $\beta$ -lactâmicos, estes são representados principalmente pela meticilina, penicilina, oxacilina e ceftoxina. Seu mecanismo de ação consiste na ligação às proteínas de ligação à penicilina (PBP), as quais são essenciais para a biossíntese da parede celular. Por conseguinte, haverá inibição da formação de ligações cruzadas de peptidoglicano e lise celular bacteriana. A resistência a esse grupo está relacionada a mutações nas proteínas ligantes de penicilina ou à produção de enzimas  $\beta$ -lactamases, as quais agem degradando o anel  $\beta$ -lactâmico desses antibióticos (Paterson et al. 2014; Ritter et al. 2020).

Por outro lado, os principais macrolídeos são a eritromicina, a claritromicina e a azitromicina. Já o grupo das licosamidas é representado pela clidamicina e lincomicina (Ritter et al. 2020). Em ambas as classes o mecanismo de ação se dá de maneira similar, ao produzir uma inibição da síntese proteica bacteriana ao se ligar à subunidade ribossômica 50S no RNA dos organismos procaríotas. Ainda, o mecanismo de resistência mais comum a esses antibióticos está relacionado a uma modificação nesse ribossomo (Riviere and Papich, 2018).

Em contrapartida, a vancomicina faz parte do grupo dos glicopeptídeos. Seu mecanismo se dá pela inibição das etapas de transpeptidase e transglicosilase na síntese da parede celular bacteriana de bactérias gram-positivas, ao se ligar à d-alanil-d-alanina terminal do pentapeptídeo-tronco do peptidoglicano nascente, o qual é precursor da parede celular. Esse antibiótico é altamente ativo contra cocos Gram-positivos, enterococos, bem como *Neisseria* spp. Por ter atividade contra espécies de *Staphylococcus* resistentes à meticilina, incluindo *S. aureus* (MRSA) e *S. pseudintermedius* (MRSP) e *Enterococcus* resistentes a  $\beta$ -lactâmicos, seu uso é indispensável para o tratamento dessas infecções (Cong et al. 2019; Riviere and Papich 2018).

Outrossim, no Brasil, o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento reconhece os glicopeptídeos entre as classes que devem ser reservadas para uso humano, indo de acordo com as recomendações da Organização Mundial da Saúde (OMS) e da União Europeia. À vista disso, a vancomicina não apresenta registro em medicina veterinária no Brasil e seu uso deve ser extremamente controlado e desencorajado (MAPA 2022).

Não obstante, as sulfonamidas são antibióticos que, para agirem, dependem da necessidade de microrganismos sintetizarem ácido fólico como precursor de outras moléculas importantes na célula. Elas atuam como falsos substratos na síntese do ácido fólico. Frequentemente associa-se a esses antibióticos a trimetoprima ou o ormetoprim (diaminopirimidinas), que produzem um efeito sinérgico quando usados em conjunto com as sulfonamidas, inibindo a enzima diidrofolato redutase. São exemplos de sulfonamidas o sulfametoxazol, sulfadiazina e sulfadimetoxina (Papich 2021).

Um mecanismo de resistência bastante comum em estafilococos é a resistência aos antibióticos  $\beta$ -lactâmicos por meio da produção de penicilinases. Normalmente essas enzimas são codificadas pelo gene *bla* e transportadas em um plasmídeo. A penicilinase é uma enzima secretada que hidrolisa a penicilina e outros compostos suscetíveis à penicilinase em ácido penicilóico inativo (Que and Moreillon 2015).

Já se tratando da resistência à meticilina e oxacilina (antibióticos desenvolvidos como alternativa a penicilina), o principal mecanismo não é mediado pela penicilinase, mas por uma proteína ligante de penicilina (PBP2a) recém-adquirida, codificada pelo gene *mecA*. A PBP2a, uma proteína com baixa afinidade por antibióticos  $\beta$ -lactâmicos, confere resistência à meticilina, nafcilina, oxacilina e cefalosporinas. Vale ressaltar que a expressão do gene de resistência à meticilina pode ser controlada por outros componentes reguladores do gene *mec*, dentre eles o gene *blaZ*, que pode regular negativamente a transcrição de *mecA* (Opal and Vicas, 2015).

Ainda em relação aos antibióticos  $\beta$ -lactâmicos, outro aspecto importante a ser abordado é o conceito das  $\beta$ -lactamases de espectro estendido (ESBL), que são enzimas mediadas por plasmídeos e conferem resistência a penicilinas, cefalosporinas de espectro estreito e estendido, dentre outros grupos de antibióticos (Rahman et al. 2018). Essas enzimas podem ser divididas em diferentes tipos, dentre eles o TEM e CTX-M.

Diante disso, a melhor maneira de definir e identificar a presença de um gene de  $\beta$ -lactamase é por PCR e sequenciamento, que são métodos padrão para a determinação de genes específicos de  $\beta$ -lactamase em isolados bacterianos (Alfaresi and Elkoush 2010).

#### 1.4. Perfil de Virulência do *S. pseudintermedius* e Formação de Biofilmes:

A resistência aos antibióticos pode se dar também por características indiretas da relação fármaco-bactéria, como através da formação de biofilmes. Os biofilmes são comunidades sésseis de origem microbiana, caracterizadas por células que se ligam de forma irreversível a um substrato, interface ou umas às outras, estando justapostas em uma matriz de substâncias poliméricas extracelulares que produzem e exibem um fenótipo alterado em relação à taxa de crescimento e transcrição gênica (Donlan and Costerton 2002; Zhao et al. 2023).

A natureza da estrutura e os atributos fisiológicos dos organismos do biofilme conferem uma resistência inerente a agentes antimicrobianos, sejam eles antibióticos, desinfetantes ou germicidas (Donlan and Costerton 2002).

Dentre os mecanismos responsáveis pela resistência, tem-se a penetração retardada do agente antimicrobiano através da matriz do biofilme; a taxa de crescimento alterada de organismos; e outras alterações fisiológicas devido ao modo de crescimento do biofilme (Otto 2019).

Um elemento fundamental na via de produção de biofilme é o operon *ica* (do inglês “intercelular adhesion”), um agrupamento de genes identificados em diversas espécies de *Staphylococcus* sp., o qual codifica a produção de adesina polissacarídica intercelular (PIA), e promove a adesão intercelular de bactérias e o acúmulo de biofilme multicamada (Namvar et al. 2013).

Quanto ao gene *SIET* (*S. intermedius exfoliative toxin*), é proposto que está associado a uma toxina esfoliativa e que, presumidamente, é o agente causador da piodermite canina (Terauchi et al. 2003). Tal gene já foi detectado em outras espécies como *S. aureus* e *S. pseudintermedius*, havendo uma maior pronúncia do gene em cepas isoladas de infecções e feridas de pele e otite externa e (Lautz et al. 2006).

Ainda em relação aos genes de virulência, sabe-se que os estafilococos podem produzir a leucocidina *Panton-Valentine* (PVL), uma exotoxina formadora de poros, codificada por profago, e produzida através da interação de dois polipeptídeos distintos: *luk-F* e *luk-S* (bicomponente), os quais são subunidades proteicas (Kaneko and Kamio 2004).

No que tange a espécie humana, a PVL está associada a infecções de pele e tecidos moles e pneumonia necrosante grave em indivíduos saudáveis (Shallcross et al. 2013). Por outro lado, apesar de estudos em animais experimentais

demonstrarem o potencial de virulência desse gene, a prevalência em cães ainda é desconhecida (Kobayashi et al. 2011; Lipinska et al. 2011; Platenik et al. 2022). Devido a essas características, torna-se relevante a pesquisa desse gene em animais com infecção de pele.

**CAPÍTULO 2: ARTIGO*****Staphylococcus pseudintermedius* in dogs with superficial pyodermitis: virulence and resistance profile**Lucas Zaiden<sup>1</sup>; Ariel E. Stella<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Federal University of Jataí, Institute of Agricultural Sciences, Veterinary Microbiology Laboratory, Postgraduate Program in Animal Bioscience, Jataí – GO, Brazil, lzaiden@discente.ufj.edu.br

<sup>2</sup>Federal University of Jataí, Veterinary Microbiology Laboratory, Postgraduate Program in Animal Bioscience, Jataí – GO, Brazil, ariel\_stella@ufj.edu.br

**ABSTRACT**

Canine superficial pyoderma is a bacterial skin disease frequently seen in small animal clinics. It occurs secondary to factors internal or external to the host and generally requires antimicrobials for treatment. Although it has low zoonotic potential, this dermatopathy can indirectly affect humans, generating treatment costs, the need to develop new therapies and prescribe antimicrobials, which can favor the development of resistant strains. In this sense, the present study aimed to investigate the virulence factors and antimicrobial resistance related to *Staphylococcus pseudintermedius* from dogs with superficial pyoderma. Thus, 29 strains of *S. pseudintermedius* isolated from dogs with pyoderma were characterized. The polymerase chain reaction (PCR) technique was used to investigate genes related to virulence and resistance factors. Overall, one strain was positive for the *mecA* gene (3.45%), one for *blaZ* (3.45%), 26 for *icaA* (89.65%), 28 for *icaD* (96.55%), 23 for *SIET* (79.31%), 15 for *luk-F* (51.72%), 17 for *luk-S* (58.62%) and one for *TEM* (3.45%). In addition, the minimum inhibitory concentration (MIC) test was performed for the antibiotics: oxacillin, vancomycin, clindamycin, penicillin, trimethoprim-sulfamethoxazole and azithromycin. This revealed 28 samples (96.55%) resistant to at least one of the antibiotics tested and 16 samples (55.17%) were multiresistant. The antibiotics with the most resistant strains were oxacillin (86.21%), trimethoprim-sulfamethoxazole (65.52%), penicillin (55.17%), azithromycin (41.38%) and clindamycin (13.80%). The results of this study, in addition to characterizing *Staphylococcus pseudintermedius*, confirm the importance of regular monitoring of this bacterium, considering that this microorganism can infect humans and transfer resistance genes to other bacteria.

**Key words:** dermatology, infection, veterinary medicine, microbiology

## 1. INTRODUÇÃO

A piodermite é definida como uma inflamação purulenta na pele, envolvendo, na maioria das vezes, a infecção por bactérias residentes, em particular as do gênero *Staphylococcus sp.*, que são comumente encontradas na pele e mucosa de indivíduos saudáveis. Na espécie canina, o principal agente isolado nas piodermites é o *Staphylococcus pseudintermedius*, o qual também é encontrado na pele de cães saudáveis (Tang et al. 2020; Weese 2013).

Essa afecção geralmente surge devido a uma doença sistêmica ou cutânea subjacente que torna o microambiente cutâneo favorável à proliferação e infecção bacteriana (Loeffler and Morris 2021). À vista disso, a piodermite pode ser classificada de acordo com a camada de pele afetada, recebendo o nome de piodermite superficial quando a doença se restringe à epiderme, que é a camada mais externa da pele. Assim, à medida que avança para a derme, passa a ser chamada de piodermite profunda (Rhodes and Werner 2018).

Dentre os fatores de risco para o desenvolvimento da doença, destacam-se as reações de hipersensibilidade; infecção fúngica; doenças endócrinas; imunossupressão; seborreia; e traumas físicos. Por fim, vale destacar que alguns casos em cães são idiopáticos (Rhodes and Werner 2018).

Desse modo, é importante salientar que o tratamento da piodermite superficial canina varia de acordo com o caso, mas geralmente inclui antibióticos sistêmicos e terapia tópica, além da investigação e tratamento de doenças subjacentes (Miller et al. 2013).

No que se refere ao *S. pseudintermedius*, são os crescentes relatos de seres humanos infectados com esse microrganismo. Outro aspecto relevante é a capacidade de transferência de genes de resistência de forma horizontal entre as bactérias (Heuer and Smalla 2007; Moses et al. 2023), o que torna ainda mais relevante os estudos sobre o principal agente envolvido nessa doença, assim como a monitoração de cepas resistentes circulantes.

Dessa forma, além da piodermite superficial canina gerar um evidente prejuízo à saúde e bem-estar do animal afetado e ser caracterizada por uma das dermatopatias mais frequentes na veterinária (Loeffler and Morris 2021), é importante destacar a preocupação quanto ao potencial risco para a saúde pública. De modo que o uso de antibióticos pode favorecer eventual desenvolvimento de cepas resistentes, com capacidade de transmissão para outros animais, pessoas e ao ambiente (Klein et al. 2018).

Isto posto, é importante destacar que a utilização inadequada de antimicrobianos, tanto em humanos quanto em animais, é um fator que contribui para as pressões de seleção

antimicrobiana (Klein et al. 2018). Dessa forma, o entendimento acerca das características fenotípicas e genotípicas de bactérias presentes na pele dos animais são fundamentais para elucidar aspectos relacionados ao perfil de resistência dos isolados, além dos padrões de uso de antibióticos em animais.

Essas informações poderão viabilizar escolhas mais adequadas para as terapias antimicrobianas e uma melhor compreensão sobre o seu papel no desenvolvimento de resistência em bactérias. Nesse sentido, o presente estudo teve como objetivo investigar os fatores de virulência e resistência a antimicrobianos de *Staphylococcus pseudintermedius* oriundos de cães com piodermite superficial canina.

## **2. MATERIAL E MÉTODOS**

### **2.1. Obtenção das Amostras:**

O presente estudo foi realizado com 29 cepas de *Staphylococcus pseudintermedius* da bacterioteca do Laboratório de Microbiologia Veterinária da Universidade Federal de Jataí, provenientes de cães com piodermite superficial canina das regiões Central (Goiânia) e Sudoeste (Caiapônia, Jataí e Serranópolis) do estado de Goiás, no Centro-Oeste do Brasil. As amostras foram identificadas bioquimicamente por meio de cultura em manitol, coloração de Gram, teste de coagulase, teste de DNase, teste de fermentação de maltose, rafinose, sacarose, trealose e xilose, teste de Voges-Proskauer (VP), teste PYR (L-Pirrididonil- $\beta$ -naftilamida) e teste de resistência a polimixina B.

### **2.2. Extração de DNA:**

O procedimento de extração de DNA foi realizado através da lise térmica. Para tal, as cepas isoladas em cultura-estoque foram semeadas em Ágar Manitol e incubadas a 35°C durante 24 horas. Após o período de crescimento, foram repicadas em tubo contendo 3mL Caldo Nutriente a 35°C até atingirem o padrão 0,5 de McFarland. Em seguida, a solução foi homogeneizada, colocada em um microtubo de centrifugação de 1,5mL e submetida à centrifugação (5000 rpm) durante 4 minutos. Dessa forma, o sobrenadante formado foi descartado.

Posteriormente, realizou-se a lavagem/ressuspensão do pellet com 200 $\mu$ L de água destilada autoclavada agitada em vórtex e centrifugada. Logo após, o sobrenadante também foi descartado, assim como na etapa anterior.

Por fim, repetido três vezes esse mesmo processo, o pellet foi então ressuspendido e a solução colocada em banho seco à 95°C durante 10 minutos. Depois, centrifugou-se a amostra por 30 segundos a 5000 rpm. Assim, o sobrenadante gerado se tornou o material de interesse (DNA), sendo então transferido para um microtubo de 500 $\mu$ L e armazenado à -25°C.

### 2.3. Identificação Molecular:

Foi realizada Reação em Cadeia de Polimerase (*Polymerase Chain Reaction* – PCR) para os seguintes genes: *mecA*, *mecC*, *mecC* (LGA 251), *blaZ*, *icaA*, *icaD*, *SIET*, *luk-F*, *luk-S*, *TEM*, *CTX-M*. A técnica utilizada foi baseada nas referências da tabela 1. Para o preparo dos componentes utilizou-se 12,5 µL de TAQ *master mix*; 0,5µl de *primer F*; 0,5µl de *primer R* correspondente; 2,5µL de DNA e 9µL água nuclease-free de modo a completar 25µL de solução total. As amostras foram colocadas em um termociclador com seu ciclo variando conforme o gene buscado, até obter a amplificação do DNA previamente extraído.

Tabela 1: Genes de resistência e virulência investigados nos isolados de *S. pseudintermedius*

Genes	Função	Sequências (5'-3')	Amplicon Sizes pb	Referência
<i>mecA</i>	Resistência a Meticilina	AAAATCGATGGTAAAGGTTGGC AGTTCTGCAGTACCGGATTTGC	533	Neves et al. 2007
<i>blaZ</i>	Produção de beta-lactamase	TGACCACTTTTATCAGCAACC GCCATTTCAACACCTTCTTTC	700	Meroni et al. 2019
<i>icaA</i>	Produção de biofilme	ACTGTTTCGGGGACAAGCAT ATTGAGGCTGTAGGGCGTTG	134	Meroni et al. 2019
<i>icaD</i>	Produção de biofilme	ACTGTTTCGGGGACAAGCAT ATTGAGGCTGTAGGGCGTTG	166	Meroni et al. 2019
<i>SIET</i>	Produção de toxinas esfoliativas	ATGGAAAATTTAGCGGCATCTGG CCATTACTTTTCGCTTGTTGTGC	359	Meroni et al. 2019
<i>luk-F</i>	Produção de leucotoxina	CCTGTCTATGCCGCTAATCCA AGGTCATGGAAGCTATCTCGA	572	Meroni et al. 2019
<i>luk-S</i>	Produção de leucotoxina	TGTAAGCAGCAGAAAATGGGG GCCCGATAGGACTTCTTACAA	503	Meroni et al. 2019
<i>TEM</i>	Produção de beta-lactamase	TTGGGTGCACGAGTGGGTTA TAATTGTTGCCGGAAGCTA	465	Bajpai et al. 2017

Após o processo de amplificação, 15µL de cada amostra foram colocados em poços individuais no gel de agarose com brometo de etídio a 1,5%, em uma cuba contendo solução tampão de TBE (Tris-Borato-EDTA) na concentração de 1x e processados a 65V, durante uma hora e 30 minutos. Passado o tempo programado, o gel foi colocado sobre o transiluminador (luz ultravioleta), o qual tornou-se possível a visualização dos fragmentos.

#### 2.4. Preparo dos Antibióticos para o Teste da Concentração Inibitória Mínima:

Conforme as recomendações do Instituto de Padrões Clínicos e Laboratoriais – CLSI (2012), preparou-se uma solução padrão de cada um dos seguintes antibióticos: Azitromicina (AZ), Clindamicina (CLI), Oxacilina (OXA), Penicilina (PEN), Trimetoprima com Sulfametoxazol (S+T) e Vancomicina (VAN). Tal solução compreendia uma amostra com concentração superior à maior concentração a ser testada em pelo menos 10 vezes, com o intuito de facilitar a pesagem e manter um estoque.

Para o cálculo utilizou-se a seguinte fórmula:

$$\text{Peso (mg)} = \frac{\text{Volume (mL)} \times \text{Concentração } (\mu\text{g/mL})}{\text{Potência } (\mu\text{g/mg})}$$

Definiu-se como volume padrão 10mL. Após a pesagem, que foi feita em balança analítica calibrada, o volume foi então colocado em um tubo cônico e em seguida foi adicionado 10ml de solvente (água osmose reversa autoclavada).

#### 2.5. Obtenção do Inóculo para a o Teste da Concentração Inibitória Mínima:

Com o intuito de obter uma cultura fresca, cerca de 10 $\mu$ L da amostra bacteriana em cultura-estoque foi inoculada em Ágar Manitol. Após 24 horas em estufa à 35°C, selecionou-se quatro colônias isoladas, de tamanho uniforme e padrão, as quais foram, então, colocadas em tubo de ensaio contendo 4mL de Caldo Nutriente e incubadas à 35°C durante 6 horas. Tal procedimento permitiu obter uma turbidez padrão no caldo inoculado, equivalente à escala McFarland de, aproximadamente, 0,5 (1,5x10<sup>8</sup> bactérias por mL).

#### 2.6. Concentração Inibitória Mínima (MIC):

Para a obtenção da concentração inibitória mínima (*Minimum Inhibitory Concentration* - MIC) dos antibióticos, utilizou-se o método de microdiluição em Caldo Mueller-Hinton e placas de microtitulação ELISA com 96 poços.

As placas de ELISA foram preenchidas com 100 $\mu$ L de solução de caldo Mueller-Hinton em cada poço a ser testado. No primeiro poço de cada coluna foi adicionado 100 $\mu$ L de antibiótico oriundo da “solução padrão”, já ajustado para o dobro da maior concentração a ser testada naquele antibiótico. Com isso, obteve-se no primeiro poço um volume total de 200 $\mu$ L (100 $\mu$ L de caldo + 100 $\mu$ L de antibiótico), tornando a concentração do primeiro poço a máxima a ser pesquisada para aquele antibiótico.

A partir do primeiro poço, iniciou-se o processo de microdiluição, no qual 100µL do primeiro poço foram pipetados e repassados para o segundo poço. Em seguida, 100µL do segundo poço foram pipetados para o terceiro poço e assim por diante, até chegar ao décimo poço, em que se pipetou 100µl e os descartou, sem repassá-los ao 11º poço. Com isso, os poços da coluna de nº 11 e nº 12 não receberam antibióticos.

Após esse processo, em cada um dos poços, com exceção da coluna 12, foi adicionado 10µL da cepa a ser testada. Logo, o poço da coluna 11 correspondeu ao controle positivo e a coluna 12 ao controle negativo do teste. O teste foi realizado em triplicata e, após a adição das cepas, as placas foram incubadas em estufa à 35°C durante 24 horas. Passado esse tempo, procedeu-se com a leitura dos resultados.

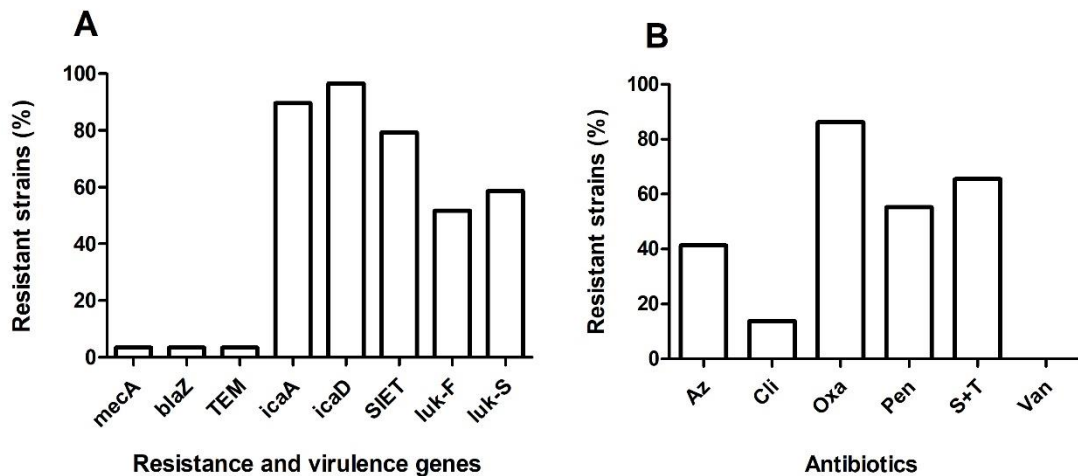
## **2.7. Análise Estatística:**

Os dados foram apresentados como estatística descritiva e as associações entre os genes de resistência e virulência e a concentração inibitória mínima dos antibióticos foram analisadas pelo teste Qui-quadrado, adotando-se o índice de significância mínimo de  $p < 0,05$ . Para a análise dos dados e elaboração das figuras, foi utilizado o programa estatístico GraphPad Prism 5.0.

### 3. RESULTADOS

#### 3.1. Reação em Cadeia da Polimerase – PCR:

Das 29 cepas de *S. pseudintermedius* isoladas de cães diagnosticados com piodermite superficial e analisadas pela técnica de PCR, foram observadas a presença dos seguintes genes de resistência: uma cepa positiva para o gene *mecA* (3,45%), uma positiva para o gene *blaZ* (3,45%) e uma para o gene *TEM* (3,45%) (Figura 1A).



**Figure 1.** Resistance and virulence profile of *S. pseudintermedius*. A – Percentage of strains positive for the production of resistance and virulence genes. B – Percentage of strains resistant to the antibiotics tested. Az = Azithromycin; Cli = Clindamycin; Oxa = Oxacillin; Pen = Penicillin; S+T = Sulfamethoxazole with Trimethoprim; Van = Vancomycin.

Com relação aos genes de virulência, o presente estudo observou uma alta prevalência tanto de cepas produtoras de leucocidina (PVL), quanto de biofilme e de toxinas esfoliativas (Figura 1A). Assim, dentre os genes relacionados com a produção de PVL, detectou-se 15 amostras positivas para *luk-F* (51,72%) e 17 para *luk-S* (58,62%), sendo 8 amostras (27,60%) positivas para os dois genes concomitantes. Desse modo, 24 cepas foram positivas para pelo menos um dos genes precursores da produção de PVL (82,76%).

Por outro lado, a verificação dos genes relacionados à produção de biofilmes atestou que 26 cepas foram positivas para o gene *icaA* (89,66%) e 28 para o gene *icaD* (96,55%), totalizando 26 isolados positivos para os dois genes simultâneos (89,66%) e apenas uma amostra negativa para os dois genes concomitantes, o que fez dos genes relacionados à produção de biofilme os mais prevalentes dos testados. Além disso, o gene *SIET*, relacionado com a produção de toxinas esfoliativas foi positivo em 23 cepas (79,3%).

### 3.2. Concentração Inibitória Mínima – MIC:

No que se refere à análise da MIC, as cepas verificadas apresentaram resistência para os seguintes antibióticos testados: oxacilina (n = 25; 86,21%), sulfametoxazol com trimetoprima (n = 19; 65,52%), penicilina (n = 16; 55,17%), azitromicina (n = 12; 41,38%) e clindamicina (n = 4; 13,80%), conforme demonstrado na Figura 1B. Por outro lado, nenhuma cepa apresentou resistência à vancomicina.

Além disso, das 29 cepas testadas, uma (3,45%) foi sensível a todos os antibióticos, enquanto 28 (96,55%) foram resistentes a pelo menos um antibiótico. Destas, 5 (1,45%) foram resistentes a dois antibióticos e 16 (55,17%) resistentes a três ou mais antibióticos e sendo classificados como multirresistentes.

Com relação aos testes de associação, a presença dos genes de resistência *mecA* e *blaZ* foram associados com a resistência à clindamicina (p = 0,011;  $\chi^2 = 6,473$ ) e à oxacilina (p = 0,011;  $\chi^2 = 6,473$ ), respectivamente (Tabela 1). Já com relação aos genes de virulência, houve uma associação entre a resistência à clindamicina e a presença dos genes *icaA* (p = 0,005;  $\chi^2 = 7,867$ ) e *icaD* (p = 0,011;  $\chi^2 = 6,473$ ), demonstrados na Tabela 2. Também houve uma associação entre a resistência a esse antibiótico e presença do gene *luk-S* (p = 0,010;  $\chi^2 = 6,573$ ).

**Table 1:** Association between the presence of resistance genes and the minimum inhibitory concentration.

	<i>mecA</i>			<i>blaZ</i>			<i>TEM</i>		
	Negative n (%)	Positive n (%)	<b>p</b>	Negative n (%)	Positive n (%)	<b>p</b>	Negative n (%)	Positive n (%)	<b>p</b>
<b>Az</b>									
S	17 (100,0)	11 (91,7)	0,226	16 (94,1)	12 (100,0)	0,393	17 (100,0)	11 (91,7)	0,226
R	0 (0,0)	1 (8,3)		1 (5,9)	0 (0,0)		0 (0,0)	1 (8,3)	
<b>Cli</b>									
S	25 (100,0)	3 (75,0)	<b>0,011</b>	24 (96,0)	4 (100,0)	0,684	24 (96,0)	4 (100,0)	0,684
R	0 (0,0)	1 (25,0)		1 (4,0)	0 (0,0)		1 (4,0)	0 (0,0)	
<b>Oxa</b>									
S	4 (100,0)	24 (96,0)	0,684	3 (75,0)	25 (100,0)	<b>0,011</b>	4 (100,0)	24 (96,0)	0,684
R	0 (0,0)	1 (4,0)		1 (25,0)	0 (0,0)		0 (0,0)	1 (4,0)	
<b>Pen</b>									
S	13 (100,0)	15 (93,8)	0,359	13 (100,0)	15 (93,8)	0,359	13 (100,0)	15 (93,8)	0,359
R	0 (0,0)	1 (6,2)		0 (0,0)	1 (6,2)		0 (0,0)	1 (6,2)	
<b>S+T</b>									
S	10 (100,0)	18 (94,7)	0,460	10 (100,0)	18 (94,7)	0,460	10 (100,0)	18 (94,7)	0,460
R	0 (0,0)	1 (5,3)		0 (0,0)	1 (5,3)		0 (0,0)	1 (5,3)	

**Legend:** Az = Azithromycin; Cli = Clindamycin; Oxa = Oxacillin; Pen = Penicillin; S+T = Sulfamethoxazole with Trimethoprim; S = Sensitive; R = Resistant.

**Table 2:** Association between the presence of virulence genes and the minimum inhibitory concentration.

	<i>icaA</i>		<b>p</b>	<i>icaD</i>		<b>p</b>	<i>SIET</i>		<b>p</b>	<i>luk-F</i>		<b>p</b>	<i>luk-S</i>		<b>p</b>
	Negative n (%)	Positive n (%)		Negative n (%)	Positive n (%)		Negative n (%)	Positive n (%)		Negative n (%)	Positive n (%)		Negative n (%)	Positive n (%)	
<b>Az</b>															
S	1 (94,1)	2 (16,6)		0 (0,0)	1 (8,3)		4 (23,5)	2 (16,6)		9 (53,0)	5 (58,4)		6 (35,3)	6 (50,0)	
R	16 (5,9)	10 (83,4)	0,348	17 (100,0)	11 (91,7)	0,226	13 (76,5)	10 (83,4)	0,653	8 (47,0)	7 (41,6)	0,550	11 (64,7)	6 (50,0)	0,428
<b>Cli</b>															
S	1 (4,0)	2 (50,0)		0 (0,0)	1 (25,0)		5 (20,0)	1 (25,0)		12 (48,0)	2 (50,0)		8 (32,0)	4 (100,0)	
R	24 (96,0)	2 (50,0)	<b>0,005</b>	25 (100,0)	3 (75,0)	<b>0,011</b>	20 (80,0)	3 (75,0)	0,819	13 (52,0)	2 (50,0)	0,941	17 (68,0)	0 (0,0)	<b>0,010</b>
<b>Oxa</b>															
S	0 (0,0)	3 (12,0)		0 (0,0)	1 (4,0)		0 (0,0)	6 (24,0)		1 (25,0)	13 (52,0)		3 (75,0)	9 (36,0)	
R	4 (100,0)	22 (88,0)	0,464	4 (100,0)	24 (96,0)	0,684	4 (100,0)	19 (76,0)	0,271	3 (75,0)	12 (48,0)	0,316	1 (25,0)	16 (64,0)	0,141
<b>Pen</b>															
S	1 (7,7)	2 (12,5)		1 (7,7)	0 (0,0)		4 (30,8)	2 (12,5)		8 (61,5)	6 (37,5)		5 (38,5)	7 (43,7)	
R	12 (92,3)	14 (87,5)	0,672	12 (92,3)	16 (100,0)	0,259	9 (69,2)	14 (87,5)	0,227	5 (38,5)	10 (62,5)	0,198	8 (61,5)	9 (56,3)	0,774
<b>S+T</b>															
S	1 (10,0)	2 (10,5)		1 (10,0)	0 (0,0)		3 (30,0)	3 (15,8)	0,369	6 (60,0)	8 (42,1)		4 (40,0)	8 (42,1)	
R	9 (90,0)	17 (89,5)	0,965	9 (90,0)	19 (100,0)	0,161	7 (70,0)	16 (84,2)		4 (40,0)	11 (57,9)	0,359	6 (60,0)	11 (57,9)	0,913

**Legend:** Az = Azithromycin; Cli = Clindamycin; Oxa = Oxacillin; Pen = Penicillin; S+T = Sulfamethoxazole with Trimethoprim; S = Sensitive; R = Resistant.

#### 4. DISCUSSÃO

De acordo com Bardiau et al. (2013) e Somayaji et al. (2016), o *Staphylococcus pseudintermedius* é uma das bactérias envolvidas em infecções de pele, principalmente em cães e gatos, além de haver risco de transmissão dessa espécie entre animais e um potencial zoonótico. Essas constatações comprovam que esse agente deve ser investigado, com o intuito de obter informações específicas sobre esse patógeno e o seu potencial risco para a saúde pública. Dito isto, o presente estudo apresentou a caracterização do perfil de virulência e resistência do *Staphylococcus pseudintermedius* na região Centro-Oeste do Brasil.

No que concerne a pesquisa de resistência, 86,21% das cepas apresentaram resistência à oxacilina, fazendo desse o antibiótico com maior número de cepas resistentes no estudo. Essa observação é significativa, pois a oxacilina pertence ao grupo de penicilinas resistentes à  $\beta$ -lactamase e penicilinase e a presença fenotípica de isolados resistentes é descrita como estafilococos resistentes à meticilina (MRS). Conseqüentemente, tal resultado pode ser aplicado a outras penicilinas estáveis à penicilinase, como a cloxacilina, dicloxacilina, nafcilina e meticilina (CLSI 2024).

A maior parte da resistência à oxacilina é mediada por *mecA*, que codifica PBP2a, e os testes para *mecA* e PBP2a são os mais definitivos para a detecção de resistência à oxacilina para *Staphylococcus* spp (CLSI 2024). Apesar disso, essa pesquisa detectou apenas uma cepa positiva para o gene *mecA* pela análise da PCR.

Segundo os critérios de uma meta-análise realizada por Moodley et al. (2014), o termo considerado para cepas fenotipicamente resistentes, mas que não expressaram o gene *mecA* foi MSSP (methicillin susceptible *Staphylococcus pseudintermedius*). Dessa forma, obteve-se, nesse estudo, apenas uma cepa MRS (3,45%) e outras 24 cepas MSSP (82,75%). Foi detectado também, no teste fenotípico, resistência de 55,17% das cepas (n = 16) à penicilina, sendo a maior parte destas (n = 13; 81,25%) resistentes concomitantemente à oxacilina.

Ainda referente ao estudo de revisão de Moodley et al. (2014), foi detectado uma tendência crescente significativa, ao longo do tempo (estudos de 1980 a 2013), de resistência às penicilinas lábeis à penicilinase nas cepas MSSP. Esse fato decorreu, provavelmente, devido ao resultado da disseminação do gene *blaZ*, o qual é responsável pela produção de enzimas  $\beta$ -lactamases de espectro estreito que atuam degradando o antimicrobiano (Kadlec and Schwarz 2012). Todavia, na atual pesquisa, apenas uma cepa resistente à penicilina apresentou-se positiva para o gene *blaZ*.

Ainda em relação aos antibióticos  $\beta$ -lactâmicos, outro aspecto importante a ser abordado é o conceito das  $\beta$ -lactamases de espectro estendido (ESBL), que são enzimas mediadas por plasmídeos e que conferem resistência a penicilinas, cefalosporinas de espectro estreito e estendido, dentre outros grupos de antibióticos (Rahman et al. 2018). Neste estudo foi pesquisado o gene *TEM*, pertencente às ESBL, e apenas uma cepa mostrou-se positiva.

Vale ressaltar que, apesar da resistência bacteriana poder ser verificada tanto por testes fenotípicos quanto por testes genotípicos, este último, segundo Shawky et al. (2021), é uma análise superior ao primeiro por poder prever a existência de resistência bacteriana no futuro. Contudo, o atual estudo apresentou resultados divergentes à suposta superioridade da ferramenta genotípica para a detecção da resistência bacteriana, tendo em vista que ao invés de prever cepas ainda não fenotipicamente resistentes, a PCR não detectou aquelas já fenotipicamente resistentes.

Em síntese, nesse estudo foi verificado que 96,55% das cepas apresentaram resistência fenotípica a pelo menos um dos antibióticos  $\beta$ -lactâmicos testados (cefotina e/ou penicilina), porém, apenas 10,34% apresentaram-se positivas a um gene relacionado a essa resistência (*MecA* ou *BlaZ* ou *TEM*). Outro aspecto importante é que a resistência nesses isolados pode ser consequência de outros mecanismos que não foram abordados nessa pesquisa, bem como pode ter ocorrido baixa sensibilidade nos métodos utilizados para detecção de genes determinantes de resistência.

Ainda, a despeito da oxacilina, apesar desta pertencer a um grupo de penicilinas resistentes à  $\beta$ -lactamase e penicilinase, no presente estudo a penicilina mostrou-se mais eficaz comparativamente. Dessa forma, o considerável número de cepas sensíveis à penicilina evidencia possíveis casos de animais que ainda poderiam se beneficiar com esse antibiótico, sem a necessidade de indicação de tratamentos com medicamentos de última geração. Isso ratifica o fato de que cada tratamento é particular para cada indivíduo e que os testes de sensibilidade antimicrobiana *in vitro* são cruciais, de modo a viabilizar os antibióticos mais restritos para os casos de comprovada resistência.

Foi notável também que a combinação trimetoprima com sulfametoxazol (T+S) apresentou o segundo maior número de cepas resistentes (65,52%). Esses dados são de grande valia, tendo em vista que a união destes compostos é comumente considerada como antibiótico de primeira escolha para piodermites caninas superficiais e profundas, após a realização de testes de suscetibilidade, além de ser recomendada para uso empírico em casos que não são realizados testes de suscetibilidade (Loeffler and Morris 2021).

Com base nesse estudo, o uso empírico de T+S se mostraria ineficiente. Isto pode ser devido a diversos fatores. Dentre eles, destaca-se o fato de que os *guidelines* e recomendações frequentemente baseiam-se em estudos em seus países de origem, de modo que essa diferença geográfica possa contribuir com a diversidade de cepas. Outra possibilidade é que justamente pelo seu uso empírico tenha-se forçado a resistência do microrganismo frente a esse antibiótico.

Em contrapartida, todas as cepas foram sensíveis à vancomicina. Por ter atividade contra espécies de *Staphylococcus* resistentes à meticilina, incluindo *S. aureus* (MRSA) e *S. pseudintermedius* (MRSP) e *Enterococcus* resistentes a  $\beta$ -lactâmicos, seu uso é indispensável para o tratamento dessas infecções (Cong et al. 2019; Riviere and Papich 2018). Dessa forma, o uso da vancomicina é restrito para infecções graves em humanos e ainda não há registro em medicina veterinária no Brasil (MAPA 2022), o que torna difícil o seu acesso e, consequentemente, possa ter corroborado com esse resultado.

Cabe ressaltar, que apesar do uso não legalizado na veterinária, ainda é importante o monitoramento da resistência desse antibiótico em animais, tendo em vista que a relação de proximidade dos humanos e animais domésticos, dentre outros fatores, pode contribuir para o desenvolvimento de resistência mesmo em animais nunca submetidos a tratamento com tal princípio. Portanto o monitoramento das bactérias frente a esse antibiótico é de suma importância para saúde pública, pois essa classe de antibióticos fica resguardada para os casos de infecções graves em humanos, o que faz desse um exemplo de como a saúde única é um conceito importante de ser entendido e seguido.

Por outro lado, no que diz respeito aos genes relacionados à produção de biofilmes, apesar destes não estarem diretamente relacionados à resistência, a capacidade do *S. pseudintermedius* gerar uma matriz celular pode causar um impacto direto nos tratamentos, visto que possa haver antibióticos, tópicos ou sistêmicos, que serão incapazes de se ligar ao microrganismo devido a presença do biofilme, mesmo que estes sejam eficazes nos testes *in vitro*. Em contraste a esse fato, o gene *Ica*, o qual está relacionado à produção de biofilmes, foi o gene com maior prevalência no atual estudo (89,66% cepas positivas para *IcaA* e *IcaD*).

Levando em conta a formação de biofilmes, no caso das piодermites, é importante ressaltar a possibilidade da terapia tópica e suas vantagens em relação à terapia sistêmica, principalmente no que concerne a possibilidade de remoção mecânica de crostas, resíduos e bactérias da pele, independentemente do princípio ativo utilizado (Miller et al. 2013), o que possibilita também a administração de agentes tópicos não antibióticos. Consequentemente, essa terapia tópica pode reduzir tanto o uso de antibióticos sistêmicos como de tópicos.

Outro gene de virulência detectado neste estudo foi o *SIET*, com 79,31% cepas positivas. Tal dado se mostrou relevante devido a estreita relação do gene com a manifestação clínica da piodermite (Terauchi et al. 2003). Estudos anteriores já propuseram que a PCR específica para *SIET* poderia ser usada para investigar *S. intermedius* (presumidamente *S. pseudintermedius*) quanto ao potencial toxinogênico, fornecendo informações sobre o papel que essa toxina desempenha em infecções de cães ou outras espécies animais (Lautz et al. 2006).

De maneira similar, um estudo na Coreia do Sul detectou uma prevalência de 96,55% do gene *SIET* em *S. pseudintermedius* obtidos de 29 cães, e indicou o papel do *SIET* na patogênese da piodermite recorrente, além de propor que, com ressalvas, que a presença de animais conviventes pode aumentar o risco da presença de estafilococos resistentes à meticilina (Han et al. 2016). Tendo em vista que o *S. pseudintermedius* é uma bactéria comensal da pele de cães e que todos os animais deste estudo eram acometidos com piodermite, novos estudos incluindo amostras de animais saudáveis poderiam trazer dados da relação da expressão desse gene com a doença clínica.

Ainda em relação aos genes de virulência, sabe-se que os estafilococos podem produzir a leucocidina Pantón-Valentine (*PVL*), uma exotoxina formadora de poros, codificada por prófago. Essa exotoxina é produzida através da interação de dois polipeptídeos distintos: *luk-F* e *luk-S* (bicomponente), os quais são subunidades proteicas analisadas pela PCR (Xia and Wolz 2014).

No que tange a espécie humana, a *PVL* está associada a infecções de pele e tecidos moles e pneumonia necrosante grave em indivíduos saudáveis (Shallcross et al. 2013). Além disso, existem também estudos em animais experimentais que demonstram o potencial de virulência desse gene (Kobayashi et al. 2011; Lipinska et al. 2011). Devido a essas características, torna-se relevante a pesquisa desse gene em animais com infecção de pele.

Evidenciou-se, neste estudo, que 51,72% das cepas foram positivas para *luk-F* e 58,62% para *luk-S*, sendo que 27,60% foram positivas para os dois genes concomitantes. Com isso, obteve-se 80% das amostras positivas para, pelo menos, um dos genes precursores da produção de *PVL*.

Indo de encontro aos resultados desse estudo, dois outros trabalhos que investigaram os genes *PVL* em isolados de cães com dermatite, realizados nos Estados Unidos da América (Platenik et al. 2022) e no Japão (Bardiau et al. 2013) encontraram, respectivamente, um isolado (0,4%) positivo para o gene *PVL* dentre 232 isolados clínicos de *S. pseudintermedius*; e nenhum isolado (0%) dentre 178 amostras de *S. pseudintermedius*.

O número de isolados positivos encontrados na atual pesquisa superou em muito o dos estudos citados, apesar do tamanho das amostras ser inferior. Uma das possíveis explicações para tal discrepância nos resultados se dá justamente na diferença geográfica dos animais do estudo, pois sabe-se que cada localização tem um ambiente próprio, com condições climáticas diferentes, além de uma história própria. Estudos similares a esse, em maiores escalas e por mais regiões proporcionaria um panorama mais amplo desse gene em cães no país.

Logo, o evidente aumento da resistência à meticilina em *S. pseudintermedius* e a capacidade de transferência de genes de resistência antimicrobiana entre as espécies estafilocócicas podem provocar complicações no tratamento de infecções, levando à recorrência da doença (Somayaji et al. 2016; Bardiau et al. 2013).

## 5. CONCLUSÃO

Destaca-se, dos resultados, a alta prevalência de cepas *Staphylococcus pseudintermedius* produtoras dos genes que codificam a leucocidina Panton-Valentine (*PVL*), de biofilme e de toxinas esfoliativas isoladas de cães com piodermite superficial. Dessa forma, cepas capazes de formar biofilme e com potencial de virulência contribuem com a persistência e dispersão de características de resistências. Por outro lado, para os genes relacionados à resistência aos  $\beta$ -lactâmicos, obteve-se poucas amostras positivas quando comparado ao resultado fenotípico. Esse resultado pode indicar que a resistência nesses isolados foi mediada por outros genes que não aqueles pesquisados.

Em relação à sensibilidade antimicrobiana, as cepas desse estudo apresentaram um forte perfil de resistência aos antibióticos comumente utilizados. Além disso, foram detectados relevantes graus de resistência a pelo menos um antibiótico e isolados multirresistentes. Esse fato reforça a necessidade da realização do antibiograma para monitoramento da eficácia dos agentes antimicrobianos para cada protocolo de tratamento.

Por fim, os dados produzidos neste estudo alertam sobre a necessidade de monitoramento das cepas de importância na saúde única, visando reduzir a disseminação de resistência e virulência das cepas nos animais e, conseqüentemente, nos humanos. Visto que a relação de proximidade dos seres humanos com os animais domésticos é cada vez maior, a presença de resistências a antimicrobianos em animais pode representar um risco potencial, em termos de transferência de genes de resistência, e este deve ser constantemente monitorado. Logo, mais estudos são essenciais para permitir um maior entendimento e monitoramento das bactérias envolvidas nesses processos infecciosos.

## 6. REFERÊNCIAS

- Alberts B, Johnson A, Lewis J, Morgan D, Raff M, Roberts K, Walter P, Wilson J, Hunt T (2017) *Biologia Molecular da Célula*, 6th edn. Artmed, Porto Alegre
- Alfaresi MS, Elkoush AA (2010) Real-time polymerase chain reaction for rapid detection of genes encoding shv extended-spectrum  $\beta$ -lactamases. *Indian J Med Microbiol* 28(4):332-336
- Bajpai T, Pandey M, Varma M, Bhatambare GS (2017) Prevalence of tem, shv, and ctx-m beta-lactamase genes in the urinary isolates of a tertiary care hospital. *Avicenna J Med* 7(1):12-16
- Bardiau M, Yamazaki K., Ote I., Misawa N. & Mainil J.G. 2013. Characterization of methicillin-resistant *Staphylococcus pseudintermedius* isolated from dogs and cats. *Med Microbiol Immunol* 57(13):496-501.
- Byrd AL, Belkaid Y, Segre J (2018) The human skin microbiome. *Nat Rev Microbiol* 16:143–155. <https://doi.org/10.1038/nrmicro.2017.157>
- CLSI (2012) *Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically*, 9th edn. CLSI supplement M07. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne.
- CLSI (2024) *Performance standards for antimicrobial susceptibility testing*, 34th edn. CLSI supplement M100. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne.
- Cong Y, Yang S, Rao X (2019) Vancomycin resistant *Staphylococcus aureus* infections: A review of case updating and clinical features. *J Adv Res* 21:169-176. <https://doi.org/10.1016/j.jare.2019.10.005>
- Donlan RM, Costerton JW (2002) Biofilms: Survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. *Clin Microbiol Rev* 15(2):167–193
- Espadale E, Santoro D (2021) Structure and function of the skin. In: Jackson H, Marsella R Bsava manual of canine and feline dermatology, 4th edn. Gloucester, pp 1-12
- Frey E, Costin M, Granick J, Kornya M, Weese JS (2022) AAFP/AAHA Antimicrobial stewardship guidelines. JAAHA.
- Grice EA, Segre JA (2011) The skin microbiome. *Nat Rev Microbiol* 9(4):244–253
- Han JI, Yang CH, Park HM (2016) Prevalence and risk factors of *Staphylococcus* spp. carriage among dogs and their owners: a cross-sectional study. *The Veterinary Journal* 212:15-21. <https://doi.org/10.1016/j.tvjl.2015.10.059>
- Heuer H, Smalla K (2007) Horizontal gene transfer between bacteria. *Environmental Biosafety Research* 6(1-2):3-13. <https://doi.org/10.1051/ebr:2007034>
- Hillier A, Lloyd DH, Weese JS, Blondeau JM, Boothe D, Breitschwerdt E, Guardabassi L, Papich MG, Rankin S, Turnidge JD, Sykes JE (2014) 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* 25(3):163-e43. <https://doi.org/10.1111/vde.12118>
- Kadlec K, Schwarz S (2012) Antimicrobial resistance of *Staphylococcus pseudintermedius*. *Veterinary Dermatology* 23(4):276-e55. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3164.2012.01056.x>
- Kaneko J, Kamio Y (2004) Bacterial Two-component and hetero-heptameric pore-forming cytolytic toxins: Structures, pore-forming mechanism, and organization of the genes. *Biosci Biotechnol and Biochem* 68(5):981–1003. <https://doi.org/10.1271/bbb.68.981>
- Klein EY, Van Boeckel TP, Martinez EM et al (2018) Global increase and geographic convergence in antibiotic consumption between 2000 and 2015. *Proc Natl Acad Sci* 115:3463–3470

Khameneh B, Diab R, Ghazvini K, Bazzaz BAF (2016) Breakthroughs in bacterial resistance mechanisms and the potential ways to combat them. *Microbial Pathogenesis* 95:32-42. [https://doi:10.1016/j.micpath.2016.02.009](https://doi.org/10.1016/j.micpath.2016.02.009)

Kobayashi SD, Malachowa N, Whitney AR et al (2011) Comparative analysis of *usa300* virulence determinants in a rabbit model of skin and soft tissue infection. *J Exp Med* 204(6):937–941

Lautz S, Kanbar T, Alber J et al (2006) Dissemination of the gene encoding exfoliative toxin of *Staphylococcus intermedius* among strains isolated from dogs during routine microbiological diagnostics. *Zoonoses Public Health* 53(9):434–438

Lipinska U, Hermans K, Meulemans L et al (2011) Pantovallentine leukocidin does play a role in the early stage of *Staphylococcus aureus* skin infections: a rabbit model. *Plos One* 6(8):e22864. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0022864>

MAPA (2022) Guia de uso racional de antimicrobianos para cães e gatos, 1st edn. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, Brasília.

Marsella R (2021) Advances in our understanding of canine atopic dermatitis. *Vet Dermatol* 32:547-151. <https://doi.org/10.1111/vde.12965>

Meroni G, Soares Filipe JF, Drago L, Martino PA (2019) Investigation on antibiotic-resistance, biofilm formation and virulence factors in multi drug resistant and non multi drug resistant *Staphylococcus pseudintermedius*. *Microorganisms* 7(12):1-11

Miller WH, Griffin CE, Campbell KL (2013) Muller and Kirk's small animal dermatology 7th edn. Saunders, Philadelphia

Loeffler A, Lloyd DH (2018) What has changed in canine pyoderma? A narrative review. *The Veterinary Journal* 235:73–82. [https://doi:10.1016/j.tvjl.2018.04.002](https://doi.org/10.1016/j.tvjl.2018.04.002)

Loeffler A, Morris DO (2021) An approach to superficial and deep pyoderma. In: Jackson H, Marsella R. *Bsava manual of canine and feline dermatology*, 4th edn. Gloucester, pp 159-166

Louie M, Cockerill FR (2001) SUSCEPTIBILITY TESTING: Phenotypic and genotypic tests for bacteria and mycobacteria. *Infectious Disease Clinics of North America* 15(4):1205–1226. [https://doi:10.1016/s0891-5520\(05\)70191-4](https://doi.org/10.1016/s0891-5520(05)70191-4)

Moodley A, Damborg P, Nielsen SS (2014) Antimicrobial resistance in methicillin susceptible and methicillin resistance *Staphylococcus pseudintermedius* of canine origin: Literature review from 1980 to 2013. *Vet Microbiol* 171(3-4):337-341. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2014.02.008>

Moses IB, Santos FF, Gales AC (2023) Human colonization and infection by *Staphylococcus pseudintermedius*: an emerging and underestimated zoonotic pathogen. *Microorganisms* 11(3):581 <https://doi.org/10.3390/microorganisms11030581>

Namvar AE, Asghari B, Ezzatifar F, Azizi G, Lari AR (2013). Detection Of The Intercellular Adhesion Gene Cluster (*Ica*) In Clinical *Staphylococcus Aureus* Isolates. *Gms Hygiene And Infection Control* 8(1) <https://doi.org/10.3205/dgkh000203>

Neves MC, Rossi Júnior OD, Alves ECC, Lemos MVF (2007) Detecção de genes de resistência antimicrobiana em cromossomos e plasmídeos de *Staphylococcus* spp. *Arq Inst Biol* 74(3):207-213

Opal SM, Pop-Vicas A (2015) Molecular mechanisms of antibiotic resistance in bacteria. In: Bennet J.E., Dolin R, Blaser MJ. *Principles and practice of infectious diseases*, 8th edn. Elsevier Saunders, pp.235-251

Otto M (2019) *Staphylococcal biofilms*. In: Fischetti VA, Novick RP, Ferretti JJ, Portnoy DA, Braunstein M, Rood JI. *Gram-positive pathogens*, 3rd edn. ASM Press, Washington, pp 699-711

- Papich MG (2021) *Papich Handbook of Veterinary Drugs Book*, 5th edn. Elsevier, St. Louis
- Paterson GK, Harrison EM, Holmes MA (2014) The emergence of mecc methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Trends Microbiol* 22(1):42-47. <https://doi:10.1016/j.tim.2013.11.003>
- Platenik MO, Archer L, Kher L, Santoro D (2022) Prevalence of meca, mecc and panton-valentine-leukocidin genes in clinical isolates of coagulase positive staphylococci from dermatological canine patients. *Microorganisms* 10(11):1-9
- Que Y, Moreillon P (2015) *Staphylococcus Aureus (Including Staphylococcal Toxic Shock Syndrome)*. In: Bennet JE, Dolin R, Blaser MJ. *Principles and practice of infectious diseases*, 8th ed. Elsevier Saunders, pp 2237-2271
- Rahman SU, Ali T, Ali I, Khan NA, Han B, Gao J (2018) The growing genetic and functional diversity of extended spectrum beta-lactamases. *Biomed Res Int* 2018:9519718. <https://doi:10.1155/2018/9519718>
- Rhodes KH, Werner AH (2018) *Blackwell's five-minute veterinary consult clinical companion: small animal dermatology*, 3rd edn. Wiley-Blackwell, Ames
- Ritter JM, Flower RJ, Henderson G, Loke YK, MacEwan D, Robinson E, Fullerton J (2024) *Rang & Dale's pharmacology*, 10th edn. Elsevier
- Riviere JE, Papich MG (2018) *Veterinary pharmacology and therapeutics*, 10th edn. Wiley Blackwell, New Delhi
- Shallcross LJ, Fragaszy E, Johnson AM, Hayward AC (2013) The role of the panton-valentine leucocidin toxin in staphylococcal disease: a systematic review and meta-analysis. *Lancet Infect Dis* 13:43-54
- Shawky M, Suleiman WB, Farrag AA (2021) *J Pure Appl Microbiol* 15(4):2270-2279. <https://doi.org/10.22207/JPAM.15.4.49>
- Somayaji R, Priyantha MAR, Rubin JE, Church D (2016) Human infections due to *Staphylococcus pseudintermedius*, an emerging zoonosis of canine origin: report of 24 cases. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease* 85(4):471-476. <https://doi.org/10.1016/j.diagmicrobio.2016.05.008>
- Tang S, Prem A, Tjokrosurjo J et al (2020) The canine skin and ear microbiome: a comprehensive survey of pathogens implicated in canine skin and ear infections using a novel nextgeneration-sequencing-based assay. *Vet Microbiol* 247:108764. <https://doi:10.1016/j.vetmic.2020.108764>
- Terauchi R, Sato H, Hasegawa T, Yamaguchi T, Aizawa C, Maehara N (2003) Isolation of exfoliative toxin from *Staphylococcus intermedius* and its local toxicity in dogs. *Vet Microbiol* 94(1):19-29
- Weese JS (2013) The canine and feline skin microbiome in health and disease. *Vet Dermatol* 24(1):137-146
- Xia G, Wolz C (2014) Phases of *Staphylococcus aureus* and their impact on host evolution. *Infection, Genetics and Evolution* 21:593-601. <http://dx.doi.org/10.1016/j.meegid.2013.04.022>
- Zeeuwen PLJM, Kleerebezem M, Timmerman HM, Schalkwijk J (2013) Microbiome and skin diseases. *Curr Opin Allergy Clin Immunol* 13(5):514-520. <https://doi:10.1097/aci.0b013e328364ebeb>
- Zhao A, Sun J, Liu Y (2023) Understanding bacterial biofilms: From definition to treatment strategies. *Front Cell Infect Microbiol* 13:1137947. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2023.1137947>

## **ANEXO**

### **ANEXO A – NORMAS PARA SUBMISSÃO NA REVISTA VETERINARY RESEARCH COMMUNICATIONS**

#### **Submission guidelines**

#### **Instructions for Authors**

#### **Authorship Policy**

Authorship should incorporate and should be restricted to those who have contributed substantially to the work in one or more of the following categories:

- Conceived of or designed study
- Performed research
- Analyzed data
- Contributed new methods or models
- Wrote the paper

#### **Types of Articles**

All manuscripts should be presented preferably in Times New Roman font, double-spaced, using A4 paper size. Please use the automatic page and line numbering function to number the pages and lines in your document and number the lines in a single continuous sequence.

The journal accepts the following types of articles:

1. Research
2. Brief Report
3. Review
4. Correspondence
5. Case Reports

#### **1. Research**

Research, also known as Regular Articles should be as concise as possible and structured into the following sections;

- a. Abstract of 150-250 words giving a synopsis of the findings presented and the conclusions reached. The Abstract should be submitted as a single continuous paragraph without subdivisions.
- b. Introduction stating the purpose of the work
- c. Materials and Methods
- d. Results
- e. Discussion (including also a short paragraph as conclusions)
- f. Acknowledgements
- g. Statement of Animal Ethics, including the number of the relevant Ethical Committee's protocol, where appropriate.
- h. Conflict of Interest Statement
- i. References

#### **2. Brief Report**

Also known as Short Communications, reports original scientific data. It should not typically exceed approximately 2000 words in the main text and no more than 3 figures/Tables and 20 references. As for regular articles, the abstract should contain between 150-250 words. All sections in a short communication should follow the regular article style (sections b-i). If necessary, a minimum number of sub-headings may be included if it adds clarity to the article.

### 3. Review

Review articles will be welcomed. However, authors considering the submission of review articles are advised to consult the Editor-in-Chief in advance.

### 4. Correspondence

Denotes arresting and timely comments on material published in the journal as well as anything of likely interest to the readers, such as policy debates and community announcements. Opinions are welcome as long as they are factually based. The expected length is about 1500-2000 words, a maximum of ten references, and no more than two tables or figures.

### 5. Case Reports

Emphasize distinctive instances involving animal patients that exhibit unforeseen diagnoses, treatment outcomes, or clinical courses. Additionally, study reports concerning significant programs or policy interventions pertinent to veterinary sciences are welcome. The report should be carefully structured under three distinct headings: Background, Case Presentation, and the Discussion and Conclusions section, which are presented together. Manuscripts incorporating a thorough evaluation of the study's processes and impact, along with recommendations for the future, will generally receive favorable consideration.

*It is the author's responsibility to ensure that submitted manuscripts comply with journal format as indicated in the current instructions to authors and free sample articles on the [springer.com](http://springer.com) journal homepage.*

### **Manuscript Submission**

Submission of a manuscript implies: that the work described has not been published before; that it is not under consideration for publication anywhere else; that its publication has been approved by all co-authors, if any, as well as by the responsible authorities – tacitly or explicitly – at the institute where the work has been carried out. The publisher will not be held legally responsible should there be any claims for compensation.

### **Permissions**

Authors wishing to include figures, tables, or text passages that have already been published elsewhere are required to obtain permission from the copyright owner(s) for both the print and online format and to include evidence that such permission has been granted when submitting their papers. Any material received without such evidence will be assumed to originate from the authors.

### **Online Submission**

Please follow the hyperlink “Submit manuscript” and upload all of your manuscript files following the instructions given on the screen.

### **Source Files**

Please ensure you provide all relevant editable source files at every submission and revision. Failing to submit a complete set of editable source files will result in your article not being considered for review. For your manuscript text please always submit in common word processing formats such as .docx or LaTeX.

### **Submitting Declarations**

Please note that [Author Contribution information](#) and [Competing Interest information](#) must be provided at submission via the submission interface. Only the information submitted via the interface will be used in the final published version. Please make sure that if you are an editorial board member and also a listed author that you also declare this information in the Competing Interest section of the interface.

Please see the relevant sections in the submission guidelines for further information on these statements as well as possible other mandatory statements.

### **Title Page**

Please make sure your title page contains the following information.

#### **Title**

The title should be concise and informative.

#### **Author information**

The name(s) of the author(s)

The affiliation(s) of the author(s), i.e. institution, (department), city, (state), country

A clear indication and an active e-mail address of the corresponding author

If available, the 16-digit [ORCID](#) of the author(s)

If address information is provided with the affiliation(s) it will also be published.

For authors that are (temporarily) unaffiliated we will only capture their city and country of residence, not their e-mail address unless specifically requested.

Large Language Models (LLMs), such as [ChatGPT](#), do not currently satisfy our [authorship criteria](#). Notably an attribution of authorship carries with it accountability for the work, which cannot be effectively applied to LLMs. Use of an LLM should be properly documented in the Methods section (and if a Methods section is not available, in a suitable alternative part) of the manuscript.

#### **Abstract**

Please provide an abstract of 150 to 250 words. The abstract should not contain any undefined abbreviations or unspecified references.

*For life science journals only (when applicable)*

Trial registration number and date of registration for prospectively registered trials

Trial registration number and date of registration, followed by “retrospectively registered”, for retrospectively registered trials

#### **Keywords**

Please provide 4 to 6 keywords which can be used for indexing purposes.

**Text****Text Formatting**

Manuscripts should be submitted in Word.

Use a normal, plain font (e.g., 10-point Times Roman) for text.

Use italics for emphasis.

Use the automatic page numbering function to number the pages.

Do not use field functions.

Use tab stops or other commands for indents, not the space bar.

Use the table function, not spreadsheets, to make tables.

Use the equation editor or MathType for equations.

Save your file in docx format (Word 2007 or higher) or doc format (older Word versions).

Manuscripts with mathematical content can also be submitted in LaTeX. We recommend using Springer Nature's LaTeX template.

**Headings**

Please use no more than three levels of displayed headings.

**Abbreviations**

Abbreviations should be defined at first mention and used consistently thereafter.

**Footnotes**

Footnotes can be used to give additional information, which may include the citation of a reference included in the reference list. They should not consist solely of a reference citation, and they should never include the bibliographic details of a reference. They should also not contain any figures or tables.

Footnotes to the text are numbered consecutively; those to tables should be indicated by superscript lower-case letters (or asterisks for significance values and other statistical data).

Footnotes to the title or the authors of the article are not given reference symbols.

Always use footnotes instead of endnotes.

**Acknowledgments**

Acknowledgments of people, grants, funds, etc. should be placed in a separate section on the title page. The names of funding organizations should be written in full.

**Additional remark:**

Please use the automatic page and line numbering function to number the pages and lines in your document and number the lines in a single continuous sequence.

For revised manuscripts, please include a 'clean' version of your manuscript as well as a 'tracked changes or highlighted' version of your manuscript. This allows Editors and potential reviewers to quickly assess where the changes have been made within the revised file.

Depending upon the extent of the revisions it may be easier for the 'tracked changes' version of your manuscript to be highlighted with changes rather than using the tracked changes feature in Word Documents. In your point by point response, please specify the page and / or line where each change has been made.

## References

### Citation

Cite references in the text by name and year in parentheses. Some examples:

Negotiation research spans many disciplines (Thompson 1990).

This result was later contradicted by Becker and Seligman (1996).

This effect has been widely studied (Abbott 1991; Barakat et al. 1995a, b; Kelso and Smith 1998; Medvec et al. 1999, 2000).

### Reference list

The list of references should only include works that are cited in the text and that have been published or accepted for publication. Personal communications and unpublished works should only be mentioned in the text.

Reference list entries should be alphabetized by the last names of the first author of each work. Please alphabetize according to the following rules: 1) For one author, by name of author, then chronologically; 2) For two authors, by name of author, then name of coauthor, then chronologically; 3) For more than two authors, by name of first author, then chronologically.

If available, please always include DOIs as full DOI links in your reference list (e.g. “<https://doi.org/abc>”).

### Journal article

Gamelin FX, Baquet G, Berthoin S, Thevenet D, Nourry C, Nottin S, Bosquet L (2009) Effect of high intensity intermittent training on heart rate variability in prepubescent children. *Eur J Appl Physiol* 105:731-738. <https://doi.org/10.1007/s00421-008-0955-8>

Ideally, the names of all authors should be provided, but the usage of “et al” in long author lists will also be accepted:

Smith J, Jones M Jr, Houghton L et al (1999) Future of health insurance. *N Engl J Med* 341:325–329

### Article by DOI

Slifka MK, Whitton JL (2000) Clinical implications of dysregulated cytokine production. *J Mol Med*. <https://doi.org/10.1007/s001090000086>

### Book

South J, Blass B (2001) *The future of modern genomics*. Blackwell, London

### Book chapter

Brown B, Aaron M (2001) The politics of nature. In: Smith J (ed) *The rise of modern genomics*, 3rd edn. Wiley, New York, pp 230-257

### Online document

Cartwright J (2007) Big stars have weather too. IOP Publishing PhysicsWeb. <http://physicsweb.org/articles/news/11/6/16/1>. Accessed 26 June 2007

### Dissertation

Trent JW (1975) *Experimental acute renal failure*. Dissertation, University of California

Always use the standard abbreviation of a journal’s name according to the ISSN List of Title Word Abbreviations, see ISSN LTWA

If you are unsure, please use the full journal title.

### **Statements & Declarations**

The following statements must be included in your submitted manuscript under the heading 'Statements and Declarations'. This should be placed after the References section. Please note that submissions that do not include required statements will be returned as incomplete.

### **Funding**

Please describe any sources of funding that have supported the work. The statement should include details of any grants received (please give the name of the funding agency and grant number).

Example statements:

*“This work was supported by [...] (Grant numbers [...] and [...]). Author A.B. has received research support from Company A.”*

*“The authors declare that no funds, grants, or other support were received during the preparation of this manuscript.”*

### **Competing Interests**

Authors are required to disclose financial or non-financial interests that are directly or indirectly related to the work submitted for publication. Interests within the last 3 years of beginning the work (conducting the research and preparing the work for submission) should be reported. Interests outside the 3-year time frame must be disclosed if they could reasonably be perceived as influencing the submitted work.

Example statements:

*“Financial interests: Author A and B declare they have no financial interests. Author C has received speaker and consultant honoraria from Company M. Dr. C has received speaker honorarium and research funding from Company M and Company N. Author D has received travel support from Company O. Non-financial interests: Author D has served on advisory boards for Company M and Company N.”*

*“The authors have no relevant financial or non-financial interests to disclose.”*

Please refer to the “Competing Interests” section below for more information on how to complete these sections.

### **Author Contributions**

Authors are encouraged to include a statement that specifies the contribution of every author to the research and preparation of the manuscript.

Example statement:

*“All authors contributed to the study conception and design. Material preparation, data collection and analysis were performed by [full name], [full name] and [full name]. The first draft of the manuscript was written by [full name] and all authors commented on previous versions of the manuscript. All authors read and approved the final manuscript.”*

Please refer to the “Authorship Principles ” section below for more information on how to complete this section.

### **Data Availability**

This journal encourages authors to provide an optional statement of data availability in their article. Data Availability Statements should include information on where data supporting the

results reported in the article can be found, including, where applicable, hyperlinks to publicly archived datasets analysed or generated during the study. Data availability statements can also indicate whether data are available on request from the authors and where no data are available, if appropriate.

Example statements:

*“The datasets generated during and/or analysed during the current study are available in the [NAME] repository, [PERSISTENT LINK TO DATASETS]”*

*“The datasets generated during and/or analysed during the current study are available from the corresponding author on reasonable request.”*

Please refer to the “Research Data Policy and Data Availability” section below for more information on how to complete this section.

In addition to the above, manuscripts that report the results of studies involving humans and/or animals should include the following declarations:

### **Ethics approval**

Authors of research involving human or animal subjects should include a statement that confirms that the study was approved (or granted exemption) by the appropriate institutional and/or national research ethics committee (including the name of the ethics committee and reference number, if available). For research involving animals, their data or biological material, authors should supply detailed information on the ethical treatment of their animals in their submission. If a study was granted exemption or did not require ethics approval, this should also be detailed in the manuscript.

*“This study was performed in line with the principles of the Declaration of Helsinki. Approval was granted by the Ethics Committee of University B (Date.../No....).”*

*“This is an observational study. The XYZ Research Ethics Committee has confirmed that no ethical approval is required.”*

For detailed information on relevant ethical standards and criteria, please refer to the sections on “Research involving human participants, their data or biological material”, “Research involving animals, their data or biological material”.

### **Consent to participate**

For all research involving human subjects, freely-given, informed consent to participate in the study must be obtained from participants (or their parent or legal guardian in the case of children under 16) and a statement to this effect should appear in the manuscript.

Example statement:

*“Informed consent was obtained from all individual participants included in the study.”*

*“Written informed consent was obtained from the parents.”*

Please refer to the section on “Informed Consent” for additional help with completing this information.

### **Consent to publish**

Individuals may consent to participate in a study, but object to having their data published in a journal article. If your manuscript contains any individual person’s data in any form (including any individual details, images or videos), consent for publication must be obtained from that person, or in the case of children, their parent or legal guardian. This is in particular applicable to case studies. A statement confirming that consent to publish has been received from all participants should appear in the manuscript.

Example statement:

*“The authors affirm that human research participants provided informed consent for publication of the images in Figure(s) 1a, 1b and 1c.”*

Please refer to the section on “Informed Consent” for additional help with completing this information.

### **Tables**

All tables are to be numbered using Arabic numerals.

Tables should always be cited in text in consecutive numerical order.

For each table, please supply a table caption (title) explaining the components of the table.

Identify any previously published material by giving the original source in the form of a reference at the end of the table caption.

Footnotes to tables should be indicated by superscript lower-case letters (or asterisks for significance values and other statistical data) and included beneath the table body.

### **Artwork and Illustrations Guidelines**

Electronic Figure Submission

Supply all figures electronically.

Indicate what graphics program was used to create the artwork.

For vector graphics, the preferred format is EPS; for halftones, please use TIFF format.

MSOffice files are also acceptable.

Vector graphics containing fonts must have the fonts embedded in the files.

Name your figure files with "Fig" and the figure number, e.g., Fig1.eps.

Figure Lettering

To add lettering, it is best to use Helvetica or Arial (sans serif fonts).

Keep lettering consistently sized throughout your final-sized artwork, usually about 2–3 mm (8–12 pt).

Variance of type size within an illustration should be minimal, e.g., do not use 8-pt type on an axis and 20-pt type for the axis label.

Avoid effects such as shading, outline letters, etc.

Do not include titles or captions within your illustrations.

### **Figure Numbering**

All figures are to be numbered using Arabic numerals.

Figures should always be cited in text in consecutive numerical order.

Figure parts should be denoted by lowercase letters (a, b, c, etc.).

If an appendix appears in your article and it contains one or more figures, continue the consecutive numbering of the main text. Do not number the appendix figures, "A1, A2, A3, etc." Figures in online appendices [Supplementary Information (SI)] should, however, be numbered separately.

### **Figure Captions**

Each figure should have a concise caption describing accurately what the figure depicts.

Include the captions in the text file of the manuscript, not in the figure file.

Figure captions begin with the term Fig. in bold type, followed by the figure number, also in bold type.

No punctuation is to be included after the number, nor is any punctuation to be placed at the end of the caption.

Identify all elements found in the figure in the figure caption; and use boxes, circles, etc., as coordinate points in graphs.

Identify previously published material by giving the original source in the form of a reference citation at the end of the figure caption.

### **Figure Placement and Size**

Figures should be submitted within the body of the text. Only if the file size of the manuscript causes problems in uploading it, the large figures should be submitted separately from the text.

When preparing your figures, size figures to fit in the column width.

For large-sized journals the figures should be 84 mm (for double-column text areas), or 174 mm (for single-column text areas) wide and not higher than 234 mm.

For small-sized journals, the figures should be 119 mm wide and not higher than 195 mm.

### **Permissions**

If you include figures that have already been published elsewhere, you must obtain permission from the copyright owner(s) for both the print and online format. Please be aware that some publishers do not grant electronic rights for free and that Springer will not be able to refund any costs that may have occurred to receive these permissions. In such cases, material from other sources should be used.

### **Accessibility**

In order to give people of all abilities and disabilities access to the content of your figures, please make sure that

All figures have descriptive captions (blind users could then use a text-to-speech software or a text-to-Braille hardware)

Patterns are used instead of or in addition to colors for conveying information (colorblind users would then be able to distinguish the visual elements)

Any figure lettering has a contrast ratio of at least 4.5:1

Generative AI Images

Please check [Springer's policy on generative AI images](#) and make sure your work adheres to the principles described therein.

### **Supplementary Information (SI)**

Springer accepts electronic multimedia files (animations, movies, audio, etc.) and other supplementary files to be published online along with an article or a book chapter. This feature can add dimension to the author's article, as certain information cannot be printed or is more convenient in electronic form.

Before submitting research datasets as Supplementary Information, authors should read the journal's Research data policy. We encourage research data to be archived in data repositories wherever possible.

### **Submission**

Supply all supplementary material in standard file formats.

Please include in each file the following information: article title, journal name, author names; affiliation and e-mail address of the corresponding author.

To accommodate user downloads, please keep in mind that larger-sized files may require very long download times and that some users may experience other problems during downloading.

High resolution (streamable quality) videos can be submitted up to a maximum of 25GB; low resolution videos should not be larger than 5GB.

### **Audio, Video, and Animations**

Aspect ratio: 16:9 or 4:3

Maximum file size: 25 GB for high resolution files; 5 GB for low resolution files

Minimum video duration: 1 sec

Supported file formats: avi, wmv, mp4, mov, m2p, mp2, mpg, mpeg, flv, mxf, mts, m4v, 3gp

### **Text and Presentations**

Submit your material in PDF format; .doc or .ppt files are not suitable for long-term viability.

A collection of figures may also be combined in a PDF file.

Spreadsheets

Spreadsheets should be submitted as .csv or .xlsx files (MS Excel).

Specialized Formats

Specialized format such as .pdb (chemical), .wrl (VRML), .nb (Mathematica notebook), and .tex can also be supplied.

### **Collecting Multiple Files**

It is possible to collect multiple files in a .zip or .gz file.

Numbering

If supplying any supplementary material, the text must make specific mention of the material as a citation, similar to that of figures and tables.

Refer to the supplementary files as “Online Resource”, e.g., "... as shown in the animation (Online Resource 3)", "... additional data are given in Online Resource 4”.

Name the files consecutively, e.g. “ESM\_3.mpg”, “ESM\_4.pdf”.

Captions

For each supplementary material, please supply a concise caption describing the content of the file.

Processing of supplementary files

Supplementary Information (SI) will be published as received from the author without any conversion, editing, or reformatting.

### **Accessibility**

In order to give people of all abilities and disabilities access to the content of your supplementary files, please make sure that

The manuscript contains a descriptive caption for each supplementary material

Video files do not contain anything that flashes more than three times per second (so that users prone to seizures caused by such effects are not put at risk)

Generative AI Images

Please check [Springer’s policy on generative AI images](#) and make sure your work adheres to the principles described therein.

### **Ethical Responsibilities of Authors**

This journal is committed to upholding the integrity of the scientific record. As a member of the Committee on Publication Ethics ([COPE](#)) the journal will follow the [COPE](#) guidelines on how to deal with potential acts of misconduct.

Authors should refrain from misrepresenting research results which could damage the trust in the journal, the professionalism of scientific authorship, and ultimately the entire scientific endeavour. Maintaining integrity of the research and its presentation is helped by following the rules of good scientific practice, which include\*:

The manuscript should not be submitted to more than one journal for simultaneous consideration.

The submitted work should be original and should not have been published elsewhere in any form or language (partially or in full), unless the new work concerns an expansion of previous work. (Please provide transparency on the re-use of material to avoid the concerns about text-recycling ('self-plagiarism')).

A single study should not be split up into several parts to increase the quantity of submissions and submitted to various journals or to one journal over time (i.e. 'salami-slicing/publishing'). Concurrent or secondary publication is sometimes justifiable, provided certain conditions are met. Examples include: translations or a manuscript that is intended for a different group of readers.

Results should be presented clearly, honestly, and without fabrication, falsification or inappropriate data manipulation (including image based manipulation). Authors should adhere to discipline-specific rules for acquiring, selecting and processing data.

No data, text, or theories by others are presented as if they were the author's own ('plagiarism'). Proper acknowledgements to other works must be given (this includes material that is closely copied (near verbatim), summarized and/or paraphrased), quotation marks (to indicate words taken from another source) are used for verbatim copying of material, and permissions secured for material that is copyrighted.

### **Important note: the journal may use software to screen for plagiarism.**

Authors should make sure they have permissions for the use of software, questionnaires/(web) surveys and scales in their studies (if appropriate).

Research articles and non-research articles (e.g. Opinion, Review, and Commentary articles) must cite appropriate and relevant literature in support of the claims made. Excessive and inappropriate self-citation or coordinated efforts among several authors to collectively self-cite is strongly discouraged.

Authors should avoid untrue statements about an entity (who can be an individual person or a company) or descriptions of their behavior or actions that could potentially be seen as personal attacks or allegations about that person.

Research that may be misapplied to pose a threat to public health or national security should be clearly identified in the manuscript (e.g. dual use of research). Examples include creation of harmful consequences of biological agents or toxins, disruption of immunity of vaccines, unusual hazards in the use of chemicals, weaponization of research/technology (amongst others).

Authors are strongly advised to ensure the author group, the Corresponding Author, and the order of authors are all correct at submission. Adding and/or deleting authors during the revision stages is generally not permitted, but in some cases may be warranted. Reasons for

changes in authorship should be explained in detail. Please note that changes to authorship cannot be made after acceptance of a manuscript.

\*All of the above are guidelines and authors need to make sure to respect third parties rights such as copyright and/or moral rights.

Upon request authors should be prepared to send relevant documentation or data in order to verify the validity of the results presented. This could be in the form of raw data, samples, records, etc. Sensitive information in the form of confidential or proprietary data is excluded. If there is suspicion of misbehavior or alleged fraud the Journal and/or Publisher will carry out an investigation following [COPE](#) guidelines. If, after investigation, there are valid concerns, the author(s) concerned will be contacted under their given e-mail address and given an opportunity to address the issue. Depending on the situation, this may result in the Journal's and/or Publisher's implementation of the following measures, including, but not limited to:

If the manuscript is still under consideration, it may be rejected and returned to the author. If the article has already been published online, depending on the nature and severity of the infraction:

- an erratum/correction may be placed with the article
- an expression of concern may be placed with the article
- or in severe cases retraction of the article may occur.

The reason will be given in the published erratum/correction, expression of concern or retraction note. Please note that retraction means that the article is **maintained on the platform**, watermarked "retracted" and the explanation for the retraction is provided in a note linked to the watermarked article.

The author's institution may be informed

A notice of suspected transgression of ethical standards in the peer review system may be included as part of the author's and article's bibliographic record.

### **Fundamental errors**

Authors have an obligation to correct mistakes once they discover a significant error or inaccuracy in their published article. The author(s) is/are requested to contact the journal and explain in what sense the error is impacting the article. A decision on how to correct the literature will depend on the nature of the error. This may be a correction or retraction. The retraction note should provide transparency which parts of the article are impacted by the error.

### **Suggesting / excluding reviewers**

Authors are welcome to suggest suitable reviewers and/or request the exclusion of certain individuals when they submit their manuscripts. When suggesting reviewers, authors should make sure they are totally independent and not connected to the work in any way. It is strongly recommended to suggest a mix of reviewers from different countries and different institutions. When suggesting reviewers, the Corresponding Author must provide an institutional email address for each suggested reviewer, or, if this is not possible to include other means of verifying the identity such as a link to a personal homepage, a link to the publication record or a researcher or author ID in the submission letter. Please note that the Journal may not use the suggestions, but suggestions are appreciated and may help facilitate the peer review process.

### **Authorship principles**

These guidelines describe authorship principles and good authorship practices to which prospective authors should adhere to.

#### Authorship clarified

The Journal and Publisher assume all authors agreed with the content and that all gave explicit consent to submit and that they obtained consent from the responsible authorities at the institute/organization where the work has been carried out, **before** the work is submitted.

The Publisher does not prescribe the kinds of contributions that warrant authorship. It is recommended that authors adhere to the guidelines for authorship that are applicable in their specific research field. In absence of specific guidelines it is recommended to adhere to the following guidelines\*:

All authors whose names appear on the submission

- 1) made substantial contributions to the conception or design of the work; or the acquisition, analysis, or interpretation of data; or the creation of new software used in the work;
- 2) drafted the work or revised it critically for important intellectual content;
- 3) approved the version to be published; and
- 4) agree to be accountable for all aspects of the work in ensuring that questions related to the accuracy or integrity of any part of the work are appropriately investigated and resolved.

\* Based on/adapted from:

[ICMJE, Defining the Role of Authors and Contributors,](#)

[Transparency in authors' contributions and responsibilities to promote integrity in scientific publication, McNutt at all, PNAS February 27, 2018](#)

### **Disclosures and declarations**

All authors are requested to include information regarding sources of funding, financial or non-financial interests, study-specific approval by the appropriate ethics committee for research involving humans and/or animals, informed consent if the research involved human participants, and a statement on welfare of animals if the research involved animals (as appropriate).

The decision whether such information should be included is not only dependent on the scope of the journal, but also the scope of the article. Work submitted for publication may have implications for public health or general welfare and in those cases it is the responsibility of all authors to include the appropriate disclosures and declarations.

### **Data transparency**

All authors are requested to make sure that all data and materials as well as software application or custom code support their published claims and comply with field standards. Please note that journals may have individual policies on (sharing) research data in concordance with disciplinary norms and expectations.

#### Role of the Corresponding Author

**One author** is assigned as Corresponding Author and acts on behalf of all co-authors and ensures that questions related to the accuracy or integrity of any part of the work are appropriately addressed.

The Corresponding Author is responsible for the following requirements:

ensuring that all listed authors have approved the manuscript before submission, including the names and order of authors;

managing all communication between the Journal and all co-authors, before and after publication;\*

providing transparency on re-use of material and mention any unpublished material (for example manuscripts in press) included in the manuscript in a cover letter to the Editor;

making sure disclosures, declarations and transparency on data statements from all authors are included in the manuscript as appropriate (see above).

\* The requirement of managing all communication between the journal and all co-authors during submission and proofing may be delegated to a Contact or Submitting Author. In this case please make sure the Corresponding Author is clearly indicated in the manuscript.

Author contributions

In absence of specific instructions and in research fields where it is possible to describe discrete efforts, the Publisher recommends authors to include contribution statements in the work that specifies the contribution of every author in order to promote transparency. These contributions should be listed at the separate title page.

**Examples of such statement(s) are shown below:**

• Free text:

All authors contributed to the study conception and design. Material preparation, data collection and analysis were performed by [full name], [full name] and [full name]. The first draft of the manuscript was written by [full name] and all authors commented on previous versions of the manuscript. All authors read and approved the final manuscript.

Example: CRediT taxonomy:

• Conceptualization: [full name], ...; Methodology: [full name], ...; Formal analysis and investigation: [full name], ...; Writing - original draft preparation: [full name, ...]; Writing - review and editing: [full name], ...; Funding acquisition: [full name], ...; Resources: [full name], ...; Supervision: [full name],....

For **review articles** where discrete statements are less applicable a statement should be included who had the idea for the article, who performed the literature search and data analysis, and who drafted and/or critically revised the work.

For articles that are based primarily on the **student's dissertation or thesis**, it is recommended that the student is usually listed as principal author:

[A Graduate Student's Guide to Determining Authorship Credit and Authorship Order, APA Science Student Council 2006](#)

### **Affiliation**

The primary affiliation for each author should be the institution where the majority of their work was done. If an author has subsequently moved, the current address may additionally be stated. Addresses will not be updated or changed after publication of the article.

Changes to authorship

Authors are strongly advised to ensure the correct author group, the Corresponding Author, and the order of authors at submission. Changes of authorship by adding or deleting authors, and/or changes in Corresponding Author, and/or changes in the sequence of authors are **not** accepted **after acceptance** of a manuscript.

**Please note that author names will be published exactly as they appear on the accepted submission!**

Please make sure that the names of all authors are present and correctly spelled, and that addresses and affiliations are current.

Adding and/or deleting authors at revision stage are generally not permitted, but in some cases it may be warranted. Reasons for these changes in authorship should be explained. Approval of the change during revision is at the discretion of the Editor-in-Chief. Please note that journals may have individual policies on adding and/or deleting authors during revision stage.

#### Author identification

Authors are recommended to use their ORCID ID when submitting an article for consideration or acquire an ORCID ID via the submission process.

#### **Deceased or incapacitated authors**

For cases in which a co-author dies or is incapacitated during the writing, submission, or peer-review process, and the co-authors feel it is appropriate to include the author, co-authors should obtain approval from a (legal) representative which could be a direct relative.

#### **Authorship issues or disputes**

In the case of an authorship dispute during peer review or after acceptance and publication, the Journal will not be in a position to investigate or adjudicate. Authors will be asked to resolve the dispute themselves. If they are unable the Journal reserves the right to withdraw a manuscript from the editorial process or in case of a published paper raise the issue with the authors' institution(s) and abide by its guidelines.

#### **Confidentiality**

Authors should treat all communication with the Journal as confidential which includes correspondence with direct representatives from the Journal such as Editors-in-Chief and/or Handling Editors and reviewers' reports unless explicit consent has been received to share information.

#### **Compliance with Ethical Standards**

To ensure objectivity and transparency in research and to ensure that accepted principles of ethical and professional conduct have been followed, authors should include information regarding sources of funding, potential conflicts of interest (financial or non-financial), informed consent if the research involved human participants, and a statement on welfare of animals if the research involved animals.

Authors should include the following statements (if applicable) in a separate section entitled "Compliance with Ethical Standards" when submitting a paper:

Disclosure of potential conflicts of interest

Research involving Human Participants and/or Animals

#### **Informed consent**

Please note that standards could vary slightly per journal dependent on their peer review policies (i.e. single or double blind peer review) as well as per journal subject discipline. Before submitting your article check the instructions following this section carefully.

The corresponding author should be prepared to collect documentation of compliance with ethical standards and send if requested during peer review or after publication.

The Editors reserve the right to reject manuscripts that do not comply with the above-mentioned guidelines. The author will be held responsible for false statements or failure to fulfill the above-mentioned guidelines.

### **Competing Interests**

**Authors** are requested to disclose interests that are directly or indirectly related to the work submitted for publication. Interests within the last 3 years of beginning the work (conducting the research and preparing the work for submission) should be reported. Interests outside the 3-year time frame must be disclosed if they could reasonably be perceived as influencing the submitted work. Disclosure of interests provides a complete and transparent process and helps readers form their own judgments of potential bias. This is not meant to imply that a financial relationship with an organization that sponsored the research or compensation received for consultancy work is inappropriate.

**Editorial Board Members and Editors** are required to declare any competing interests and may be excluded from the peer review process if a competing interest exists. In addition, they should exclude themselves from handling manuscripts in cases where there is a competing interest. This may include – but is not limited to – having previously published with one or more of the authors, and sharing the same institution as one or more of the authors. Where an Editor or Editorial Board Member is on the author list we recommend they declare this in the competing interests section on the submitted manuscript. If they are an author or have any other competing interest regarding a specific manuscript, another Editor or member of the Editorial Board will be assigned to assume responsibility for overseeing peer review. These submissions are subject to the exact same review process as any other manuscript. Editorial Board Members are welcome to submit papers to the journal. These submissions are not given any priority over other manuscripts, and Editorial Board Member status has no bearing on editorial consideration.

Interests that should be considered and disclosed but are not limited to the following:

**Funding:** Research grants from funding agencies (please give the research funder and the grant number) and/or research support (including salaries, equipment, supplies, reimbursement for attending symposia, and other expenses) by organizations that may gain or lose financially through publication of this manuscript.

**Employment:** Recent (while engaged in the research project), present or anticipated employment by any organization that may gain or lose financially through publication of this manuscript. This includes multiple affiliations (if applicable).

**Financial interests:** Stocks or shares in companies (including holdings of spouse and/or children) that may gain or lose financially through publication of this manuscript; consultation fees or other forms of remuneration from organizations that may gain or lose financially; patents or patent applications whose value may be affected by publication of this manuscript. It is difficult to specify a threshold at which a financial interest becomes significant, any such figure is necessarily arbitrary, so one possible practical guideline is the following: "Any undeclared financial interest that could embarrass the author were it to become publicly known after the work was published."

**Non-financial interests:** In addition, authors are requested to disclose interests that go beyond financial interests that could impart bias on the work submitted for publication such as professional interests, personal relationships or personal beliefs (amongst others). Examples include, but are not limited to: position on editorial board, advisory board or board of

directors or other type of management relationships; writing and/or consulting for educational purposes; expert witness; mentoring relations; and so forth.

Primary research articles require a disclosure statement. Review articles present an expert synthesis of evidence and may be treated as an authoritative work on a subject. Review articles therefore require a disclosure statement. Other article types such as editorials, book reviews, comments (amongst others) may, dependent on their content, require a disclosure statement. If you are unclear whether your article type requires a disclosure statement, please contact the Editor-in-Chief.

Please note that, in addition to the above requirements, funding information (given that funding is a potential competing interest (as mentioned above)) needs to be disclosed upon submission of the manuscript in the peer review system. This information will automatically be added to the Record of CrossMark, however it is **not added** to the manuscript itself. Under 'summary of requirements' (see below) funding information should be included in the '**Declarations**' section.

Summary of requirements

The above should be summarized in a statement and placed in a 'Declarations' section before the reference list under a heading of 'Funding' and/or 'Competing interests'. Other declarations include Ethics approval, Consent, Data, Material and/or Code availability and Authors' contribution statements.

Please see the various examples of wording below and revise/customize the sample statements according to your own needs.

When all authors have the same (or no) conflicts and/or funding it is sufficient to use one blanket statement.

**Examples of statements to be used when funding has been received:**

Partial financial support was received from [...]

The research leading to these results received funding from [...] under Grant Agreement No[...].

This study was funded by [...]

This work was supported by [...] (Grant numbers [...] and [...])

**Examples of statements to be used when there is no funding:**

The authors did not receive support from any organization for the submitted work.

No funding was received to assist with the preparation of this manuscript.

No funding was received for conducting this study.

No funds, grants, or other support was received.

**Examples of statements to be used when there are interests to declare:**

**Financial interests:** Author A has received research support from Company A. Author B has received a speaker honorarium from Company W and owns stock in Company X. Author C is consultant to company Y.

**Non-financial interests:** Author C is an unpaid member of committee Z.

**Financial interests:** The authors declare they have no financial interests.

**Non-financial interests:** Author A is on the board of directors of Y and receives no compensation as member of the board of directors.

**Financial interests:** Author A received a speaking fee from Y for Z. Author B receives a salary from association X. X where s/he is the Executive Director.

**Non-financial interests:** none.

**Financial interests:** Author A and B declare they have no financial interests. Author C has received speaker and consultant honoraria from Company M and Company N. Dr. C has

received speaker honorarium and research funding from Company M and Company O. Author D has received travel support from Company O.

**Non-financial interests:** Author D has served on advisory boards for Company M, Company N and Company O.

**Examples of statements to be used when authors have nothing to declare:**

The authors have no relevant financial or non-financial interests to disclose.

The authors have no competing interests to declare that are relevant to the content of this article.

All authors certify that they have no affiliations with or involvement in any organization or entity with any financial interest or non-financial interest in the subject matter or materials discussed in this manuscript.

The authors have no financial or proprietary interests in any material discussed in this article. Authors are responsible for correctness of the statements provided in the manuscript. See also Authorship Principles. The Editor-in-Chief reserves the right to reject submissions that do not meet the guidelines described in this section.