

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
CURSO DE FARMÁCIA

Marcel Afonso Provenzi

Caracterização do perfil de sensibilidade aos antimicrobianos e genes de virulência de amostras clínicas de *Staphylococcus aureus* resistentes à meticilina (MRSA) isoladas no Estado de Santa Catarina

Florianópolis

2022

Marcel Afonso Provenzi

Caracterização do perfil de sensibilidade aos antimicrobianos e genes de virulência de amostras clínicas de *Staphylococcus aureus* resistentes à metilina (MRSA) isoladas no Estado de Santa Catarina

Trabalho de Conclusão do Curso de Graduação em Farmácia da Universidade Federal de Santa Catarina como requisito para a obtenção do título de Bacharel em Farmácia.

Orientador: Prof^a Dr^a Fabienne Antunes Ferreira

Florianópolis

2022

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,
através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária da UFSC.

Provenzi, Marcel Afonso

Caracterização do perfil de sensibilidade aos
antimicrobianos e genes de virulência de amostras clínicas
de *Staphylococcus aureus* resistentes à meticilina (MRSA)
isoladas no Estado de Santa Catarina / Marcel Afonso
Provenzi ; orientador, Fabienne Antunes Ferreira, 2022.
71 p.

Trabalho de Conclusão de Curso (graduação) -
Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências
da Saúde, Graduação em Farmácia, Florianópolis, 2022.

Inclui referências.

1. Farmácia. 2. *Staphylococcus aureus*. 3. MRSA. 4.
Resistência Antimicrobiana. 5. Genes de Virulência. I.
Antunes Ferreira, Fabienne . II. Universidade Federal de
Santa Catarina. Graduação em Farmácia. III. Título.

Marcel Afonso Provenzi

Caracterização do perfil de sensibilidade aos antimicrobianos e genes de virulência de amostras clínicas de *Staphylococcus aureus* resistentes à meticilina (MRSA) isoladas no Estado de Santa Catarina

Este Trabalho Conclusão de Curso foi julgado adequado para obtenção do Título de Bacharel e aprovado em sua forma final pelo Curso de Farmácia da UFSC.

Florianópolis, 17 de Março de 2022.

Prof.^a Dr.^a Liliete Canes Souza Cordeiro
Coordenadora do Curso

Banca Examinadora:

Prof.^a Dr.^a Fabienne Antunes Ferreira
Orientadora
Universidade Federal de Santa Catarina

Prof.^a Dr.^a Jussara Kasuko Palmeiro
Avaliadora
Universidade Federal de Santa Catarina

Prof.^a Dr.^a Thaís Cristine Marques Sincero
Avaliadora
Universidade Federal de Santa Catarina

Dedico este trabalho a todas as pessoas importantes na minha vida, principalmente minha família.

AGRADECIMENTOS

À minha família, por todo apoio e compreensão durante todos esses anos de graduação, essa trajetória não seria possível sem a presença e carinho de todos, amo muito vocês!

A todos os meus amigos de longa data, por me incentivarem a continuar na graduação que tantas vezes me fez querer desistir, obrigado por tudo!

Aos amigos que fiz durante a graduação do curso de Farmácia, que tornaram o convívio divertido e super prazeroso durante esses anos.

À minha grande amiga Maria Paula que conheci durante a graduação, uma mulher incrível e determinada que me apoiou sempre a seguir o caminho acadêmico em meio aos desvaneios da vida, é uma honra tê-la presente em minha vida e como colega de profissão!

À minha orientadora Prof^a Dr^a Fabienne, por ter me dado a oportunidade de conhecer a pesquisa na universidade e me inspirar a ser um acadêmico melhor a cada dia, você é TUDO pra mim!

Aos amigos que fiz no Laboratório de Genética Molecular de Bactérias (GeMBac), que me acolheram sempre com carinho durante esses anos, obrigado gente!

Aos laboratórios da UFSC que me auxiliaram neste projeto e em outros anteriores: Laboratório de Imunobiologia (LIDI), Laboratório de Protozoologia (PROTO), Laboratório Multiusuário de Estudos em Biologia (LAMEB) e ao Laboratório de Microbiologia Molecular Aplicada (MIMA).

Às professoras Thaís, Jussara e Cleonice, por aceitarem avaliar este trabalho, vocês são professoras e cientistas incríveis, muito obrigado!

RESUMO

Staphylococcus aureus resistente à Meticilina (MRSA) é considerado um dos principais causadores de infecções relacionadas à assistência à saúde (IRAS) no mundo, graças ao seu aparato genético de virulência e capacidade de adquirir diversos mecanismos de resistência aos antimicrobianos. No Estado de Santa Catarina (SC), dados epidemiológicos sobre MRSA são escassos na literatura científica, bem como a caracterização dos perfis de virulência e resistência antimicrobiana das cepas isoladas. Em um estudo publicado em 2015, reportou-se que SC apresenta uma incidência de MRSA (4-8%) menor que a média nacional (20-50%). Assim, por esta epidemiologia diferencial relatada, a hipótese do presente estudo foi de que o perfil de sensibilidade aos antimicrobianos e de distribuição de genes de virulência das amostras MRSA apresentarão certo grau de diferença (maior sensibilidade) daqueles perfis encontrados em estudos de outras regiões brasileiras. Sob essa perspectiva, o objetivo desse projeto foi realizar a caracterização da resistência antimicrobiana *in vitro* de amostras de MRSA isoladas de pacientes atendidos em hospitais de SC, juntamente com a detecção de alguns genes de virulência. No total, 55 amostras de MRSA foram selecionadas e avaliadas através do teste de sensibilidade aos antimicrobianos (TSA) realizado a partir da metodologia de disco difusão em ágar, preconizado pelo Comitê Brasileiro de Testes de Sensibilidade Antimicrobiana (BrCAST) e pelo *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI), no qual foi feita a comparação da classificação da sensibilidade aos antimicrobianos entre os dois comitês. A detecção de genes de virulência foi realizada pela técnica de PCR (*Polymerase Chain Reaction*), avaliando a presença dos genes de virulência *tst*, *seg* e *seh* nas amostras. Em decorrência da pandemia de COVID-19, apenas 25 amostras puderam ser avaliadas quanto à detecção do gene *seh*. O resultado deste estudo relatou uma alta porcentagem de cepas resistentes aos antimicrobianos ciprofloxacino, eritromicina e clindamicina, revelando uma prevalência de cepas MDR (*multidrug-resistant*) na coleção de amostras. As principais divergências encontradas entre BrCAST e CLSI foram referentes a categorização dos antimicrobianos pertencentes à classe das fluoroquinolonas e o fenótipo de resistência para rifampicina. Sobre a caracterização da virulência, apenas 7,4% das amostras tiveram detecção dos genes *tst* e *seg*, e nenhuma para o gene *seh*. Através dos resultados obtidos neste estudo, a hipótese associando à baixa incidência de MRSA em SC com o perfil de resistência antimicrobiana e repertório de genes de virulência diferenciados de outras regiões foi refutada, pelo menos até o momento, sendo necessário a realização de novos experimentos e metodologias para averiguar com maior qualidade científica a concordância ou discordância da hipótese.

Palavras-chave: *Staphylococcus aureus*, MRSA, resistência antimicrobiana, genes de virulência

ABSTRACT

Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) is considered one of the main causes of healthcare-associated infections (HAI) in the world, thanks to its virulence genetic apparatus and ability to acquire several mechanisms of antimicrobial resistance. In the State of Santa Catarina (SC), epidemiological data on MRSA are scarce in the scientific literature, as well as the characterization of virulence and antimicrobial resistance profiles of the isolated strains. In a study published in 2015, SC was reported to have an incidence of MRSA (4-8%) lower than the national average. Thus, due to this reported differential epidemiology, the hypothesis of the present study was that the profile of susceptibility to antimicrobials and distribution of virulence genes of the MRSA samples will present a certain degree of difference from those profiles found in studies from other Brazilian regions. From this perspective, the objective of this project was to characterize the in vitro antimicrobial resistance of MRSA samples isolated from patients treated at SC hospitals, together with the detection of some virulence genes. In total, 55 MRSA samples were selected and evaluated through the antimicrobial susceptibility test (TSA) performed using the agar disk diffusion methodology, recommended by the Brazilian Committee for Antimicrobial Sensitivity Tests (BrCAST) and by the Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI), in which the classification of sensitivity to antimicrobials was compared between the two recommendations. The detection of virulence genes was performed by the PCR method (*Polymerase Chain Reaction*), evaluating the presence of virulence genes *tst*, *seg* and *seh* in the isolates. Due to the COVID-19 pandemic, only 25 samples could be evaluated for the detection of the *seh* gene. The result of this study reported a high percentage of strains resistant to the antimicrobials ciprofloxacin, erythromycin and clindamycin, revealing a prevalence of MDR (*multidrug-resistant*) strains in the sample collection. The main differences found between BrCAST and CLSI were related to the categorization of antimicrobials belonging to the fluoroquinolones and the rifampicin resistance phenotype. Regarding the characterization of virulence, only 7.4% of the samples had the detection of *tst* and *seg* genes, and none for the *seh* gene. Through the results obtained in this study, the hypotheses associating the low incidence of MRSA in SC to a differential antimicrobial resistance and virulence profiles have been refuted, at least so far, and it is necessary to carry out new experiments and methodologies to verify with greater scientific quality the agreement or disagreement of the hypothesis.

Keywords: *Staphylococcus aureus*, MRSA, antimicrobial resistance, virulence genes.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Estrutura geral das penicilinas, meticilina e oxacilina	17
Figura 2 – Algumas das principais classes de antimicrobianos utilizadas no tratamento de <i>S. aureus</i> e seus locais de ação.	20
Figura 3 – Perfil de sensibilidade aos antimicrobianos de uma amostra de <i>Staphylococcus aureus</i> caracterizada como MRSA.	22
Figura 4 – Teste para detecção da resistência induzível à clindamicina (Teste D).	25
Figura 5 – Comparação do perfil de cepas sensíveis a dose padrão aos antimicrobianos testados segundo as classificações do CLSI e BrCAST.	40
Figura 6 – Comparação do perfil de cepas sensíveis, aumentando exposição aos antimicrobianos e intermediárias testados segundo as classificações do CLSI e BrCAST.	41
Figura 7 – Comparação do perfil de cepas resistentes aos antimicrobianos testados segundo as classificações do CLSI e BrCAST.....	42
Figura 8 – Comparação do perfil de cepas resistentes a mais de um antimicrobiano segundo as classificações do CLSI e BrCAST.....	43
Figura 9 – TSA das amostras mais sensíveis e resistentes aos antimicrobianos.	45

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 – Dados das amostras clínicas de MRSA isoladas no Estado de Santa Catarina.	33
Quadro 2 - Informações dos iniciadores utilizados para a detecção dos genes.	37
Quadro 3 – Classificação da resistência antimicrobiana de acordo com os padrões preconizados pelo BrCAST e CLSI para cada amostra.	38
Quadro 4 – Amostras de MRSA com resultado positivo para detecção de pelo menos um dos genes <i>tst</i> , <i>seg</i> e <i>seh</i>	46

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Antimicrobianos utilizados no ensaio, sua concentração e pontos de corte do diâmetro dos halos que foram utilizados para classificação da sensibilidade segundo o preconizado pelo BrCAST e CLSI em 2021.	36
Tabela 2 - Perfil de sensibilidade aos antimicrobianos das 26 amostras de MRSA com tipagem <i>SCC_{mec} II</i>	43
Tabela 3 - Perfil de Sensibilidade aos Antimicrobianos das 25 amostras de MRSA com tipagem <i>SCC_{mec} IV</i>	44

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ATCC	Do inglês <i>American Type Culture Collection</i> (Coleção Americana de Culturas-Tipo)
AIDS	do inglês <i>Acquired Immunodeficiency Syndrome</i> (Síndrome da Imunodeficiência Adquirida)
BrCAST	do inglês <i>Brazilian Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing</i> (Comitê Brasileiro de Testes de Sensibilidade Antimicrobiana)
CA-MRSA	do inglês <i>Community-Acquired Methicillin-Resistant S. aureus</i> (infecções relacionadas às cepas de MRSA na comunidade)
CLSI	do inglês <i>Clinical and Laboratory Standards Institute</i> (Instituto de Padrões Clínicos e Laboratoriais)
DNA	do inglês <i>Desoxyribonucleic Acid</i> (ácido desoxirribonucleico)
DO	Densidade óptica
ESKAPE	(<i>Enterococcus faecium, Staphylococcus aureus, Klebsiella pneumoniae, Acinetobacter baumannii, Pseudomonas aeruginosa, Enterobacter spp.</i>)
EUCAST	do inglês <i>European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing</i> (Comitê Europeu de Testes de Susceptibilidade Antimicrobiana)
GLASS	do inglês <i>Global Antimicrobial Resistance and Use Surveillance System</i> (Resistência Antimicrobiana Global e Sistema de Vigilância de Uso)
HA-MRSA	do inglês <i>Hospital-Acquired Methicillin-Resistant S. aureus</i> (infecções relacionadas às cepas de MRSA em ambiente hospitalar)
HIV	do inglês <i>Human Immunodeficiency Virus</i> (Vírus da Imunodeficiência Humana)
HU/UFSC	Hospital Universitário Professor Polydoro Ernani de São Thiago da Universidade Federal de Santa Catarina
hVISA	do inglês <i>Heteroresistance-Vancomycin Staphylococcus aureus</i> (<i>Staphylococcus aureus</i> com heterorresistência à vancomicina)
IRAS	Infecções Relacionadas à Assistência à Saúde
IPCLS	Infecções Primárias de Corrente Sanguínea Laboratorial
LACEN/SC	Laboratório Central de Saúde Pública de Santa Catarina
MDR	do inglês <i>Multidrug-Resistant</i> (Multidroga-Resistente)
MLST	do inglês <i>Multilocus Sequence Typing</i> (Tipagem da Sequência Multi-locus)

MRSA	do inglês <i>Methicillin-Resistant Staphylococcus aureus</i> (<i>Staphylococcus aureus</i> Resistente à Meticilina)
MSSA	do inglês <i>Methicillin-Sensitive Staphylococcus aureus</i> (<i>Staphylococcus aureus</i> Sensível à Meticilina)
OMS	Organização Mundial da Saúde
PCR	do inglês <i>Polymerase Chain Reaction</i> (Reação em Cadeia da Polimerase)
PBP	do inglês <i>Penicillin-binding Protein</i> (Proteína de Ligação à Penicilina)
RNA	do inglês <i>ribonucleic acid</i> (ácido ribonucleico)
SC	Estado de Santa Catarina/Brasil
SCC _{mec}	do inglês <i>Staphylococcal Cassette Chromosome mec</i> (Cassete Cromossômico Estafilocócico <i>mec</i>)
ST	do inglês <i>Sequence Type</i> (Sequência Tipo)
TSA	Teste de Sensibilidade aos Antimicrobianos
UTI	Unidade de Terapia Intensiva
VISA	do inglês <i>Vancomycin-intermediate Staphylococcus aureus</i> (<i>Staphylococcus aureus</i> com Resistência Intermediária à Vancomicina)
VRSA	do inglês <i>Vancomycin-resistant Staphylococcus aureus</i> (<i>Staphylococcus aureus</i> Resistentes à Vancomicina)

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	15
2. JUSTIFICATIVA	31
3. OBJETIVOS	32
3.1 Objetivo Geral	32
3.2 Objetivos Específicos	32
4. METODOLOGIA.....	33
4.1 Amostras Clínicas de MRSA.....	33
4.2 Teste de Sensibilidade aos Antimicrobianos (TSA).....	35
4.3 Detecção dos Genes de Virulência	36
5. RESULTADOS	38
5.1 Ensaio de Sensibilidade aos Antimicrobianos por Disco-Difusão	38
5.2 Detecção dos Genes <i>tst</i> , <i>seg</i> e <i>seh</i>	45
6. DISCUSSÃO	47
7. CONCLUSÃO.....	59
8. PERSPECTIVAS.....	59
9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	60
APÊNDICE A – Valores de diâmetro de halo de Inibição de cada amostra para cada antimicrobiano testado em duplicata.....	68
APÊNDICE B – Valores de desvio padrão (DP) de cada amostra para cada antimicrobiano testado.....	70

1. INTRODUÇÃO

1.1 O Gênero *Staphylococcus* e a Espécie *Staphylococcus aureus*

Os microrganismos pertencentes ao gênero *Staphylococcus* destacam-se por sua relevância clínica. Até o momento, o gênero *Staphylococcus* consiste num total de 65 espécies e subespécies, tais como *Staphylococcus epidermidis* (*S. epidermidis*), *Staphylococcus haemolyticus* (*S. haemolyticus*), *Staphylococcus saprophyticus* (*S. saprophyticus*) e *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*), sendo causadoras de processos infecciosos importantes (BECKER *et al.*, 2014; ITIS, 2022).

Segundo suas características microscópicas fenotípicas, os estafilococos são identificados morfológicamente como cocos Gram-positivos, tendo um tamanho aproximado de 1 µm e com um arranjo característico similar à cachos de uvas em decorrência de sua divisão celular, mas podendo apresentar outros arranjos (isolados, aos pares ou em cadeias curtas) (LAKHUNDI & ZHANG, 2018). São imóveis, anaeróbios facultativos e não formadores de esporos. Macroscopicamente, suas colônias apresentam pigmentações variadas e podem produzir ou não hemólise quando as cepas são cultivadas em ágar sangue de carneiro (PEREIRA *et al.*, 2020).

A espécie *S. aureus* se sobressai dentro do gênero em incidência e gravidade de infecções, relacionada a sua capacidade de causar doenças mediadas por citolisinas, superantígenos e toxinas esfoliativas, além de poder atuar como agente patogênico das demais infecções provocadas por outros estafilococos (TONG *et al.*, 2015). Entre as infecções clínicas relevantes, podemos destacar: Infecções de pele e tecido moles (abscessos cutâneos, furúnculos, impetigo, síndrome da pele escaldada, celulite), infecções do tecido ósseo (osteomielite), artrite séptica, endocardite infecciosa, pneumonia, intoxicações alimentares, infecções de corrente sanguínea, como também a síndrome do choque tóxico (TONG *et al.*, 2015). Infecções relacionadas aos dispositivos médicos implantáveis (cateter endovenoso, sondas e próteses) também possuem *S. aureus* como agente patológico recorrente (NAKAJIMA *et al.*, 2021).

Sendo comensais e de comportamento oportunista, os estafilococos de importância clínica representam uma parte da microbiota da pele e de membranas mucosas de humanos e animais. As diferenças fisiológicas e anatômicas, como a espessura e dobras da pele, assim como nas densidades dos folículos capilares e das glândulas definem habitats distintos para a

microbiota, favorecendo espécies que possuam um arsenal de colonização superior às demais dentro do gênero (BECKER *et al.*, 2014). Tendo em foco a espécie *S. aureus*, o principal sítio anatômico de colonização localiza-se na região do epitélio anterior das narinas, mas sua distribuição estende-se com menos frequência por outras regiões do corpo, como axilas, vagina, faringe, períneo, trato urinário, trato intestinal, umbigo (em crianças) e outras regiões da pele (SIMÕES-SILVA *et al.*, 2018). Estima-se que 30% da população mundial saudável seja colonizada de forma assintomática por *S. aureus* na cavidade nasal, sendo destes 10% a 20% colonizados permanentemente e 30% a 50% colonizados de forma intermitente (RYU *et al.*, 2014).

Essa colonização assintomática por *S. aureus* acarreta um grande problema para a saúde pública no quesito de disseminação. Tendo as narinas colonizadas, o indivíduo é capaz de contaminar o ambiente ou outros indivíduos não colonizados através do contato com as mãos contaminadas, ou por produção de aerossol. Desse modo, ambientes contendo indivíduos susceptíveis a infecções por *S. aureus* como o ambiente hospitalar, são locais de grande alerta para propagação deste microrganismo, por conter pacientes em unidades de terapia intensiva (UTI), berçários, pacientes que realizaram diálise e quimioterapia no local, queimados e pacientes imunodeprimidos, como também indivíduos com HIV em fase AIDS e transplantados. A disseminação deve ser evitada realizando medidas de controle, como a limpeza do ambiente e a higienização das mãos por visitantes, profissionais da saúde e outros pacientes da unidade (DOS SANTOS *et al.*, 2021; SANTOS *et al.*, 2007).

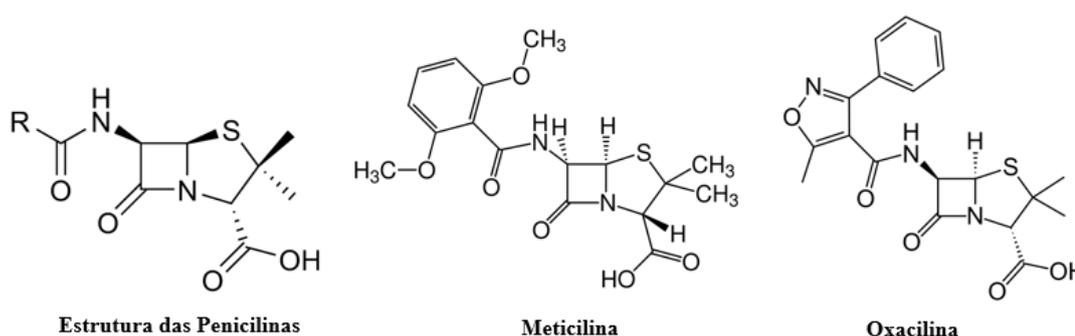
Além de *S. aureus* atuar como um agente importante em infecções relacionadas à assistência à saúde (IRAS), este patógeno também é encontrado como causa de infecções oriundas do ambiente comunitário. Infecções comunitárias por esta bactéria têm chamado atenção de diversos países, inclusive o Brasil, devido a sua rápida emergência, aumento da prevalência e gravidade das infecções causadas, principalmente por estirpes de *S. aureus* resistentes ao tratamento convencional com antimicrobianos (EVANGELISTA *et al.*, 2015). Desse modo, a patogenicidade de *S. aureus* é de grande preocupação, pois sendo uma bactéria que coloniza grande parte da população e de comportamento oportunista, a mesma poderá facilmente promover uma infecção, dependendo da circunstância clínica. Além disso, esta bactéria possui um grande potencial de produzir diversos fatores de virulência que podem levar a indivíduos mais susceptíveis a desenvolver formas mais severas das infecções (FIGUEIREDO & FERREIRA, 2014; PARASTAN *et al.*, 2020).

1.2 *Staphylococcus aureus* resistente à meticilina (MRSA)

Ao longo da evolução da vida no planeta, as bactérias adquiriram diversos mecanismos adaptativos para resistir a substâncias antimicrobianas. Porém, o uso excessivo e/ou desnecessário de antimicrobianos, bem como a falta da implementação de políticas de saúde pública aceleram o processo de surgimento de mecanismos de resistência aos antimicrobianos, associado ao aumento da pressão seletiva dos fármacos utilizados sobre as bactérias (LABARCA & ARAOS, 2009; SILVA & AQUINO, 2018). Como resultado, muitas cepas bacterianas clínicas são resistentes a antibióticos atualmente, como o caso de cepas de *S. aureus* (MUKHERJEE *et al.*, 2021).

Os primeiros relatos documentados de infecções causadas por *S. aureus* resistentes a antibióticos β -lactâmicos começaram aparecer a partir do início da década de 1940. Durante esse período, as infecções ocasionadas por *S. aureus* eram tratadas com a penicilina, antibiótico ativo contra a síntese de parede celular bacteriana, cujo a descoberta deu-se na década de 1920 pelo médico Alexander Fleming (TURNER *et al.*, 2019). No entanto, logo se surgiram cepas resistentes às penicilinas naturais, antimicrobianos que possuem o anel β -lactâmico, estrutura química do fármaco essencial para que ocorra seu efeito bactericida. Por este motivo, a partir de 1960 a indústria farmacêutica produziu em laboratório um novo grupo de penicilinas (como a meticilina e a oxacilina), que possuem um anel β -lactâmico modificado e, por isto, eram eficazes contra estas estirpes resistentes em infecções nosocomiais (Figura 1).

Figura 1 – Estrutura geral das penicilinas, meticilina e oxacilina



Fonte: Adaptado de SIDELL *et al.*, 1963.

Contudo, mesmo com a comercialização e uso dessas penicilinas semissintéticas na terapia medicamentosa, após um ano de uso já foi observado o surgimento de isolados resistentes aos novos fármacos, e alguns anos adiante aos demais antimicrobianos β -lactâmicos (como as cefalosporinas), dando origem a nomeação desses isolados com a sigla

MRSA (*Staphylococcus aureus* Resistente à Meticilina; do inglês: *Methicillin-resistant S. aureus*) (ASADOLLAHI *et al.*, 2018; LIMA *et al.*, 2015; OTTO, 2013; TURNER *et al.*, 2019).

Ao decorrer desse período, cepas de MRSA começaram a ocasionar surtos de IRAS pelo mundo, sobretudo ligadas ao ambiente hospitalar e infecções invasivas, sendo denominadas comumente HA-MRSA (do inglês: *Hospital-acquired S. aureus*) (DUERDEN, 2012). Contrapondo o que era observado anteriormente, a partir do final da década de 1980 surgiram as primeiras evidências de casos de infecções relacionadas à cepas de MRSA na comunidade (CA-MRSA; do inglês: *Community-acquired S. aureus*). Os primeiros casos de infecções invasivas envolvendo MRSA foram relatados em indivíduos usuários de drogas injetáveis na cidade de Detroit nos Estados Unidos, assim como casos emergentes em populações indígenas em áreas remotas no oeste da Austrália (EVANGELISTA *et al.*, 2015; SOWASH *et al.*, 2014). Uma década após os primeiros casos de cepas CA-MRSA, diversos outros foram descritos ao redor do planeta. O MRSA desde então passou a colonizar indivíduos saudáveis, que não são expostos a fatores de riscos comumente encontrados no ambiente hospitalar, ocasionando uma alteração no perfil epidemiológico deste microrganismo resistente até a atualidade (ABDULLAHI *et al.*, 2021).

Sobre o território nacional, dados do último boletim de segurança do paciente e qualidade dos serviços de saúde do Brasil de 2020, publicado pela Anvisa e que avalia os indicadores de IRAS e resistência microbiana, relata um percentual alto de cepas MRSA circulantes. De 2572 isolados de *S. aureus* identificados em infecções primárias de corrente sanguínea laboratorial (IPCSL) ocorridas em UTI adulta, 1515 (60,8%) apresentaram resistência à oxacilina (ANVISA, 2020). O Brasil também faz parte do programa instituído em 2015 pela Organização Mundial de Saúde (OMS), denominado de GLASS (do inglês: *Global Antimicrobial Resistance and Use Surveillance System*), tendo instituições do Estado do Paraná como pioneiras na implementação. De acordo com os dados divulgados, 23,3% dos isolados reportados de *S. aureus* eram MRSA (PILLONETTO *et al.*, 2021).

Outros estudos feitos por grupos de pesquisa envolvendo o Brasil também são encontrados na literatura reportando as taxas de MRSA. Um levantamento feito por Lee e colaboradores (2018) apontou o Brasil como um dos países com alta porcentagem de isolados MRSA, chegando a estimativas de até 50% de prevalência, de acordo com as referências utilizadas (LEE *et al.*, 2018). Em seu estudo de coorte, Arias e Colaboradores (2018) realizaram um panorama do perfil epidemiológico de MRSA em 9 países da América Latina,

no qual apontou que o Brasil apresenta uma das maiores taxas (62%) de infecções de corrente sanguínea associadas à MRSA em hospitais (ARIAS *et al.*, 2018). Outro estudo de coorte de caráter prospectivo realizado por Seas e Colaboradores (2018) avaliou o impacto de bacteremias por *S. aureus* em 24 hospitais de 9 países da América Latina, incluindo o Brasil. Foi reportado no estudo que, das amostras oriundas dos hospitais brasileiros, o MRSA tinha um maior destaque (SEAS *et al.*, 2018). Em vista disso, a disseminação do MRSA é preocupante para o país, pois além dos isolados de MRSA já estarem presentes em todas as cinco regiões do Brasil, todas as estirpes apresentam uma grande diversidade genética, incluindo isolados multirresistentes e de alta virulência (ANDRADE *et al.*, 2020).

Em Santa Catarina, poucos estudos publicados foram encontrados envolvendo a pesquisa de amostras MRSA. Em Pomerode, um estudo populacional foi realizado por Feldhaus e colaboradores (2016), contabilizando a porcentagem de colonização por *S. aureus* nos moradores do município. Neste estudo, observou-se na amostra populacional uma colonização nasal por *S. aureus* de 17%, sendo que não foi detectado resistência à cefoxitina (FELDHAUS *et al.*, 2016). Outros 2 estudos publicados por uma mesma equipe de pesquisadores de Blumenau e Porto Alegre também trabalharam com amostras de MRSA de Santa Catarina isoladas de amostras clínicas de pacientes hospitalizados. Silveira e colaboradores (2015a, 2015b) avaliaram as características epidemiológicas de isolados de MRSA no Estado, a fim de estabelecer uma relação da disseminação clonal com a epidemiologia encontrada em outras regiões brasileiras; como também os membros da equipe determinaram características epidemiológicas e moleculares de cepas de MRSA isoladas em hospitais de Blumenau e Florianópolis, quanto a resistência a diversos antimicrobianos. Os pesquisadores reportaram baixas taxas no isolamento de MRSA (4-8%) em infecções ocasionadas por *S. aureus* em Santa Catarina, e estimam que essa taxa seja menor ainda quando considerado apenas isolados nosocomiais (<2%) (SILVEIRA *et al.*, 2015a; SILVEIRA *et al.*, 2015b).

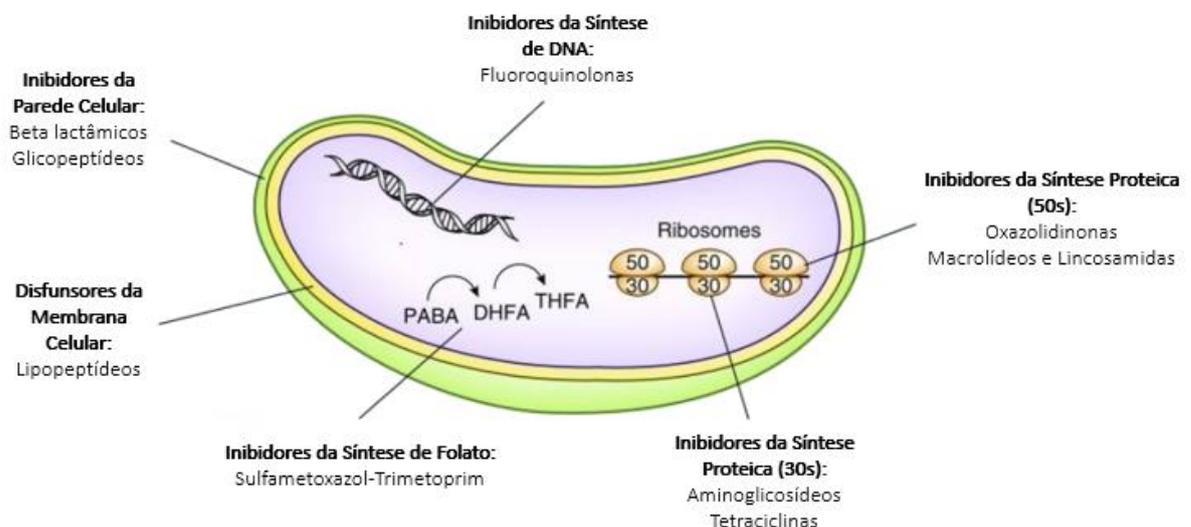
1.3 Resistência antimicrobiana em *Staphylococcus aureus*

S. aureus é conhecido por apresentar grande habilidade para o desenvolvimento de resistência frente ao tratamento com antimicrobianos. Ele está inserido dentro do grupo “ESKAPE”, em que cada letra da sigla representa um patógeno que é considerado uma grande ameaça à saúde global, devido a adaptação de resistir aos tratamentos convencionais com

antimicrobianos, sobretudo relacionados ao ambiente hospitalar (DE OLIVEIRA *et al.*, 2020). O tratamento contra infecções ocasionadas por *S. aureus* pode ser realizado por uma gama de classes distintas de antimicrobianos, dentre eles: Penicilinas, cefalosporinas, carbapenêmicos, fluoroquinolonas, aminoglicosídeos, macrolídeos, lincosamidas, tetraciclina, glicopeptídeos, oxazolidinonas e outros agentes diversos, dos quais a resistência antimicrobiana já foi relatada para pelo menos um antimicrobiano de cada classe (BrCAST, 2021; MULANI *et al.*, 2019; WAN-TING *et al.*, 2021).

A resistência pode se dar de forma intrínseca, na qual *S. aureus* apresenta características estruturais e funcionais únicas, que oferecem resistência a certos antimicrobianos [por exemplo, as polimixinas, por não possuírem membrana externa e lipopolissacarídeos (LPS), onde o antimicrobiano atua] ou de forma adquirida, herdada através do código genético de outras bactérias através de mecanismos de transferência horizontal de genes, como transformação, transdução e conjugação (ABUSHAHEEN *et al.*, 2020). Os principais antimicrobianos utilizados em infecções contra *S. aureus* atuam em diversos sítios alvo: Síntese da parede celular, desestabilizadores da membrana plasmática celular, síntese proteica e de DNA, assim como na interrupção do metabolismo bacteriano de moléculas importantes (Figura 1). Algumas das estratégias de resistência antimicrobiana envolvem a inativação dos antimicrobianos por enzimas e outros agentes, redução do acúmulo intracelular dos antimicrobianos e por alterações dos sítios alvo de ligação do fármaco (ABUSHAHEEN *et al.*, 2020; EYLER *et al.*, 2019).

Figura 2 – Algumas das principais classes de antimicrobianos utilizadas no tratamento de *S. aureus* e seus locais de ação.



Fonte: Adaptado de EYLER *et al.*, 2019.

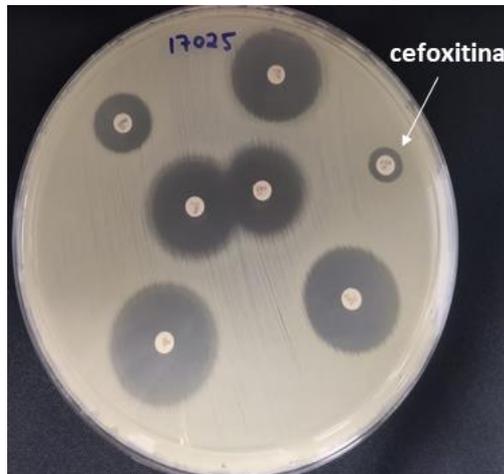
A classificação de cepas resistentes aos antimicrobianos pode dar-se de 3 formas: MDR (Multi-droga resistente; do inglês: *Multidrug-resistant*), quando a bactéria é resistente a um ou mais antimicrobianos de três ou mais categorias testadas.; XDR (Extensivamente droga-resistente; do inglês: *Extensively drug-resistant*), quando o microrganismo é resistente a um ou mais antimicrobianos em quase todas categorias (exceto uma ou duas); e por fim e mais raro na natureza, a classificação de PDR (Pandrogra-resistente; do inglês: *Pandrug-resistant*), quando há resistência a todos os agentes antimicrobianos testados (MAGIORAKOS *et al.*, 2012).

Um dos primeiros mecanismos de resistência antimicrobiana observados em *S. aureus* relaciona-se com a degradação de antibióticos β -lactâmicos, como as penicilinas, cefalosporinas, carbapenêmicos e monobactâmicos, classes que têm sofrido um desenvolvimento contínuo desde sua introdução original, a fim de melhorar propriedades como potência, espectro de atividade, perfis farmacocinéticos e de segurança para combater o surgimento da resistência (TOOKE *et al.*, 2019). Os β -lactâmicos atuam inibindo a última etapa na síntese de peptidoglicano, impossibilitando a formação das pontes cruzadas entre as unidades de peptideoglicano da parede, por ligarem-se a proteínas denominadas de proteínas de ligação à penicilina (PBPs; do inglês: *Penicillin-binding Protein*) que realizam este processo, sendo, portanto, bactericidas (YAHAV *et al.*, 2020). A degradação das penicilinas por cepas que apresentam resistência deve-se à capacidade bacteriana de sintetizar enzimas denominadas de β -lactamases, com o poder de hidrolisar e inativar o anel β -lactâmico presente na estrutura química da penicilina, no qual é essencial para o efeito terapêutico deste antibiótico. Essa resistência é codificada pela presença do gene *blaZ*, localizado no DNA plasmidial estafilocócico, passível de ser transferido por transdução e conjugação (LAKHUNDI & ZHANG, 2018). Atualmente, já foram descritas na literatura científica mais de 7378 β -lactamases, classificadas de acordo com diversos parâmetros, como grupo funcional e perfil inibitório (BLDB, 2022).

Mesmo após o surgimento das penicilinas semi-sintéticas resistentes à β -lactamases, *S. aureus* foi capaz de desenvolver resistência a esse tratamento, no qual é responsável pela sua nomeação como MRSA. A resistência à meticilina e análogos é causada pela presença do gene *mecA*, responsável por codificar uma forma diferenciada de PBP, denominada de PBP2a ou PBP2', localizada na membrana celular bacteriana e que possui uma afinidade reduzida pela

meticilina e β -lactâmicos no geral (com exceção das cefalosporinas de 5ª geração anti-MRSA: Ceftarolina e Ceftobiprole), ocasionando desse modo a continuação da síntese peptidoglicana, mesmo na presença desses fármacos. A resistência ocasionada por este mecanismo pode ser avaliada *in vitro* por meio do método de disco-difusão. Um disco do antimicrobiano cefoxitina com concentração de 30 μ g é utilizado como marcador para pesquisa da resistência mediada pelo gene *mecA*, na qual a formação de um halo igual ou menor a 22cm de diâmetro indica a presença do gene (Figura 3) (BrCAST, 2021).

Figura 3 – Perfil de sensibilidade aos antimicrobianos de uma amostra de *Staphylococcus aureus* caracterizada como MRSA.



A seta aponta o disco de cefoxitina, marcador de resistência as cefalosporinas (até a 4ª geração) e todos os outros β -lactâmicos, que apresentou um halo menor ou igual a 22cm de diâmetro, classificando esta cepa como MRSA.

Fonte: O autor, 2022.

Todos os genes que participam deste mecanismo de resistência estão localizados em um elemento genético cromossômico móvel denominado de cassete cromossômico estafilocócico *mec* (*SCCmec*) (ASADOLLAHI *et al.*, 2018.; FIGUEIREDO & FERREIRA, 2014). Até o momento, foram identificados na literatura 13 tipos de *SCCmec* (I-XIII), classificados de acordo com o tamanho e distribuição de genes (URUSHIBARA *et al.*, 2020).

A pesquisa do tipo de *SCCmec* presente no genoma estafilocócico (tipagem *SCCmec*) auxilia na distinção de linhagens de MRSA. Esse elemento genético móvel também pode carrear genes de resistência a metais pesados e fatores de virulência que facilitam, por exemplo, o sucesso da colonização e o escape ao sistema imune do organismo hospedeiro (BHOWMIK *et al.*, 2021; LIU *et al.*, 2021). O elemento genético móvel *SCCmec* é composto por dois complexos genéticos essenciais, o complexo *mec* e o complexo *ccr*, sendo composto também por regiões J (denominadas de *junkyard*), que se localizam entre e ao redor dos complexos *mec* e *ccr*. O complexo *mec* é composto pelo gene *mecA*, seus componentes reguladores (*mecR1* e

mecI) e por seqüências de inserção associadas, que conferem a resistência aos β -lactâmicos. O complexo *ccr* codifica genes que realizam a excisão e integração do SCC*mec* do cromossomo, conferindo a mobilidade do mesmo. Finalizando a constituição do cassete, as regiões J carregam outros genes não essenciais para a célula, porém podendo conter genes responsáveis pela resistência bacteriana à antibióticos não β -lactâmicos (IWG-SCC, 2009).

Além da tipagem SCC*mec*, a tipagem feita pelo método *Multilocus Sequence Typing* (MLST) também é utilizada para diferenciação das linhagens de MRSA. Esse método promove a distinção dos genes *housekeeping*, dos quais sempre estão presentes no genoma estafilocócico por codificarem funções essenciais, e podem ser utilizados para distinguir ou correlacionar cepas, por exemplo, em casos de surtos (BADILLA-LOBO & RODRÍGUEZ, 2021). Através da seqüência de nucleotídeos destes genes, atribui-se um número referente à seqüência de um determinado locus, intitulado de *sequence type* (ST), que são armazenados em bancos de dados de acesso coletivo, possibilitando a comparação com isolados do mundo todo. No Brasil, as linhagens de MRSA mais incidentes reportadas até o momento são a ST5-SCC*mec*II, ST1-SCC*mec*IV, ST30-SCC*mec*IV e ST239-SCC*mec*III (BADILLA-LOBO & RODRÍGUEZ, 2021; SILVA *et al.*, 2020).

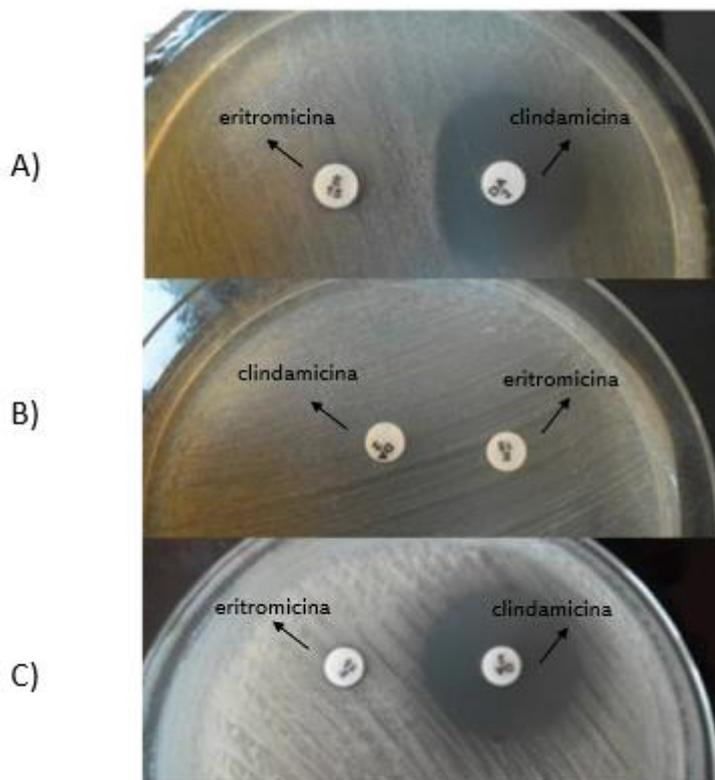
Além dos β -lactâmicos, mecanismos de resistência foram adaptados por *S. aureus* para contornar a terapia com outras classes de antimicrobianos. A resistência contra as fluoroquinolonas, por exemplo, utilizadas no tratamento de bactérias gram-positivas e gram-negativas, atuam na inibição das enzimas topoisomerase II (DNA girase) e topoisomerase IV, que são fundamentais para a replicação do DNA procarioto. O processo de resistência nesse caso, deve-se principalmente a mutações nos genes *gyrA* e *gyrB* (codificadores das topoisomerases), que diminuem a afinidade de ligação do fármaco (PHILLIPS-JONES *et al.*, 2018). Os aminoglicosídeos e as tetraciclina possuem o mecanismo de ação atuante na subunidade 30S do ribossomo bacteriano, ocasionando um erro na leitura do código genético e prejudicando a síntese de proteínas, essenciais para a sobrevivência da célula. *S. aureus* resiste aos aminoglicosídeos por meio de uma variedade de mecanismos de resistência, dentre eles mutações de base no sítio A do rRNA 16S e substituições de aminoácidos em proteínas ribossômicas, através das enzimas modificadoras de aminoglicosídeos (AMEs) (WACHINO *et al.*, 2020). As tetraciclina contam com um mecanismo de enzimas de proteção ribossomal, mediada pelo grupo de genes *tet*, dos quais são amplamente distribuídos e que possuem diversas variações. Os produtos destes genes ocasionam um desligamento das tetraciclina do sítio alvo

de ação, permitindo que o ribossomo permaneça em sua conformação normal, e a síntese proteica continue (GOUDARZI *et al.*, 2019; WACHINO *et al.*, 2020).

Outras classes de antimicrobianos que atuam na síntese proteica são os macrolídeos e as lincosamidas. Apesar de serem estruturalmente diferentes, estes fármacos possuem o mesmo mecanismo de ação. Os fármacos destas classes, diferente dos aminoglicosídeos, atuam na subunidade 50S do ribossomo bacteriano, interferindo principalmente na tradução, bloqueando o “túnel de saída” do complexo ribossômico. O principal mecanismo documentado de resistência é a mudança da conformação do sítio ativo dos fármacos através da metilação provocada por enzimas codificadas pelo grupo de genes *erm* (metilase ribossomal de eritromicina; do inglês: *erythromycin ribosomal methylase*), que confere resistência aos macrolídeos, lincosamidas e estreptogramina B, denominado de resistência MLSB (MIKLASINSKA-MAJDANIK, 2021).

Essa resistência pode ser constitutiva ou induzível em cepas de *S. aureus*. Há estirpes que possuem os genes *erm*, porém necessitam de um agente indutor para sua expressão, o que pode ser avaliado *in vitro* para o antimicrobiano clindamicina para detecção do fenótipo. Durante o teste de sensibilidade aos antimicrobianos (TSA), aproxima-se os discos dos antimicrobianos eritromicina e clindamicina a uma distância de 12-20 mm borda a borda. Caso a cepa possua fenótipo MLSB induzível (iMLSB), a eritromicina (resistente) induzirá a expressão dos genes *erm* e a clindamicina, que apareceria sensível no teste, terá um achatamento na borda próxima ao disco da clindamicina, exibindo uma zona de inibição em forma de D (denominado de Teste D), indicando a presença do fenótipo MLSB (Figura 2). Esse fenótipo deve ser reportado para evitar uma falsa sensibilidade à clindamicina, caso o tratamento de pacientes utilize agentes indutores para este fenótipo e acabe causando uma falha terapêutica (BOTTEGA *et al.*, 2014; BrCAST, 2021).

Figura 4 – Teste para detecção da resistência induzível à clindamicina (Teste D).



Legenda: A) Resistência induzível (iMLS_B), B) Resistência Constitutiva (MLS_B), C) Cepa sensível à clindamicina (fenótipo M) e negativa para o fenótipo de resistência induzível.

Fonte: Adaptado de MIKLASINSKA-MAJDANIK, 2021.

Para o tratamento de infecções severas causadas por essas cepas resistentes aos β -lactâmicos e demais classes de antimicrobianos, a classe dos glicopeptídeos, tendo como representantes a teicoplanina e vancomicina, foi implementada de forma alternativa como um dos recursos finais na terapia medicamentosa (APPELBAUM, 2007). Contudo, o desenvolvimento de resistência foi detectado logo após um curto período de uso. Observou-se em laboratório cepas com resistência intermediária à vancomicina, denominadas de VISA (*Staphylococcus aureus* com resistência intermediária à vancomicina; do inglês: *Vancomycin-intermediate Staphylococcus aureus*) e hVISA (*Staphylococcus aureus* com heteroresistência à vancomicina; do inglês: *Heteroresistance-vancomycin Staphylococcus aureus*). As cepas VISA possuem na sua totalidade uma resistência intermediária à vancomicina (requerem doses maiores do que a padrão de vancomicina para inibição total do crescimento), enquanto as cepas hVISA possuem uma subpopulação que é totalmente sensível à vancomicina ao serem avaliadas *in vitro* (APPELBAUM, 2007). A vancomicina e a teicoplanina atuam em uma molécula intermediária no processo de maturação da camada de peptidoglicano da parede celular

bacteriana, comprometendo a integridade da mesma, decorrente do estresse osmótico que resulta na lise do microrganismo (STOGIOS & SAVCHENKO, 2020). Para estirpes classificadas como VISA e hVISA, a resistência apresenta-se por um mecanismo de espessamento da camada de peptidoglicano pela super produção do intermediário D-Ala D-Ala durante a síntese metabólica. Em consequência disso, parte da concentração do fármaco acaba ficando retida na camada espessa, e não consegue alcançar o sítio alvo por completo, o que acaba exigindo maiores doses ou prolongamento do tratamento medicamentoso dos pacientes infectados (SHARIATI et al., 2020).

Embora seja raro e não disseminado no mundo como a resistência aos β -lactâmicos, a resistência total à vancomicina também já foi reportada. Esse mecanismo pode ser ocasionado pela aquisição de um elemento genético denominado transposon Tn1546, no qual está presente no plasmídeo enterocócico, que pode ser transferido para cepas de *S. aureus*. Esse transposon pode carrear os genes *vanA*, *vanB* ou *vanC*, que codificam um terminal alterado de aminoácidos (substituição do terminal D-Ala-D-Ala por D-Ala-D-Lac ou D-Ala-D-Ser) essenciais para a interação com a vancomicina, levando assim a diminuição da afinidade do substrato pelo sítio de ligação. Essas cepas foram denominadas de VRSA (*Staphylococcus aureus* Resistentes à Vancomicina; do inglês: *Vancomycin-resistant Staphylococcus aureus*) (SHEKARABI, et al., 2017; SIMJEE et al., 2002).

De forma similar aos glicopeptídeos, as oxazolidinonas como linezolida e tedizolida são utilizadas em últimos recursos de infecções mais graves por *S. aureus*, como em pneumonias causadas por MRSA (HASHEMIAN et al., 2018). Elas atuam como inibidoras da síntese proteica como os macrolídeos e lincosamidas, tetraciclina e aminoglicosídeos, combinando-se com um local no RNA ribossômico 23S bacteriano da subunidade 50S, impedindo a formação do complexo de iniciação 70S funcional. A principal resistência a esta classe deve-se a mutações na unidade 23S, onde se localiza o sítio de ligação do fármaco (HASHEMIAN et al., 2018.; LIU et al., 2020).

Outros agentes utilizados no tratamento de infecções por *S. aureus*, em grande parte em associação, são a rifampicina, sulfametoxazol-trimetoprim e a daptomicina. A rifampicina atua inibindo o processo de transcrição do DNA bacteriano, devido a sua ligação de alta afinidade e inibição da RNA polimerase dependente de DNA. A resistência à rifampicina ocorre em bactérias pelo desenvolvimento de uma mutação no gene *rpoB*, que afeta a subunidade β da RNA polimerase, que é o principal alvo desse fármaco (ABUSHAHEEN et al., 2020; CAMPBELL et al., 2001).

O sulfametoxazol, como outras sulfonamidas, é um inibidor competitivo da diidropteroato sintase, uma enzima bacteriana envolvida na produção de um precursor do ácido fólico, utilizado para multiplicação celular e, assim, exerce atividade bacteriostática. Ele é utilizado em conjunto com outro fármaco, o trimetoprim, que inibe a dihidrofolato redutase, uma outra enzima envolvida na produção de ácido fólico. A resistência ao sulfametoxazol-trimetoprim em *S. aureus* ocorre por uma substituição em um único aminoácido (Phe98 por Tyr98) da enzima dihidrofolato redutase, codificada pelo gene *dhfr*, última enzima da síntese do folato (ABUSHAHEEN *et al.*, 2020; EYLER *et al.*, 2019).

A daptomicina, um lipopeptídeo cíclico, liga-se à membrana citoplasmática bacteriana, levando a despolarização, devido à perda de íons potássio do citoplasma. Apesar da resistência em isolados de *S. aureus* serem raras e incomuns, há relatos de cepas não sensíveis à daptomicina (CASANOVA *et al.*, 2017). Mecanismos propostos para sua resistência levam em conta o aumento da carga superficial positiva da membrana bacteriana, causada pelo aumento de fosfolipídeos em sua camada externa; a alteração na fluidez da membrana bacteriana devido a mudanças na composição dos ácidos graxos; e o aumento da síntese de ácido teicóico na parede celular (CASANOVA *et al.*, 2017).

Além de todos os mecanismos específicos descritos para cada classe, *S. aureus* conta com mecanismos de resistência a múltiplos fármacos. As bombas de efluxo, expressas pelo gene *norA* e *MepA*, diminuem a concentração intracelular de diversos fármacos por causar o influxo dos mesmos. Fora isso, *S. aureus* também expressa bombas de efluxo transmembrana específicas para classes distintas de antimicrobianos, como fluoroquinolonas, macrolídeos, aminoglicosídeos e tetraciclínas (ABUSHAHEEN *et al.*, 2020; GOUDARZI *et al.*, 2019; PHILLIPS-JONES *et al.*, 2018; WACHINO *et al.*, 2020).

1.4 Perfil de Virulência em *Staphylococcus aureus*

Os fatores de virulência relacionados a *S. aureus* variam em sua presença ou expressão de acordo com os clones disseminados em uma região ou ambiente, visto que muitos dos genes que codificam estes fatores estão associados a elementos genéticos móveis, que podem modular o arsenal de virulência genética de cepas estafilocócicas e assim, a diversidade de infecções que *S. aureus* pode causar (LEE *et al.*, 2018). Os principais genes de virulência vinculados a *S. aureus* atuam nas funções de colonização (com genes que codificam para adesinas e invasinas,

como proteínas de superfície e glicopolímeros), evasão do sistema imunológico (com genes que codificam para evasinas, como fatores de coagulação, inibidores do sistema complemento, inibidores de opsonização, formação de biofilme, etc) e dano tecidual (genes que codificam para toxinas, como toxinas formadoras de poros na membrana do hospedeiro e toxinas superantígenos) (SANTOS *et al.*, 2007).

A infecção por *S. aureus* inicia-se quando as células bacterianas se ligam às moléculas da superfície da célula hospedeira ou da matriz extracelular, a partir da expressão de proteínas de adesão (SANTOS *et al.*, 2007). Essas proteínas possuem um vasto perfil, dependendo do tecido alvo a ser colonizado durante a infecção. Algumas adesinas expressas por *S. aureus* são as proteínas *bap* (proteína associada ao biofilme), *clfA*, *clfB* (fatores de aglutinação A e B), *fnbpA*, *fnbpB* (proteínas de ligação à fibronectina A e B), *cna* (proteína de ligação ao colágeno), *bbp* (proteína de ligação à sialoproteína óssea), *isdA*, *isdB* (determinantes de superfície regulados por ferro A e B), *SdrD*, *SdrE* (proteínas de repetição serina-aspartato D e E) e *spa* (proteína A estafilocócica) (SANTOS *et al.*, 2017). A maior parte dos fatores de virulência possui distribuição variável entre as diferentes linhagens de MRSA, independente da sensibilidade à metilina (SANTOS *et al.*, 2017).

Sugere-se que as toxinas causadoras de lise ou rompimento de membranas celulares do tecido infectado possam ser produzidas para obtenção de nutrientes essenciais para a sobrevivência do microrganismo (HUSEBY *et al.*, 2007). Porém, mais estudos são necessários para compreender melhor a atuação biológica dos fatores bacterianos associados a dano tecidual do hospedeiro. Além de danificar as membranas celulares do hospedeiro, também se sugere que estes fatores possuem participação na modulação da resposta imune (OLIVEIRA *et al.*, 2018). As principais toxinas presentes em *S. aureus* podem ser classificadas como: Toxinas formadoras de poros, toxinas esfoliativas e superantígenos. Dentre as principais toxinas causadoras de rompimento celular produzidas por *S. aureus* podemos citar: as hemolisinas α , β , Δ e γ (codificadas pelos genes *hla*, *hlb*, *hlD* e *hlG*, respectivamente); a Leucocidina Pantón-Valentine (PVL; codificada pelos genes *lukF-PV* e *lukS-PV*), responsável pela lise de leucócitos e outras células pela formação de poros na membrana celular; uma das toxinas superantígeno causadoras da síndrome do choque tóxico (codificada pelo gene *tst*) e as enterotoxinas estafilocócicas, classificadas de A à U (codificadas pelos genes *sea* – *seu*) responsáveis por intoxicações alimentares. Algumas enterotoxinas também atuam como superantígenos e podem estar relacionadas à síndrome do choque tóxico, como a enterotoxina B (OLIVEIRA *et al.*, 2018; SANTOS *et al.*, 2017).

S. aureus também é capaz de produzir substâncias que prejudicam a sinalização e combate do sistema imunológico contra a infecção. A enzima coagulase produzida por *S. aureus* causa a formação de um coágulo de fibrina circundando as células bacterianas, impedindo assim o fluxo de leucócitos (DEJONG *et al.*, 2019). Além disso, *S. aureus* pode impedir a opsonização, por exemplo, pela produção de uma microcápsula de polissacarídeo e inibição da cascata do complemento (GOLDMANN *et al.*, 2018). Dentre os genes que contribuem para a fuga do processo imunológico do hospedeiro, podemos citar a proteína de ligação ao fator de von Willebrand (codificada pelo gene *vWbp*); a leucocidina DE (codificada pelos genes *lukD/lukE*), que causa lise de células imunes específicas, assim como a PVL; os inibidores da opsonização para o processo fagocitário, como a proteína A estafilocócica (Spa) e adenosina sintase (Ads); e inibidores do complemento como a proteína de ligação à imunoglobulina (Sbi), a proteína de ligação ao fibrinogênio (Efb) e as modulinas fenol solúveis (PSM), que além de ocasionarem lise de neutrófilos e eritrócitos, também podem contribuir para a formação do biofilme (DEJONG *et al.*, 2019; GOLDMANN *et al.*, 2018; LEE *et al.*, 2018, NAJARZADEH *et al.*; 2021).

Outra forma de evasão do sistema imunológico por *S. aureus* é a sua habilidade de formar biofilme, que além de dificultar a defesa do hospedeiro, causam a resistência contra interferências mecânicas, como também diminuem a permeação de antibióticos durante o tratamento medicamentoso (LEE *et al.*, 2018). Biofilmes são agregações multicelulares bacterianas incorporadas em uma matriz que facilita a sobrevivência dos microrganismos em ambientes hostis ou extremos (MOORMEIER *et al.*, 2017). Devido a esse mecanismo biológico, *S. aureus* tornou-se uma causa frequente de infecções associadas a dispositivos médicos implantáveis, tais como cateteres, próteses, válvulas cardíacas artificiais e ventiladores mecânicos, por conseguir sobreviver por um tempo prolongado em superfícies abióticas, como plástico e metal (LISTER *et al.*, 2014). Os biofilmes produzidos por *S. aureus* são classificados como *ica*-dependentes e *ica* independentes. Biofilmes *ica*-dependentes são produzidos a partir da síntese de polissacarídeos (PIA) ou N-acetilglucosamina polimérica (PNAG), codificados por genes pertencentes ao operon *icaADBC*. Na formação de biofilmes *ica*-independentes, outros substratos são incorporados na matriz, regulados por diversos genes como *bap* (codificante da proteína associada ao biofilme), *fnbpa* e *fnbpb* (codificantes das proteínas de ligação à fibronectina A e B), *strA* (codificante da enzima sortase A), *sasG* (codificante da

proteína de superfície G), *sasX* (codificante da proteína LPXTG) e dentre outros genes, de acordo com a linhagem das estirpes infectantes (FIGUEIREDO *et al.*, 2017).

2. JUSTIFICATIVA

Infecções associadas a bactérias resistentes a antimicrobianos são um grande problema para os sistemas da saúde pública no mundo, uma vez que as infecções causadas por esses microrganismos têm piores desfechos clínicos, internações prolongadas e maiores taxas de mortalidade (CANTÓN *et al.*, 2020). MRSA representa um importante integrante do grupo de bactérias multirresistentes causadoras destas infecções, tendo uma incidência média de cerca de 60% entre todas as cepas clínicas de *S. aureus* diagnosticadas no mundo, variando bastante esta incidência conforme o contexto epidemiológico (DIALLO *et al.*, 2020).

Tendo em vista a relevância clínica de MRSA tanto pelo aspecto da incidência quanto da gravidade das infecções e dos desafios no tratamento, estudos de caracterização de cepas clínicas são importantes, não somente no contexto da epidemiologia molecular de bactérias multirresistentes, mas também para contribuir no entendimento da biologia destes microrganismos. Dados publicados envolvendo a caracterização de cepas clínicas de MRSA ainda são escassos no Brasil, especialmente no Estado de SC, onde, até o momento, foram encontrados apenas dois estudos publicados (Silveira *et al.* 2015a e Silveira *et al.* 2015b), nenhum deles reportando o repertório de genes de virulência. Em 2015, Silveira e colaboradores sugeriram que SC apresenta características epidemiológicas diferenciais com relação à incidência de MRSA quando comparada com outras regiões brasileiras, uma vez que a incidência observada (4-8%) foi menor que a média nacional (20-50%) (ANVISA, 2020). Assim, por esta epidemiologia diferencial reportada, a hipótese do presente estudo foi de que o perfil de sensibilidade aos antimicrobianos e de distribuição de genes de virulência das amostras MRSA apresentarão certo grau de diferença daqueles perfis encontrados em estudos de outras regiões, que auxiliarão no entendimento do fenômeno da baixa incidência observada.

Diante do exposto, o presente estudo espera contribuir na apresentação de dados envolvendo a caracterização de cepas clínicas de MRSA isoladas de pacientes atendidos em SC, contribuindo para o entendimento da epidemiologia do Estado e dos aspectos biológicos envolvidos na resistência antimicrobiana e virulência de MRSA brasileiros.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Caracterizar amostras de *Staphylococcus aureus* resistente à meticilina (MRSA) isoladas de pacientes atendidos em hospitais no Estado de Santa Catarina quanto ao seu perfil fenotípico de sensibilidade aos antimicrobianos e a presença de genes relacionados a virulência.

3.2 Objetivos Específicos

- Avaliar o perfil de sensibilidade aos antimicrobianos de amostras de MRSA através da técnica de disco difusão, comparando os critérios de interpretação preconizados pelo *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI) e pelo Comitê Brasileiro de Testes de Sensibilidade Antimicrobiana (BrCAST);
- Identificar a presença dos genes *tst*, *seg* e *seh* nas amostras através da técnica da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR);

4. METODOLOGIA

4.1 Amostras Clínicas de MRSA

As amostras de MRSA foram isoladas de amostras clínicas coletadas de pacientes atendidos em hospitais no Estado de Santa Catarina. As amostras bacterianas foram concedidas para o projeto diretamente pelo laboratório de microbiologia do Hospital Universitário Professor Polydoro Ernani de São Thiago (Hospital universitário - HU, vinculado à UFSC), ou pelo Laboratório Central de Saúde Pública de Santa Catarina (LACEN/SC), ambos localizados em Florianópolis. No total, 55 amostras de MRSA foram selecionadas para o teste de sensibilidade aos antimicrobianos por disco-difusão e detecção de genes de virulência por PCR. As amostras foram coletadas entre os anos de 2016 e 2017, todas identificadas previamente como MRSA pelos laboratórios dos estabelecimentos de saúde descritos.

As amostras utilizadas neste estudo tiveram sua identificação confirmada como MRSA por Dominski (2018). A confirmação foi feita pelo teste da coagulase, microscopia de Gram e pela detecção do gene *mecA* e *rRNA16S* por PCR. Além disso, o mesmo autor realizou a tipagem *SCCmec* das 55 amostras e a tipagem MLST de 1 amostra. A coleta das amostras foi aprovada pelo Comitê de Ética em Pesquisa com seres humanos da Universidade Federal de Santa Catarina (CEPSH-UFSC) sob número 53562716.4.0000.0121, em colaboração com a Prof^a Thaís Cristine Marques Sincero, do Laboratório de Microbiologia Molecular Aplicada (MIMA) da UFSC.

O Quadro 1 contém todas as informações coletadas sobre as amostras clínicas de MRSA, como sítio clínico de isolamento, ano de obtenção e classificação da tipagem *SCCmec*.

Quadro 1 – Dados das amostras clínicas de MRSA isoladas no Estado de Santa Catarina.

Código das Amostras	Sítio de Isolamento	Ano	Tipagem <i>SCCmec</i>
16001	Secreção traqueal	2016	II
16002	Pé diabético	2016	nt
16003	Secreção traqueal	2016	IV
16004	Ferida operatória	2016	IV
16005	Secreção de ferida Sacral	2016	IV
16006	Sangue	2016	II
16007	Sangue	2016	II
16008	Secreção de Ferida	2016	IV
16009	Escarro	2016	II
16010	Frag. reg. perianal	2016	IV
16011	Secreção de ferida	2016	II

16012	Secreção de ferida	2016	II
16013	Sangue	2016	II
16014	Fragmento ósseo	2016	II
17001	Sangue	2017	IV
17002	Abscesso	2017	IV
17003	Secreção de ferida	2017	I
17004	Urina	2017	IV
17005	Impetigo	2017	IV
17006	Secreção ocular	2017	II
17007	Secreção de pele	2017	II
17008	Sangue	2017	IV
17009	Sangue	2017	nt
17010	Secreção nasofaríngea	2017	IV
17011	Biópsia do tórax	2017	II
17012	LVA	2017	II
17013	Sangue	2017	II
17014	Secreção de ferida	2017	II
17015	Secreção de lesão	2017	II
17016	Secreção traqueal	2017	IV
17017	Secreção traqueal	2017	IV
17018	Aspirado traqueal	2017	II
17019	Fragmento tecido ósseo	2017	II
17020	Swab nasal	2017	IV
17021	Swab de estroma traqueal	2017	II
17022	Fragmento tecido ósseo	2017	nt
17023	Abscesso	2017	IV
17024	Sangue	2017	II
17025	Swab de lesão ulcerada	2017	IV
17026	Secreção traqueal	2017	II
17027	Abscesso	2017	IV
17028	Sangue	2017	II
17029	Lesão de úlcera	2017	IV
17030	Sangue	2017	IV
17031	Sangue	2017	II
17032	Aspirado traqueal	2017	II
17033	Tecido nervoso	2017	II
17034	Segmento de tendão	2017	II
17035	Sangue	2017	IV
17036	Abscesso	2017	IV
17037	Sangue	2017	IV
17038	Sangue	2017	IV
17039	Sangue	2017	II
17040	Abscesso	2017	IV
17041	Sangue	2017	IV

Legenda: nt: Não-tipável

Fonte: Adaptado de DOMINSKI, 2018.

4.2 Teste de Sensibilidade aos Antimicrobianos (TSA)

O teste de sensibilidade aos antimicrobianos das amostras de MRSA foi realizado através da técnica de disco difusão, de acordo com os critérios estabelecidos pelo documento *Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing*, M100 Ed. 31, com última atualização em 26/03/2021 pelo *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI, 2021) e pelos documentos preconizados pelo Comitê Brasileiro de Testes de Sensibilidade Antimicrobiana (BrCAST) contendo o método de disco-difusão, com última atualização em 24/06/2021, assim como as tabelas contendo os pontos de corte clínico para os antimicrobianos com última atualização em 15/03/2021 (BrCAST, 2021).

Neste método, foi preparado a partir de culturas das amostras de MRSA semeadas em meio ágar triptona de soja (Kasvi, Brasil) um inóculo padronizado na concentração de 0,5 seguindo a escala McFarland de turvação em solução salina estéril (cloreto de sódio 0,85% p/v), que corresponde a uma concentração de $1,5 \times 10^8$ UFC/mL. A densidade óptica (DO) da suspensão bacteriana do inóculo foi conferida através de espectrofotometria, num comprimento de onda de 625 nm, na qual a suspensão apresentou uma absorbância na faixa de 0,08 a 0,10. Em seguida, os inóculos padronizados foram semeados na superfície de placas com espessura aproximada de $4,0 \pm 0,5$ milímetros contendo ágar Mueller-Hinton (Kasvi, Brasil), de forma confluyente, com auxílio de um swab de ponta de algodão estéril (Neolab, Brasil). Logo após a inoculação, os discos contendo os respectivos antimicrobianos foram distribuídos na superfície do ágar com o auxílio de uma pinça estéril. Posteriormente, as placas foram incubadas numa temperatura de $35 \pm 1^\circ\text{C}$ por 18 ± 2 h. Após a incubação, as placas foram submetidas a análise de formação ou não de halos de inibição e a medição do diâmetro em milímetros (mm) dos mesmos, onde a leitura foi feita de uma borda à outra na qual apresentou completa inibição do crescimento bacteriano.

A seleção dos antimicrobianos para o experimento foi feita de modo a se ter a maior representatividade do número de classes de antimicrobianos, levando em conta os padrões do CLSI e BrCAST. Os antimicrobianos selecionados para este estudo e os pontos de corte de acordo com o preconizado pelo BrCAST e CLSI encontram-se na Tabela 1.

Cada amostra foi avaliada em duplicata técnica. O meio de cultura Mueller-Hinton ágar e os discos de antimicrobianos foram submetidos ao controle de qualidade através da

realização do TSA nas cepas padrão de *Staphylococcus aureus* ATCC 29213 e *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, cedidas gentilmente pela Prof^a Jussara Kasuko Palmeiro.

Tabela 1 - Antimicrobianos utilizados no ensaio, sua concentração e pontos de corte do diâmetro dos halos que foram utilizados para classificação da sensibilidade segundo o preconizado pelo BrCAST e CLSI em 2021.

Antimicrobianos Utilizados	Conteúdo dos discos (µg)	Ponto de Corte para Diâmetro de Halo (mm) (BrCAST)			Ponto de Corte para Diâmetro de Halo (mm) (CLSI)		
		S	I	R	S	I*	R
Cefoxitina	30	≥22	-	<22	≥22	-	≤21
Ciprofloxacino	5	≥50	21-49	<21	≥21	16-20	≤15
Clindamicina	2	≥22	19-21	<19	≥21	15-20	≤14
Eritromicina	15	≥21	18-20	<18	≥23	14-22	≤13
Gentamicina	10	≥18	-	<18	≥15	13-14	≤12
Rifampicina	5	≥26	23-25	<23	≥20	17-19	≤16
Sulfametoxazol-Trimetoprim	23,75-1,25	≥17	14-16	<14	≥16	11-15	≤10

Legenda: S: Sensível, dose padrão; I: Sensível, aumentando a exposição; I*: Intermediário; R: Resistente.

Observação: Para detecção da resistência induzível à clindamicina nas amostras, os discos de eritromicina e clindamicina foram posicionados em uma distância (borda a borda) de 12 a 20mm.

Fonte: Adaptado de CLSI, 2021; BrCAST, 2021.

4.3 Detecção dos Genes de Virulência

Todas as amostras de MRSA utilizadas encontravam-se estocadas em caldo TSB (caldo tripton de soja; Kasvi[®]) contendo 12% (p/v) de glicerol e armazenadas numa temperatura de -80°C. A extração de DNA foi feita através da metodologia de extração salina (BARATTO & MEGIOLARO, 2012), com adaptações. Resumidamente, as amostras foram cultivadas por esgotamento em meio TSA (ágar tripton de soja; Kasvi[®]) e incubadas em estufa a 37°C por 24h antes da realização da extração. Passado o tempo do crescimento, coletou-se algumas colônias isoladas das amostras que foram solubilizadas em 400µl em tampão de lise TES (solução contendo Tris-HCL 1M, SDS 20% (v/v) e EDTA 0,5M) em um microtubo, levado à fervura a 100°C por 10 minutos. Depois de aguardar o resfriamento, adicionou-se 1,5µl de proteinase K (20mg/mL) na solução e as amostras foram incubadas a 42°C por 1 hora. Logo após, foram adicionados 84µl de solução contendo Cloreto de Sódio (NaCl) 6M, homogeneizado e centrifugado à 14.000rpm por 2 minutos. 300µl do sobrenadante foram transferidos para um novo microtubo, onde executou-se três lavagens com etanol absoluto e etanol 70% (v/v), intercaladas com centrifugação a 14.000rpm por 5 minutos. A extração foi finalizada descartando o sobrenadante da terceira lavagem após a última centrifugação, onde o

sedimento contendo o DNA no microtubo foi ressuspenso com 40µl de água ultra purificada (MilliQ) e armazenado a -20°C para realização das reações.

Os DNAs extraídos das amostras foram utilizados para a detecção dos genes de virulência através da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR). Os genes pesquisados neste estudo foram o *tst* (codificante da principal toxina responsável pela síndrome do choque tóxico), *seg* e *seh* (codificantes das enterotoxinas G e H, respectivamente). Os reagentes foram ajustados para um volume final de 20µl da reação. As concentrações finais dos reagentes utilizados foram: 1x Gotaq Flexi buffer (Promega®), 0,2mM de mix contendo cada dNTP, 1,25U de GoTaq DNA polymerase (Promega®), 1,5µM de MgCl₂ (Promega®), 1,0 µM de cada iniciador, 50 à 100 ng de DNA e água ultra purificada q.s.p. 20µl. Os detalhes em relação aos iniciadores utilizados encontram-se na Quadro 2. O ciclo programado no termociclador para as condições da reação foram: Desnaturação inicial à 94°C por 5 minutos; 30 ciclos começando com desnaturação à 94°C por 30 segundos, seguido de 30 segundos à 55°C para que ocorra a hibridação dos iniciadores e 1 minuto e 30 segundos a 72°C para extensão da fita; finalizando com 4 minutos à 72°C para extensão final. Após o ciclo, a amplificação ou não dos genes foram analisadas por eletroforese em gel de agarose 1,0%, com voltagem de 100V e amperagem de 400Å durante 30 minutos. O marcador de tamanho molecular utilizado foi o modelo K9-1000L com 1kb (Kasvi®). Como controle negativo foi utilizado a cepa *S. aureus* ATCC 25923. Como controle positivo para a detecção do gene *tst* utilizou-se a cepa Mu50 e para os genes *seh* e *seg* utilizou-se a cepa USA400, cedidas gentilmente pelas Professoras Thaís Cristine Marques Sincero e Jussara Kasuko Palmeiro da UFSC.

Quadro 2 - Informações dos iniciadores utilizados para a detecção dos genes.

Gene	Iniciador	Sequência Forward/Reverse (5'-3')	Temperatura de Anelamento (C°)	Amplicon (pb)
<i>tst</i>	p152	5'-ATCGTAAGCCCTTTGTTG-3'	55	371
	p154	5'-TGGATATAAGTTCCTTCGC -3'		
<i>seh</i>	SEH-1	5'-TCACATCATATGCGAAAGCAG-3'	55	334
	SEH-2	5'-CATCTACCCAAACATTAGCAC-3'		
<i>seg</i>	SEG-1	5'-AATTATGTGAATGCTCAACCCG-3'	53	634
	SEG-2	5'-TATGGAACAAAAGGTACTAGTTC-3'		

Fonte: Guimarães *et al.*, 2015.

5. RESULTADOS

5.1 Ensaio de Sensibilidade aos Antimicrobianos por Disco-Difusão

Todas as 55 amostras de MRSA foram analisadas. A classificação de sensível, dose padrão (S); sensível, aumentando exposição (I); intermediário (I*) e resistente (R) para os padrões preconizados pelo BrCAST e CLSI encontram-se no Quadro 3. Os valores de diâmetro de halo e desvio padrão para as duplicatas das amostras para cada antimicrobiano encontram-se no apêndice A e B.

Quadro 3 – Classificação da resistência antimicrobiana de acordo com os padrões preconizados pelo BrCAST e CLSI para cada amostra.

Amostras	Antimicrobianos Utilizados no TSA						
	Classificação BrCAST/Classificação CLSI						
	FOX	CIP	CMN	ERY	GMN	RIF	SXT
16001	R/R	R/R	R/R	R/R	S/S	S/S	S/S
16002	R/R	R/R	R/R	R/R	S/S	S/S	S/S
16003	R/R	I/S	S/S	S/S	S/S	S/S	S/S
16004	R/R	R/R	S/S	R/R	S/S	R/I*	S/S
16005	R/R	R/I*	R/R	R/R	R/R	S/S	S/S
16006	R/R	R/R	R/R	R/R	S/S	S/S	S/S
16007	R/R	R/R	R/R	R/R	S/S	S/S	S/S
16008	R/R	I/S	S/S	S/S	S/S	R/R	S/S
16009	R/R	R/R	R/R	R/R	S/S	S/S	S/S
16010	R/R	R/R	S/S	R/R	S/S	I/S	S/S
16011	R/R	R/R	R/R	R/R	S/S	S/S	S/S
16012	R/R	I/S	S/S	R/R	S/S	S/S	S/S
16013	R/R	R/R	R/R	R/R	S/S	S/S	S/S
16014	R/R	I/S	S/S	R/I*	S/S	S/S	S/S
17001	R/R	I/S	S/S	R/R	S/S	R/S	S/S
17002	R/R	R/I*	I/I*	R/R	S/S	S/S	S/S
17003	R/R	R/R	S/S	R/R	S/S	S/S	S/S
17004	R/R	I/S	S/S	R/R	R/R	S/S	S/S
17005	R/R	I/S	S/S	R/R	S/S	S/S	S/S
17006	R/R	R/R	R/R	R/R	R/R	S/S	S/S
17007	R/R	R/R	R/R	R/R	S/S	S/S	S/S
17008	R/R	R/R	S/S	R/R	S/S	R/R	S/S
17009	R/R	R/R	S/S	S/S	R/R	S/S	S/S
17010	R/R	R/R	I/S	R/R	R/R	I/S	S/S
17011	R/R	R/R	R/R	R/R	S/S	S/S	S/S
17012	R/R	R/R	S/S	R/R	S/S	S/S	S/S
17013	R/R	R/R	R/R	R/R	S/S	R/R	R/R
17014	R/R	R/R	R/R	R/R	S/S	S/S	S/S
17015	R/R	R/R	R/R	R/R	S/S	S/S	R/R
17016	R/R	I/S	I/I*	I/I*	S/S	S/S	S/S

17017	R/R	I/S	S/S	S/I*	S/S	S/S	S/S
17018	R/R	R/R	R/R	R/R	R/S	S/S	S/S
17019	R/R	R/R	R/R	R/R	S/S	S/S	S/S
17020	R/R	I/S	S/S	R/R	S/S	S/S	R/S
17021	R/R	R/R	R/R	R/R	S/S	S/S	R/R
17022	R/R	R/R	R/R	R/R	R/R	R/I*	R/R
17023	R/R	I/S	S/S	S/I*	S/S	S/S	S/S
17024	R/R	R/R	R/R	R/R	S/S	S/S	S/S
17025	R/R	I/S	S/S	S/S	S/S	S/S	S/S
17026	R/R	R/R	R/R	R/R	S/S	S/S	R/R
17027	R/R	I/S	S/S	R/R	S/S	S/S	S/S
17028	R/R	R/R	R/R	R/R	S/S	S/S	S/S
17029	R/R	I/S	S/S	R/R	S/S	R/R	S/S
17030	R/R	I/S	S/S	R/R	S/S	S/S	S/S
17031	R/R	R/R	R/R	R/R	S/S	S/S	S/S
17032	R/R	R/R	R/R	R/R	S/S	S/S	S/S
17033	R/R	R/R	R/R	R/R	S/S	S/S	S/S
17034	R/R	R/R	R/R	R/R	S/S	S/S	S/S
17035	R/R	I/S	S/S	R/R	S/S	R/R	S/S
17036	R/R	I/S	S/S	S/S	S/S	S/S	S/S
17037	R/R	R/R	S/S	R/R	S/S	S/S	S/S
17038	R/R	R/R	S/S	R/R	S/S	S/S	S/S
17039	R/R	R/R	R/R	R/R	S/S	S/S	S/S
17040	R/R	I/R	S/S	S/S	S/S	S/S	S/S
17041	R/R	R/I*	S/S	R/R	S/S	S/S	S/S

Legenda: FOX: Cefoxitina CIP: Ciprofloxacino; CMN: Clindamicina; ERY: Eritromicina; GMN: Gentamicina; RIF: Rifampicina; SXT: Sulfametoxazol-Trimetoprim; S: Sensível, dose padrão; I: Sensível, aumentando a exposição; I*: Intermediário; R: Resistente.

Fonte: O autor, 2021.

Conforme esperado, todas as amostras (55; 100%) foram resistentes à cefoxitina em todas as análises, já que são todas MRSA. Por isso, a resistência à cefoxitina não foi incluída nas figuras e tabelas posteriores.

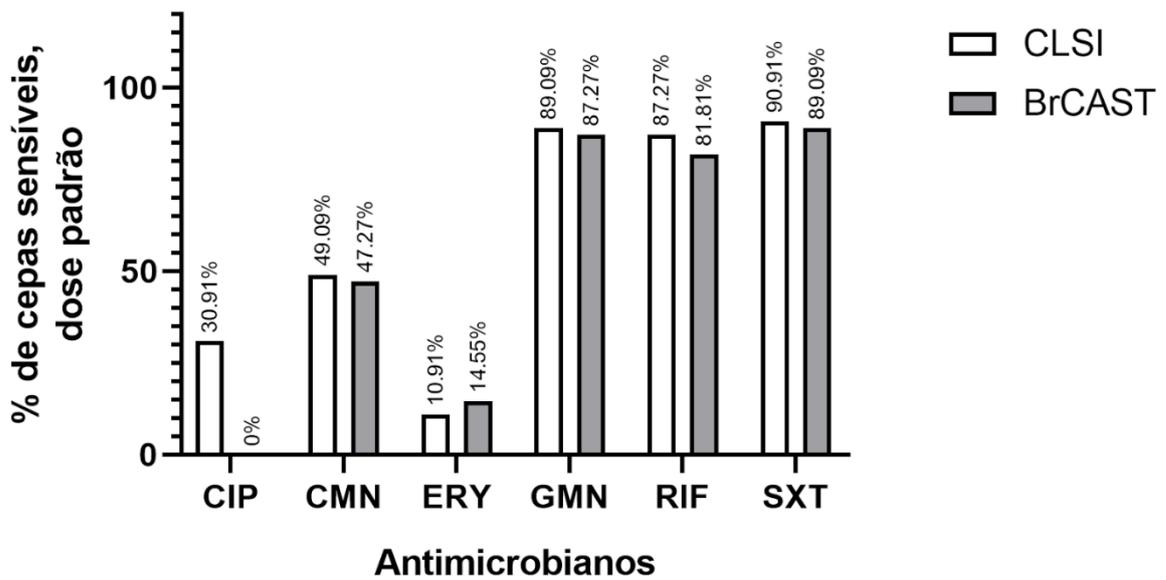
Avaliando pelos padrões preconizados pelo CLSI em relação a classificação da resistência antimicrobiana, das 55 amostras testadas, 17 (30,91%) foram sensíveis para ciprofloxacino, 27 (49,09%) foram sensíveis para clindamicina, 6 (10,91%) foram sensíveis para eritromicina, 49 (89,09%) foram sensíveis para gentamicina, 48 (87,27%) foram sensíveis para rifampicina e 50 (90,91%) foram sensíveis para o sulfametoxazol-trimetoprim.

Avaliando pelos padrões preconizados pelo BrCAST em relação a classificação da resistência antimicrobiana, das 55 amostras testadas, 0 (0%) foram sensíveis para ciprofloxacino, 26 (47,27%) foram sensíveis para clindamicina, 8 (14,55%) foram sensíveis

para eritromicina, 48 (87,27%) foram sensíveis para gentamicina, 45 (81,81%) foram sensíveis para rifampicina e 49 (89,09%) foram sensíveis para o sulfametoxazol-trimetoprim.

O comparativo dos perfis de sensibilidade a dose padrão aos antimicrobianos testados frente às duas classificações está a ilustrado na Figura 3.

Figura 5 – Comparação do perfil de cepas sensíveis a dose padrão aos antimicrobianos testados segundo as classificações do CLSI e BrCAST.



Legenda: CIP: Ciprofloxacino; CMN: Clindamicina; ERY: Eritromicina; GMN: Gentamicina; RIF: Rifampicina; SXT: Sulfametoxazol-Trimetoprim.

Fonte: O autor, 2021.

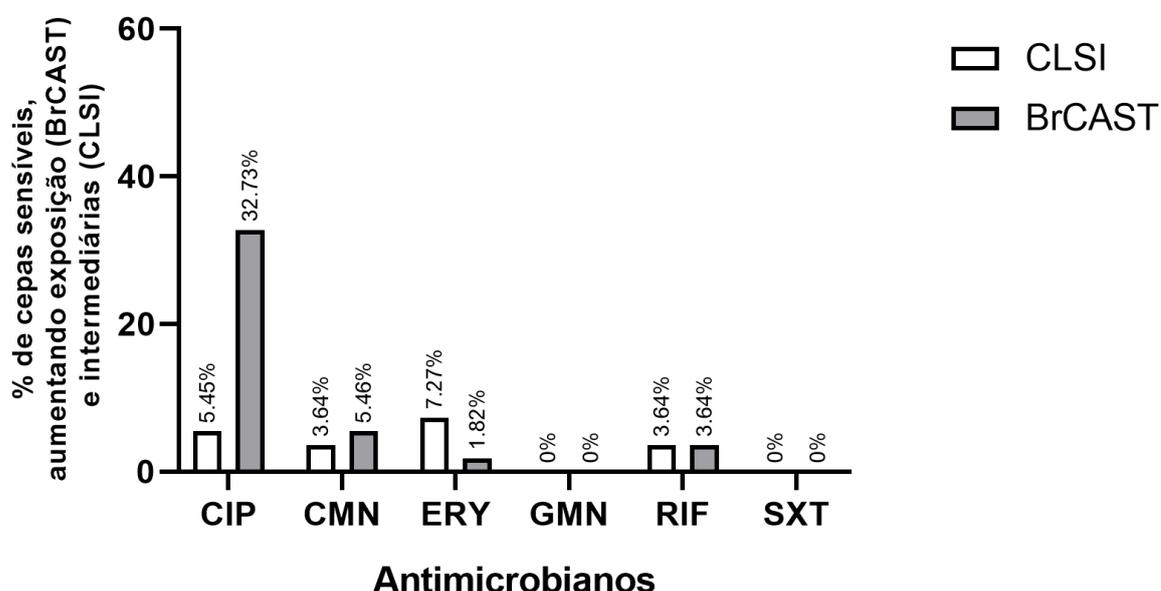
Avaliando pelos padrões preconizados pelo CLSI em relação a classificação da resistência antimicrobiana, das 55 amostras testadas, 3 (5,45%) foram classificadas como intermediárias para ciprofloxacino, 2 classificadas como intermediárias (3,64%) para clindamicina, 4 (7,27%) classificadas como intermediárias para eritromicina, 0 (0%) classificadas como intermediárias para gentamicina, 2 (3,64%) classificadas como intermediárias para rifampicina e 0 (0%) classificadas como intermediárias para o sulfametoxazol-trimetoprim.

Avaliando pelos padrões preconizados pelo BrCAST em relação a classificação da resistência antimicrobiana, das 55 amostras testadas, 18 (32,73%) foram sensíveis aumentando exposição para ciprofloxacino, 3 (5,46%) foram sensíveis aumentando exposição para clindamicina, 1 (1,82%) foi sensível aumentando exposição para eritromicina, 0 (0%) foram

sensíveis aumentando exposição para gentamicina, 2 (3,64%) foram sensíveis aumentando exposição para rifampicina e 0 (0%) foram sensíveis para o sulfametoxazol-trimetoprim.

O comparativo dos perfis de sensibilidade, aumentando exposição e de cepas intermediárias aos antimicrobianos testados frente às duas classificações está ilustrado na Figura 4.

Figura 6 – Comparação do perfil de cepas sensíveis, aumentando exposição aos antimicrobianos e intermediárias testados segundo as classificações do CLSI e BrCAST.



Legenda: CIP: Ciprofloxacino; CMN: Clindamicina; ERY: Eritromicina; GMN: Gentamicina; RIF: Rifampicina; SXT: Sulfametoxazol-Trimetoprim.

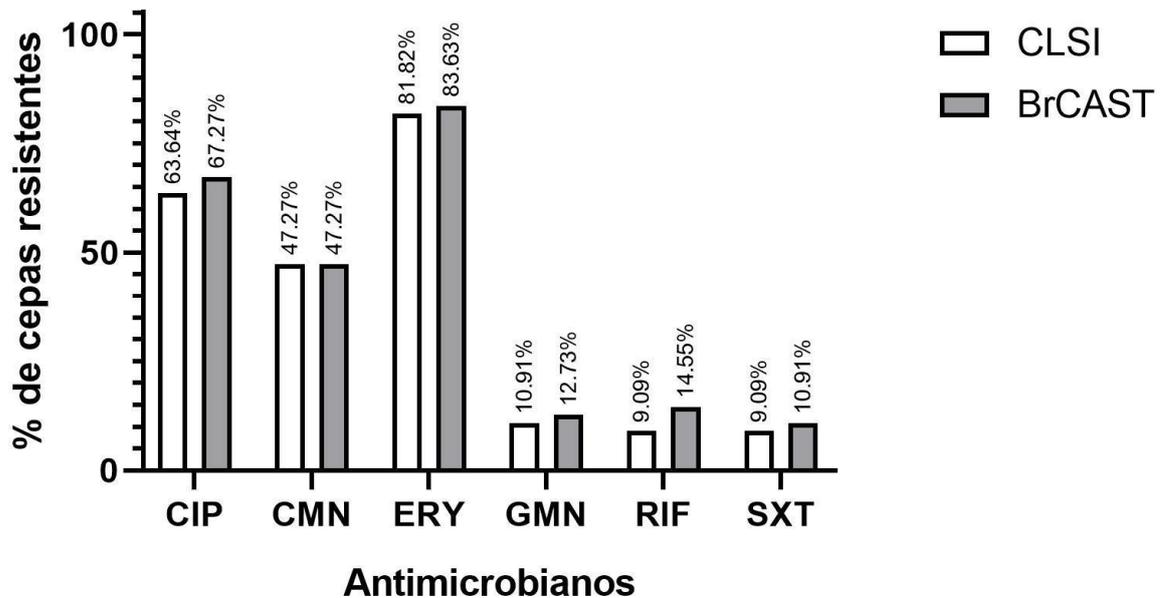
Fonte: O autor, 2021.

Avaliando pelos padrões preconizados pelo CLSI em relação a classificação da resistência antimicrobiana, das 55 amostras testadas, 35 (63,64%) foram resistentes para ciprofloxacino, 26 (47,27%) foram resistentes para clindamicina, 45 (81,82%) foram resistentes para eritromicina, 6 (10,31%) foram resistentes para gentamicina, 5 (9,09%) foram resistentes para rifampicina e 5 (9,09%) foram resistentes para o sulfametoxazol-trimetoprim.

Avaliando pelos padrões preconizados pelo BrCAST em relação a classificação da resistência antimicrobiana, das 55 amostras testadas, 37 (67,27%) foram resistentes para ciprofloxacino, 26 (47,27%) foram resistentes para clindamicina, 46 (83,63%) foram resistentes para eritromicina, 7 (12,73%) foram resistentes para gentamicina, 8 (14,55%) foram resistentes para rifampicina e 6 (10,91%) foram resistentes para o sulfametoxazol-trimetoprim.

O comparativo dos perfis de sensibilidade a dose padrão aos antimicrobianos testados frente às duas classificações está ilustrado na Figura 5.

Figura 7 – Comparação do perfil de cepas resistentes aos antimicrobianos testados segundo as classificações do CLSI e BrCAST.



Legenda: CIP: Ciprofloxacino; CMN: Clindamicina; ERY: Eritromicina; GMN: Gentamicina; RIF: Rifampicina; SXT: Sulfametoxazol-Trimetoprim

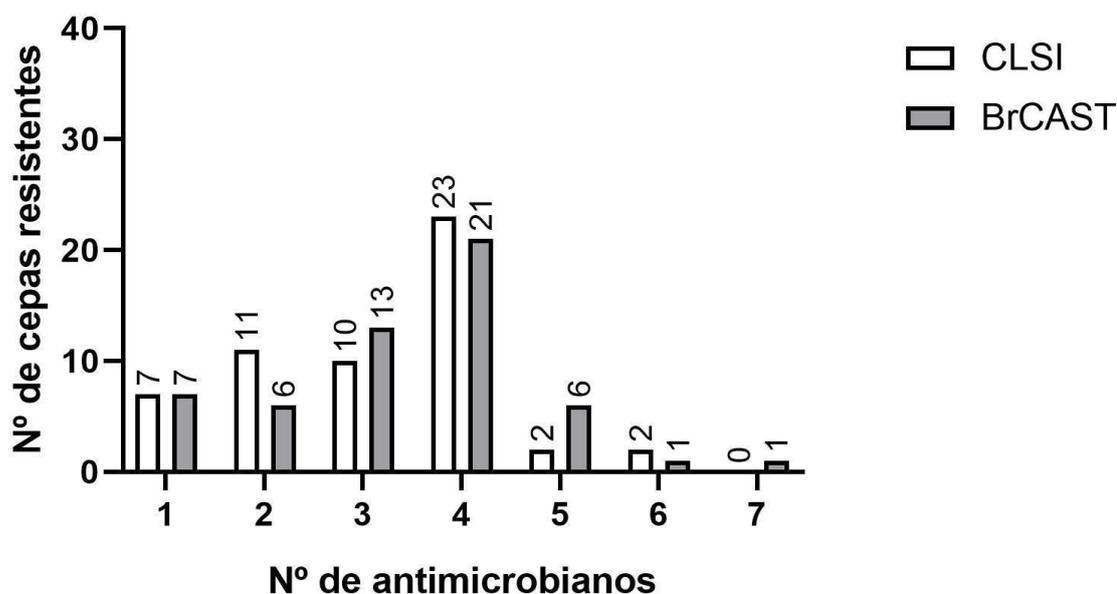
Fonte: O autor, 2021.

Avaliando pelos padrões preconizados pelo CLSI em relação a classificação da resistência antimicrobiana, das 55 amostras testadas, 7 foram resistentes à apenas 1 classe de antimicrobianos, 11 foram resistentes a 2 classes de antimicrobianos, 10 foram resistentes a 3 classes de antimicrobianos, 23 foram resistentes a 4 classes de antimicrobianos, 2 foram resistentes a 5 classes de antimicrobianos, 2 foram resistentes a 6 classes de antimicrobianos e nenhuma amostra foi resistente a todos os 7 antimicrobianos testados. No total, 37 amostras foram classificadas como MDR segundo a classificação do CLSI.

Avaliando pelos padrões preconizados pelo BrCAST em relação a classificação da resistência antimicrobiana, das 55 amostras testadas, 7 foram resistentes à apenas 1 classe de antimicrobiano, 6 foram resistentes a 2 classes de antimicrobianos, 13 foram resistentes a 3 classes de antimicrobianos, 21 foram resistentes a 4 classes de antimicrobianos, 6 foram resistentes a 5 classes de antimicrobianos, 1 foi resistente a 6 classes de antimicrobianos e 1 amostra foi resistente a todos os 7 antimicrobianos testados. No total, 42 amostras foram classificadas como MDR segundo a classificação do BrCAST.

O comparativo dos perfis de resistência a uma ou mais classes de antimicrobianos frente às duas classificações está ilustrado na Figura 6.

Figura 8 – Comparação do perfil de cepas resistentes a mais de um antimicrobiano segundo as classificações do CLSI e BrCAST.



Fonte: O autor, 2021.

As cepas também tiveram sua classificação de sensibilidade aos antimicrobianos analisada de acordo com a tipagem *SCCmec*. Das 55 amostras de MRSA analisadas, 26 possuem tipagem *SCCmec* tipo II e 25 possuem tipagem *SCCmec* tipo IV. 3 amostras não possuem *SCCmec* tipável e não foram inseridas na análise, juntamente com 1 amostra *SCCmec* tipo I. Os dados de sensibilidade aos antimicrobianos distribuídos às cepas conforme sua classificação *SCCmec* podem ser observados nas tabelas 4 e 5.

Tabela 2 - Perfil de sensibilidade aos antimicrobianos das 26 amostras de MRSA com tipagem *SCCmec* II.

	(S)	(I)	(R)	Total
Antimicrobianos	Nº / %	Nº / %	Nº / %	Nº / %
Ciprofloxacino	3 / 11,54	0 / 0	23 / 88,46	26 / 100
Clindamicina	0 / 0	0 / 0	26 / 100	26 / 100
Eritromicina	24 / 92,30	0 / 0	2 / 7,68	26 / 100
Gentamicina	25 / 96,15	0 / 0	1 / 3,85	26 / 100
Rifampicina	22 / 84,61	0 / 0	4 / 15,39	26 / 100
Sulfametoxazol-Trimetoprim	0 / 0	2 / 7,68	24 / 92,30	26 / 100

Legenda: Nº: Número total; %: Porcentagem total; (S): Sensível, dose padrão; (I): Sensível, aumentando exposição; (R): Resistente.
Fonte: O autor, 2021.

Tabela 3 - Perfil de Sensibilidade aos Antimicrobianos das 25 amostras de MRSA com tipagem *SCCmec IV*.

	(S)	(I)	(R)	Total
Antimicrobianos	Nº / %	Nº / %	Nº / %	Nº / %
Ciprofloxacino	0 / 0	16 / 64,0	9 / 36,0	25 / 100
Clindamicina	21 / 84,0	3 / 12,0	1 / 4,0	25 / 100
Eritromicina	7 / 28,0	1 / 4,0	17 / 68,0	25 / 100
Gentamicina	22 / 88,0	0 / 0	3 / 12,0	25 / 100
Rifampicina	19 / 76,0	0 / 0	6 / 24,0	25 / 100
Sulfametoxazol-Trimetoprim	24 / 96,0	0 / 0	1 / 4,0	25 / 100

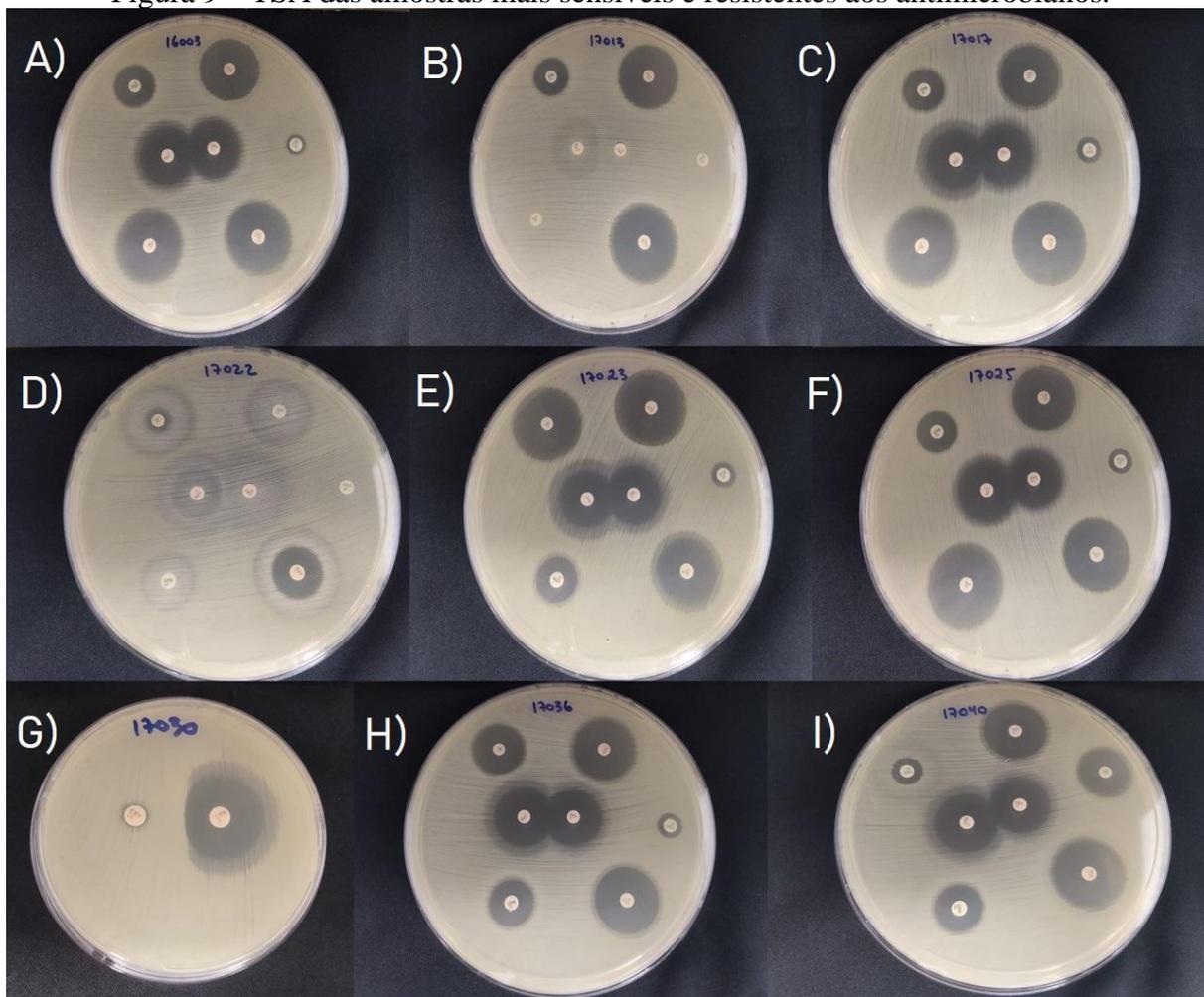
Legenda: Nº: Número total; %: Porcentagem total; (S): Sensível, dose padrão; (I): Sensível, aumentando exposição; (R): Resistente.
Fonte: O autor, 2021.

Seguindo a classificação preconizada pelo CLSI, as amostras referenciadas pelos códigos 16003 (*SCCmec IV*), 17025 (*SCCmec IV*) e 17036 (*SCCmec IV*) foram as mais sensíveis, apresentando resistência apenas para a cefoxitina. As amostras referenciadas pelos códigos 17013 (*SCCmec II*) e 17022 (*SCCmec* não tipável) foram as mais resistentes, apresentando apenas sensibilidade para gentamicina e sensibilidade aumentando exposição para a rifampicina.

Seguindo a classificação preconizada pelo BrCAST, as amostras referenciadas pelos códigos 16003 (*SCCmec IV*), 17017 (*SCCmec IV*), 17023 (*SCCmec IV*), 17025 (*SCCmec IV*), 17036 (*SCCmec IV*) e 17040 (*SCCmec IV*) foram as mais sensíveis, apresentando resistência apenas para a cefoxitina e sensibilidade aumentando a exposição para ciprofloxacino. A amostra referenciada pelo código 17022 (*SCCmec* não tipável) foi a mais resistente, apresentando resistência para todos os antimicrobianos testados.

Em relação à resistência induzível à clindamicina, das 55 amostras testadas, apenas a amostra referenciada pelo código 17030 (*SCCmec IV*) apresentou positividade para a resistência induzível à clindamicina.

Figura 9 – TSA das amostras mais sensíveis e resistentes aos antimicrobianos.



Legenda: A) amostra 16003; B) Amostra 17013, C) Amostra 17017; D) Amostra 17022; E) Amostra 17023; F) Amostra 17025; G) Amostra 17030 (Teste D positivo); H) Amostra 17036; I) Amostra 17040.

Fonte: O autor, 2021.

5.2 Detecção dos Genes *tst*, *seg* e *seh*

Das 55 amostras de MRSA analisadas, 4 (7,3%) apresentaram-se positivas para a presença dos genes *tst* e *seg*. Em razão da pandemia de COVID-19, que limitou a realização de experimentos presenciais, a detecção do gene *seh* foi testada apenas em 25 amostras da coleção. Porém, nenhuma amostra apresentou amplificação para este gene, embora os controles tenham funcionado corretamente. O Quadro 4 apresenta todos os isolados que foram positivos para detecção de um ou mais genes pesquisados.

Quadro 4 – Amostras de MRSA com resultado positivo para detecção de pelo menos um dos genes *tst*, *seg* e *seh*.

Código das Amostras	<i>tst</i>	<i>seg</i>	<i>seh</i>
16007	-	+	-
16009	-	+	-
16011	+	-	-
16012	+	-	-
16013	+	-	-
16014	+	+	-
17004	-	+	-

Legenda: +: gene detectado na amostra; -: gene não detectado na amostra.

Fonte: O autor, 2021.

6. DISCUSSÃO

Os resultados do TSA mostram haver diferenças na classificação de pelo menos um antimicrobiano entre os padrões do CLSI e BrCAST. Pela classificação do BrCAST, houve um predomínio de cepas sensíveis aumentando exposição (32,73%) em relação a classificação como intermediária do CLSI (5,45%) para o antimicrobiano ciprofloxacino, assim como cepas sensíveis a dose padrão pela classificação do CLSI mostraram-se predominantes (30,91%) em relação a classificação do BrCAST (0%). Em seu documento mais recente, o BrCAST preconiza para *Staphylococcus aureus* um halo maior ou igual a 50mm para considerar uma cepa sensível a dose padrão ao ciprofloxacino, enquanto o CLSI considera um halo maior ou igual a 21mm para a mesma classificação em cepas de *Staphylococcus* spp. Contudo, o valor atribuído para a classificação de sensível a dose padrão ao ciprofloxacino padronizado pelo BrCAST se trata de um valor arbitrário, existindo apenas as classificações de sensível, aumentando exposição e resistente, o que gerou a maior discordância observada entre as duas classificações neste estudo.

O CLSI deixa descrito em seu documento que cepas de *Staphylococcus* spp. podem desenvolver resistência durante a terapia prolongada com fluoroquinolonas, onde os isolados que são inicialmente sensíveis podem se tornar resistentes dentro de 3 a 4 dias após o início da terapia, sendo necessário realizar o TSA novamente para estes pacientes, como forma de monitoramento da resistência e acompanhamento da eficácia da terapia antimicrobiana. Como não há ponto de corte para sensível a dose padrão na classificação do BrCAST, esta recomendação torna-se necessária para a orientação da escolha da terapia, visto que laboratórios que adotam o BrCAST já iniciarão o tratamento com uma dose ou tempo prolongado de imediato, enquanto laboratórios usuários da classificação do CLSI necessitarão do monitoramento, pela possibilidade de desenvolvimento de resistência com uma dose menor.

O BrCAST também apresenta notas de observação para a categorização das fluoroquinolonas. O documento deixa descrito que para o teste de disco-difusão, o norfloxacino pode ser utilizado para triagem de resistência à fluoroquinolonas. Os isolados classificados como sensíveis ao norfloxacino podem ser reportados como sensíveis ao moxifloxacino e sensível, aumentando exposição ao ciprofloxacino e levofloxacino. Os isolados triados como não sensíveis devem ser testados quanto a sensibilidade aos antimicrobianos específicos. O BrCAST padroniza como sensível a dose padrão ao norfloxacino cepas que apresentam halo de

inibição maior ou igual a 17mm de diâmetro. Como neste estudo não foi avaliado a sensibilidade ao norfloxacino, utilizado exclusivamente para triagem, a sensibilidade foi considerada apenas ao ciprofloxacino. Sendo assim, a classificação do BrCAST sempre exibirá cepas analisadas pelo teste de disco-difusão categorizadas como sensíveis aumentando exposição numa proporção bem maior em relação ao CLSI. O BrCAST não relata em sua documentação o desenvolvimento de resistência à fluoroquinolonas durante a terapia medicamentosa. Contudo, por preconizar a classificação das cepas como sensíveis aumentando a exposição, o sucesso terapêutico pode ser melhor, por contornar o desenvolvimento da resistência aumentando o tempo de exposição da dosagem ou a concentração do antimicrobiano durante o tratamento.

Estudos que realizaram o comparativo dos padrões estabelecidos pelo Comitê Europeu de Testes de Sensibilidade Antimicrobiana - EUCAST (padrões dos quais o BrCAST adota também) e CLSI até 2019 na análise do perfil de sensibilidade aos antimicrobianos por disco-difusão para *Staphylococcus spp.* não relataram haver grandes variações na classificação da sensibilidade das cepas (HOMBACH *et al.*, 2013; KASSIM *et al.*, 2016; SÁNCHEZ-BAUTISTA *et al.*, 2018). Porém, os documentos publicados de 2012 a 2019 pelo EUCAST e disponíveis gratuitamente para consulta, preconizavam pontos de corte para o fenótipo de sensível, dose padrão (S) para ciprofloxacino com variações na milimetragem dos halos de inibição entre 20-21mm durante as atualizações, e não continha a classificação de sensível, aumentando a exposição (I), utilizada atualmente. Em 2020, a nova atualização do documento inseriu um valor de halo de 50mm para o padrão para sensível, dose padrão (S), porém este valor implementado é utilizado para fazer a interpretação do fenótipo como sensível, aumento de exposição (I), não existindo a classificação de sensível a dose padrão para o ciprofloxacino em cepas de *Staphylococcus sp.*

Dessa forma, com os dados atuais, percebe-se que o CLSI prioriza o acompanhamento terapêutico do desenvolvimento da resistência no tratamento com fluoroquinolonas, aplicando apenas a dose padrão, enquanto a orientação recomendada pela classificação do BrCAST é de um tratamento com uma dose mais elevada ou tempo de exposição maior para o ciprofloxacino ou outras fluoroquinolonas com valores de sensibilidade arbitrários, o que causou a maior divergência entre as categorizações sensível, dose padrão (S) e sensível, aumentando exposição (I), observada nos resultados deste estudo.

Outra discordância encontrada na classificação, segundo os dois critérios, foi a resistência referente ao antimicrobiano rifampicina. De acordo com os padrões do CLSI, 5

(9,09%) cepas da coleção de amostras apresentaram a classificação de resistente (R) a este antimicrobiano, enquanto a classificação do BrCAST apontou 8 (14,55%) cepas com este mesmo fenótipo. O BrCAST, juntamente com o EUCAST, preconiza como ponto de corte para classificação da resistência à rifampicina cepas de *Staphylococcus* spp. que possuam halo de inibição menor que 23mm, contraponto o ponto de corte implementado pelo CLSI para o mesmo gênero bacteriano, com um valor de menor ou igual à 16mm de halo de inibição.

Recentemente, em janeiro do ano de 2022, os pontos de corte para halo de inibição do TSA pela metodologia de disco-difusão preconizados pelo EUCAST foram atualizados, e o antimicrobiano rifampicina teve um aumento em seu ponto de corte para a classificação do fenótipo resistente (R) caso apresente um halo de inibição menor que 26mm (EUCAST, 2022).

Embora ainda não haja atualização do BrCAST publicado até o devido momento para o ano de 2022, os pontos de corte adotados pelo comitê brasileiro provêm dos estudos epidemiológicos de resistência realizados pelo EUCAST. Analisando documentos de anos anteriores disponibilizados pelo EUCAST, os valores de corte para rifampicina não sofreram grandes alterações ao decorrer das atualizações, demonstrando uma estabilidade no desenvolvimento da resistência em cepas de *Staphylococcus* spp. Porém, neste ano, houve o primeiro aumento de 3mm para classificação de resistência a este antimicrobiano. A rifampicina deve ser utilizada em terapia conjunta com outros antimicrobianos, justamente pela capacidade rápida no desenvolvimento da resistência pelos microrganismos, além de não ser recomendada para todos os tipos de infecções ocasionadas por MRSA, e apresentar interação medicamentosa com alguns fármacos (CDC, 2006; HASSOUN *et al.*, 2017; LIU *et al.*, 2011).

Embora tenha sido baixa a resistência encontrada nas amostras de MRSA deste estudo frente a rifampicina, e que este antimicrobiano não seja de primeira escolha para o tratamento clínico de infecções por MRSA, o presente estudo demonstrou que o BrCAST levará a mais cepas de MRSA resistentes à rifampicina. Quanto aos demais antimicrobianos testados, nenhum apresentou uma diferença marcante entre as classificações de sensível, dose padrão (S), sensível, aumentando exposição (I) e resistente (R) preconizadas pelo CLSI e BrCAST.

Os resultados do TSA apontam a existência de um perfil de resistência antimicrobiana das amostras de MRSA. Com exceção da cefoxitina, utilizada apenas para confirmação do fenótipo MRSA, as amostras demonstram apresentar uma taxa de resistência elevada contra eritromicina de 83,63% pelos padrões do BrCAST, seguido do ciprofloxacino, com uma resistência de 67,27% e pela clindamicina, que exibiu uma resistência de 47,47%. A

gentamicina, rifampicina e o sulfametoxazol-trimetoprim foram os antimicrobianos menos resistentes entre os avaliados pelo TSA neste estudo, exibindo uma resistência de 12,73%, 14,55% e 10,91%, respectivamente.

Os resultados obtidos neste estudo encontram-se em concordância com o estudo publicado que avaliou o perfil de resistência antimicrobiana de amostras de MRSA isoladas no Estado de Santa Catarina encontrado na literatura até o momento. Silveira e colaboradores (2015a) realizaram o teste de sensibilidade aos antimicrobianos por disco-difusão em 124 isolados de MRSA obtidos de amostras clínicas no Estado de Santa Catarina. A resistência foi testada frente aos antimicrobianos ciprofloxacino, eritromicina, clindamicina, gentamicina e sulfametoxazol-trimetoprim, igualmente ao realizado no presente estudo, não sendo apenas possível comparar os resultados encontrados para o antimicrobiano rifampicina. Em seus resultados, foi observada uma taxa de resistência antimicrobiana de 79% para ciprofloxacino, 81,5% para eritromicina e 75% para clindamicina, resultados semelhantes ao encontrado para o TSA das amostras de MRSA aqui realizado. Os pesquisadores também obtiveram taxas mais baixas de resistência para gentamicina (33,1%) e sulfametoxazol-trimetoprim (20,2%) entre todos os antimicrobianos avaliados. Em discordância, dos 124 isolados do estudo, 23 (18,5%) positivaram para o teste D, enquanto encontramos apenas 1 (1,81%) amostra positiva para este fenótipo em nossas amostras, que pode ser em relação ao baixo número amostral.

Em relação a amostras clínicas de *S. aureus* isoladas em hospitais do Brasil, a literatura também demonstra seguir o mesmo padrão de resistência diante destes antimicrobianos. Silva e colaboradores (2017) investigaram o perfil de sensibilidade aos antimicrobianos de microrganismos pertencentes ao grupo ESKAPE através de um estudo retrospectivo de dados de amostras nosocomiais de um hospital primário da rede pública de Brasília, entre os anos de 2010 e 2015. De 2537 amostras analisadas, 577 foram isolados de microrganismos do grupo ESKAPE, sendo 22% correspondente a *S. aureus*. Em seu total, as estirpes apresentaram um perfil de resistência de 75,8% à eritromicina e 63,3% à ciprofloxacino e levofloxacino.

Em Santa Catarina, Boettcher (2009) realizou um estudo transversal, descritivo e retrospectivo da análise da sensibilidade aos antimicrobianos dos microrganismos encontrados no isolamento de amostras de pacientes internados na UTI do Hospital Universitário Professor Polydoro Ernani de São Thiago, Florianópolis, entre o período de 01/01/2004 à 31/12/2004 e 01/01/2008 à 31/12/2008. Em sua totalidade, das 469 culturas positivas de diversos tipos de amostras clínicas de secreções, 32 foram positivas para *S. aureus* (17 amostras em 2004 e 15 amostras em 2008). Em 2004, foi observada uma resistência de 64% para eritromicina (17

amostras testadas), 43% para clindamicina (16 amostras testadas) e 0% para ciprofloxacino (3 amostras testadas) e gentamicina (1 amostra testada). Em 2008, foi observada uma resistência de 58% para eritromicina (12 amostras testadas) e 28% para clindamicina, ciprofloxacino e gentamicina (14 amostras testadas).

Perugini e colaboradores (2015) realizaram uma análise retrospectiva do perfil de resistência antimicrobiano de 3494 isolados de *S. aureus* oriundos de amostras clínicas, através de um banco de dados do setor de microbiologia do laboratório clínico do Hospital Universitário de Londrina no Estado do Paraná, dados dos quais foram coletados durante os anos de 2002 a 2011. De acordo com os resultados, houve um alto grau de resistência contra os antimicrobianos eritromicina (com 52% de resistência em 2002 e 46% em 2011, apresentando uma média de 49,4% da resistência quando incluído todo o intervalo de tempo), clindamicina (com 43% de resistência em 2002 e 41% em 2011, apresentando uma média de 41,8% da resistência quando incluído todo o intervalo de tempo), ciprofloxacino (com 34% de resistência em 2002 e 36% em 2011, apresentando uma média de 36,5% da resistência quando incluído todo o intervalo de tempo) e a rifampicina (com 7% de resistência nos anos de 2002 e 2011, apresentando uma média de 7,5% da resistência quando incluído todo o intervalo de tempo). De forma oposta, o estudo apontou uma tendência significativa de redução da taxa de resistência contra gentamicina e sulfametoxazol-trimetoprim, de 36% em 2002 para 15% em 2011 e de 31% em 2002 para 10% em 2011, respectivamente.

Outro estudo semelhante também foi realizado em um hospital terciário no Estado do Paraná. Duarte e colaboradores (2018), contendo participantes do mesmo grupo de pesquisa do estudo anterior, realizaram uma análise descritiva-retrospectiva do perfil de sensibilidade aos antimicrobianos de 720 amostras de *S. aureus* oriundas de hemocultura, com dados obtidos de 2001 a 2015. Semelhante ao estudo anterior, as maiores taxas de resistência foram observadas para ciprofloxacino (51,14%), eritromicina (44,99%) e clindamicina (39,85%) com tendência de aumento ao decorrer dos anos. As taxas para os antimicrobianos gentamicina, sulfametoxazol-trimetoprim e rifampicina foram as menores, em torno de 4%, que apresentaram queda significativa nos percentuais de resistência ao decorrer dos anos, demonstrando similaridade do perfil de resistência neste hospital para *S. aureus* e uma tendência para a epidemiologia da resistência no Estado.

Apesar dos estudos citados relatarem esta tendência da resistência elevada contra ciprofloxacino, clindamicina e eritromicina, como também terem realizado a triagem da

resistência contra cefoxitina para identificação de cepas MRSA, grande parte não disponibilizou dados da sensibilidade aos antimicrobianos de forma distinta para as cepas classificadas como MRSA.

No Brasil, grupos de pesquisa já relatam essa diferença em cepas de *S. aureus* circulantes pelos hospitais no país. Bride e colaboradores (2019) analisaram o perfil de sensibilidade aos antimicrobianos de 67 cepas de *S. aureus*, sendo 36 classificadas como MSSA e 31 classificadas como MRSA, isoladas de diversas amostras biológicas clínicas no Hospital Universitário Cassiano Antônio de Moraes, no Estado do Espírito Santo. Para cepas MRSA, a resistência à ciprofloxacino, eritromicina, clindamicina e rifampicina foi de 84%, 97%, 74% e 55% respectivamente, enquanto que para os mesmos antimicrobianos as amostras de MSSA apresentaram 8%, 19%, 8% e 0%.

Pena e colaboradores (2014) compararam os perfis de resistência de amostras de MRSA e MSSA isoladas de sangue e de ponta de cateter entre os anos de 2006 e 2008, obtidas de coleções fornecidas por laboratórios da Universidade Federal de Goiás. Entre os isolados das coleções, 233 amostras foram classificadas como MRSA e 35 como MSSA. As cepas MRSA apresentaram uma taxa maior de resistência aos antimicrobianos ciprofloxacino, clindamicina, eritromicina e gentamicina quando comparadas às cepas de MSSA. Em outro estudo, Gales e colaboradores (2009) relataram o perfil de sensibilidade aos antimicrobianos de amostras de MRSA e MSSA isoladas em hospitais brasileiros participantes do programa de vigilância SENTRY, entre os anos de 2005-2008. Enquanto as amostras de MSSA (n=1531) apresentaram 13% de resistência para eritromicina, 1,7% para clindamicina e 2,2% para ciprofloxacino, as amostras de MRSA (n=687) apresentaram uma resistência de 94%, 87,9% e 91,4% respectivamente.

Sendo assim, mesmo que cepas MSSA nosocomiais tenham taxas de resistência relevantes contra antimicrobianos, estas resistências tendem a ser ainda mais pronunciadas em cepas MRSA durante os testes de sensibilidade. Vale ressaltar também que os estudos citados acima utilizaram a padronização do CLSI para classificação da sensibilidade e resistência das cepas, o que pode ocasionar algumas variações nas taxas descritas, principalmente em relação aos antimicrobianos ciprofloxacino e rifampicina. Outro ponto a destacar é que os estudos publicados não realizaram a pesquisa da resistência induzível à clindamicina, apenas publicaram dados da resistência constitutiva.

Pela padronização do BrCAST, o perfil de resistência antimicrobiana das amostras de MRSA também demonstraram similaridade quando comparado a tipagem *SCCmec*. Das 26

amostras que apresentam tipagem *SCCmec* II, 17 (65,38%) apresentaram o mesmo padrão de sensibilidade e resistência antimicrobiana: Sensíveis, dose padrão (S) para gentamicina, rifampicina e sulfametoxazol-trimetoprim e Resistentes (R) a ciprofloxacino, eritromicina e a clindamicina. Com exceção de 2 amostras classificadas com tipagem *SCCmec* II, o restante das amostras (25 no total) com tipagem *SCCmec* IV foram as que apresentaram predominância para a classificação de Sensibilidade, aumentando exposição (I) para ciprofloxacino, assim como maior porcentagem de cepas sensíveis a dose padrão (S) para clindamicina e eritromicina, segundo os padrões do BrCAST. Curiosamente, as amostras com tipagem *SCCmec* IV foram mais resistentes à rifampicina (24% das amostras) em comparação às cepas com tipagem *SCCmec* II (3,85% das amostras). Não foi observada outra correlação entre os perfis de sensibilidade e resistência para as amostras *SCCmec* IV como o encontrado para as cepas *SCCmec* II positivas.

Observando os resultados obtidos, é possível notar que as cepas com tipagem *SCCmec* II mostraram-se mais resistentes aos antimicrobianos em comparação às cepas de tipagem *SCCmec* IV. O *SCCmec* II foi descrito pela primeira vez em 1999, encontrado na cepa N315 de MRSA e é predominantemente encontrado em cepas de origem hospitalar (HA-MRSA), caracterizado por conter outros genes de resistência a antibióticos não β -lactâmicos, assim como o *SCCmec* I e III (LAKHUNDI & ZHANG, 2018). O *SCCmec* IV foi reportado pela primeira vez em cepas de MRSA isoladas de fluidos articulares em 2002, porém adquiridas na comunidade (CA-MRSA). O *SCCmec* IV é considerado um dos menores cassetes da classificação pelo seu tamanho, contudo contém bastante variação na sua composição, sendo categorizado em vários subtipos. Este cassette também é descrito na literatura por não conter genes de resistência aos antimicrobianos além do *mecA* (LAKHUNDI & ZHANG, 2018).

Apesar do *SCCmec* IV ser descrito como predominante em amostras de MRSA comunitárias, atualmente ele já está circulando em hospitais pelo Brasil. Isso deve-se ao fato da mudança epidemiológica evidenciada no território nacional, em que o clone antes predominante nos hospitais (Brazilian Endemic Clone - BEC), que contém o *SCCmec* tipo III, tem sido substituído por outras cepas com tipagem *SCCmec* tipo II e IV, e que é evidenciado pela tipagem realizada das amostras de MRSA aqui analisadas pelo grupo de pesquisa do GeMBac/UFSC e outros grupos de pesquisa brasileiros (DOMINSKI, 2018; FIGUEIREDO *et al.*, 2016; NASCIMENTO *et al.*, 2018).

Essa mudança também fica evidenciada quando comparamos a tipagem *SCCmec* das amostras de MRSA de SC deste estudo com as amostras tipadas por Silveira e Colaboradores (2015a). Os pesquisadores encontraram nas amostras um predomínio das taxas de detecção de *SCCmec* tipo III (cerca de 54% das amostras) em relação à detecção de cepas com tipagem *SCCmec* tipo II (21,8%) e IV (16,1%). As 124 amostras de MRSA analisadas no estudo foram coletadas entre os anos de 2009 e 2013, evidenciando que a substituição dos clones estava em desenvolvimento, pela tipagem realizada por Dominski (2018) com a análise das amostras selecionadas neste estudo, coletadas entre os anos de 2016 e 2017.

Ainda que cepas *SCCmec* tipo IV sejam mais sensíveis aos antimicrobianos, sua chegada ao ambiente hospitalar pode gerar modificações neste perfil no decorrer do tempo. Há hipóteses que a menor taxa de resistência antimicrobiana observada em cepas *SCCmec* tipo IV em relação a cepas *SCCmec* I, II e III seja associada ao tamanho do cassete gênico e exposição aos antimicrobianos. Enquanto cepas portadoras desses cassetes maiores possuem menos genes de virulência, as mesmas apresentam números elevados de fatores de resistência devido a adaptação ao ambiente hospitalar em que são expostas aos antimicrobianos. Em contrapartida, as cepas portadoras de cassetes menores, como o observado em cepas *SCCmec* tipo IV, apresentam menos resistência aos antimicrobianos e uma maior associação a genes de virulência, devido ao equilíbrio da expressão gênica e custo biológico, mediados pelo ambiente menos exposto aos antimicrobianos e o tamanho limitado do elemento *SCCmec* (COLLINS *et al.*, 2010). Mesmo com diversas hipóteses não solucionadas na literatura sobre a diferença da resistência aos antimicrobianos entre cepas portadoras de *SCCmec* com tipagens diferentes, ainda é preocupante a presença de cepas *SCCmec* tipo IV no ambiente hospitalar pelo seu grau de adaptação e maior virulência, podendo ter impacto negativo no quadro clínico de pacientes infectados (RODRÍGUEZ-NORIEGA *et al.*, 2010, FIGUEIREDO & FERREIRA, 2014).

Corroborando com os resultados deste trabalho, as diferenças entre a sensibilidade aos antimicrobianos das cepas *SCCmec* II e IV é igualmente relatada na literatura. Em um estudo anterior, Bride e colaboradores (2019) também analisaram separadamente o perfil de resistência das amostras de MRSA com tipagem *SCCmec* II e IV. Todas as amostras com tipagem *SCCmec* II apresentaram uma resistência frente a ciprofloxacino, eritromicina e clindamicina de 100%, enquanto as cepas com tipagem *SCCmec* IV apresentaram taxas menores de 44%, 89% e 11%.

Chamon e colaboradores (2017) analisaram o perfil de sensibilidade aos antimicrobianos de isolados de MRSA oriundos de hemoculturas entre 2 hospitais do Estado do Rio de Janeiro. Da totalidade de 26 amostras de MRSA com tipagem *SCCmec* II, 100%

apresentou resistência contra ciprofloxacino, eritromicina e clindamicina. Já as amostras classificadas com tipagem *SCCmec* IV, em um total de 18 amostras, as resistências foram menores, com 83,3% de resistência para ciprofloxacino e 44,4% para eritromicina e clindamicina. Portanto, os resultados do perfil de resistência avaliado pelo TSA nas cepas de MRSA entre amostras *SCCmec* II e IV seguem condizentes com o descrito na literatura.

Outro ponto a ressaltar é que o perfil de resistência aos antimicrobianos de *S. aureus* é, em geral, correlacionado às linhagens das quais as amostras pertencem (ACAR & ROSTEL., 2001; TENOVER, 2006). Dessa forma, a resistência (e também a virulência) das cepas de MRSA disseminadas pelo mundo sofrem influência do perfil genético do clone a qual pertencem, pois linhagens iguais ou semelhantes possuem a tendência de adquirir certos marcadores genéticos específicos para si, que através de mutações podem ou não se modificarem e resultar na heterogeneidade dos perfis observados de virulência e resistência aos antimicrobianos das cepas de MRSA, do qual não podem ser explicados ou justificados a partir de uma única condição (FIGUEIREDO & FERREIRA, 2014). Infelizmente, apenas uma amostra da coleção testada foi submetida à tipagem MLST em estudo anterior, o que dificulta realizar uma correlação mais precisa das linhagens de MRSA da coleção com os demais fatores de resistência e virulência abordados aqui. Adicionalmente, também se desconhece a origem das amostras de MRSA com relação ao seu isolamento, se são de origem comunitária ou hospitalar, tornando-se estes, fatores limitantes do estudo realizado. A tipagem MLST foi realizada em um estudo anterior na amostra 17003-*SCCmec* II (DOMINSKI, 2018), que resultou em um ST de 105, estreitamente correlacionado ao clone NY/Japão (ST5) de origem hospitalar, conhecido pelo amplo perfil de resistência aos antimicrobianos (FIGUEIREDO & FERREIRA, 2014).

Também foi realizado neste estudo a pesquisa dos genes de virulência *tst*, *seg* e *seh*. O gene *tst* é responsável por codificar um superantígeno extracelular causador da síndrome do choque tóxico. Essa toxina estimula a liberação de grandes quantidades de interleucina 1 (IL-1), interleucina 2 (IL-2) e o fator de necrose tumoral (TNF- α), classificando esta síndrome como uma doença aguda grave, caracterizada por sintomas como febre, erupção cutânea, hipotensão e disfunção de múltiplos órgãos (DINGES *et al.*, 2000). Apesar da síndrome do choque tóxico ser uma condição rara (1 à 3 casos da doença por 100.000 habitantes), foi documentado que aproximadamente 20% dos *S. aureus* encontrados colonizando de forma assintomática em um ou mais locais do corpo são competentes produtoras desta toxina por carregarem este gene,

indicando que pode haver uma ascensão do potencial desta doença (ZHAO *et al.*, 2019). Possíveis hipóteses para a taxa relativamente alta de isolados de *S. aureus* colonizando de forma assintomática positivos para *tst*, associada à baixa incidência da manifestação clínica da síndrome do choque tóxico, sugere-se que este gene sofra fortemente um controle regulatório associado a fatores ambientais e genéticos para que ocorra sua expressão, e assim, o aparecimento dos sintomas da doença (ZHAO *et al.*, 2019).

Há divergências quanto a prevalência do gene *tst* em cepas MRSA e MSSA, como também a relação da detecção deste gene no perfil de virulência de isolados de *S. aureus* em comparação a localização geográfica. Parrish e colaboradores (2019) investigaram a prevalência do gene *tst* em isolados clínicos de MSSA e MRSA associados à comunidade numa população pediátrica entre 2008 e 2017 nos Estados Unidos, na região metropolitana de St. Louis. De acordo com o estudo, 16% dos isolados de MSSA tiveram detecção positiva para o gene *tst* frente à 0,2% dos isolados de MRSA. Koosha e colaboradores (2016) avaliaram a incidência do gene *tst* e *mecA* em 197 amostras de *S. aureus* obtidas entre 2011 e 2012 em hospitais educacionais no norte de Teerã, no Irã. O gene *tst* foi encontrado em 69,8% das cepas que tiveram o gene *mecA* detectado, classificados como MRSA, como também foi detectado em 56% dos isolados que não tiveram a detecção positiva do gene de *mecA*, classificados como MSSA. Desse modo, não só incidência desse gene foi alta neste país, como sua distribuição entre os isolados de MRSA e MSSA foi semelhante, demonstrando que a epidemiologia de *S. aureus* portadores de *tst* não dependem necessariamente do perfil de resistência das cepas e pode ser extremamente variável de acordo com a localização geográfica.

No Brasil, estudos revelam a presença do gene *tst* em amostras isoladas de MRSA. Rossato e colaboradores (2018) investigaram a presença de genes de virulência em 177 amostras de MRSA nosocomiais coletados entre 2012 e 2014 em hospitais de Porto Alegre, Rio Grande do Sul. O gene *tst* foi encontrado em 27,7% das amostras analisadas, principalmente em cepas isoladas a partir de dispositivos médicos implantáveis e fluidos biológicos. Carvalho e colaboradores (2019) caracterizam o perfil genético de 30 isolados de MRSA oriundos do ambiente e superfície de equipamentos da unidade de terapia intensiva (UTI) e de crianças saudáveis no Estado da Bahia. O gene *tst* foi encontrado em 13,3% das amostras, todas classificadas geneticamente como HA-MRSA, encontradas na superfície de painéis de controle e piso da UTI. Oliveira e colaboradores (2015) também encontraram uma prevalência de 34,1% do gene *tst* em 123 amostras de MRSA isoladas de pacientes hospitalizados entre 2010 e 2013

no Hospital Universitário de Londrina, Paraná. Desse modo, mostrou-se que há cepas de MRSA circulantes com potencial de desenvolvimento da síndrome do choque tóxico.

Pela pesquisa realizada, o gene *tst* está presente em diversas cepas de MRSA no Brasil, tendo associado seu isolamento com estudos relacionados a cepas nosocomiais. Contudo, visto que a detecção do gene *tst* nas amostras de MRSA de SC analisadas em nosso estudo foi baixa (7,3%), sugere-se que a causa para as infecções mais invasivas ocasionadas por MRSA em pacientes do Estado não estão relacionadas a contribuição desta toxina.

A detecção dos genes *seg* e *seh* nas amostras de MRSA de SC, codificantes para produção da enterotoxina G e H, respectivamente, também foi avaliada neste estudo. As enterotoxinas estafilocócicas são produzidas por *S. aureus*, que é um dos principais agentes envolvidos em intoxicações alimentares transmitidas por alimentos, tendo como principais sintomas náusea, vômito, diarreia, dor de cabeça, cólica abdominal, cãibra muscular, queda de pressão sanguínea e prostração. São proteínas monoméricas, de vida média-longa, resistentes a muitas enzimas proteolíticas como a pepsina, tripsina, renina e papaína; tendo assim sua atividade preservada no sistema digestivo, além de serem altamente resistentes ao calor (CANDIDO, 2018; DITTMANN *et al.*, 2017; SANTILIANO *et al.*, 2011).

O gene codificante da enterotoxina G (*seg*) faz parte do cluster *egc* (genes agrupados), que abriga de 5 a 6 genes de enterotoxinas (*seg*, *sei*, *sem*, *sen*, *seo* e às vezes *seu*), que se agrupam em uma ilha de patogenicidade estafilocócica (*vSaβ*) (GRUMANN *et al.*, 2008). Estima-se que o *egc* esteja presente em 52-66% das cepas de *S. aureus* comensais e invasivas (GRUMANN *et al.*, 2008; NOWROUZIAN *et al.*, 2015). Por tratar-se de um cluster, é provável que os demais genes estejam presentes quando há detecção do gene *seg* (ou outro do gene do cluster) em uma amostra, embora não seja uma regra (STACH *et al.*, 2016). Ainda é pouco documentado o papel deste cluster na patogenicidade de *S. aureus*. Porém, um estudo utilizando deleção gênica em modelo animal sugere que este cluster contribui para o desenvolvimento de endocardite infecciosa (STACH *et al.*, 2016). No presente estudo, as amostras de MRSA analisadas apresentaram baixa detecção para o gene *seg*, e, dentro das limitações de apenas 25 amostras serem analisadas para a presença do gene *seh*, nenhuma demonstrou carrear o gene. Sugere-se que isto pode ser devido as estirpes de MRSA serem oriundas de infecções mais invasivas, sem relações com cepas de origem alimentar, na qual a presença de enterotoxinas predomina, como também pelas enterotoxinas G e H pertencerem ao grupo de enterotoxinas

não clássicas, responsáveis por um menor número de casos de intoxicação (DITTMANN *et al.*, 2017; LI *et al.*, 2018).

Contextualizando tudo o que foi abordado até o momento, as análises aqui realizadas não justificam os resultados encontrados para a baixa incidência de MRSA no Estado de SC que foi observada no estudo de Silveira de colaboradores (2015a). A hipótese das cepas de MRSA da coleção apresentarem um perfil de resistência aos antimicrobianos diferenciado (por exemplo, sendo mais sensíveis aos antimicrobianos), que poderia estar correlacionado com o baixo número reportado de infecções por MRSA no Estado, é contraposta pelo elevado número de cepas MDR encontradas na coleção. Como não há estudos epidemiológicos sobre o MRSA em SC, foi suposto que uma maior sensibilidade aos antimicrobianos poderia ser associada (pelo menos em parte) a causa ou uma consequência do fenômeno, visto que tendo cepas mais sensíveis ao tratamento antimicrobiano, a disseminação do MRSA estaria com um melhor controle.

Já sobre a virulência, a detecção dos genes *tst*, *seg* e *seh* entre amostras MRSA de SC analisadas foi relativamente baixa quando comparada aos dados da literatura. No entanto, mais estudos sobre a virulência das cepas são necessários para confirmar ou refutar a hipótese, já que os resultados encontrados neste estudo são apenas preliminares e não representativos da dinâmica do aparato de virulência do *Staphylococcus aureus*.

7. CONCLUSÃO

Os resultados deste estudo revelaram uma alta incidência de amostras de MRSA isoladas em SC classificadas como MDR, corroborando com a literatura para a predominância da resistência aos antimicrobianos ciprofloxacino, eritromicina e clindamicina reportada às demais cepas de MRSA isoladas no Brasil. Até o momento, os resultados deste estudo refutam a hipótese da baixa incidência de MRSA em SC pelo perfil similar da sensibilidade dos antimicrobianos testados com outras cepas de MRSA descritas na literatura, como também refutam uma maior virulência das cepas pelos baixos índices de detecção dos genes *tst*, *seg* e *seh* ligados a virulência do MRSA. Contudo, devido ao número limitado de análises realizadas, novos experimentos e metodologias são necessárias para melhorar a qualidade dos dados encontrados e promover uma melhor evidência científica para o que de fato está ocorrendo com a epidemiologia do MRSA em SC.

8. PERSPECTIVAS

De forma a compreender melhor a intrigante epidemiologia da baixa incidência de MRSA em SC observada por Silveira e colaboradores (2015a) e também a biologia destas amostras no âmbito da interação com o hospedeiro humano, faz-se necessário: (i) ampliar a caracterização das linhagens das amostras de MRSA da coleção através da tipagem pela metodologia do MLST, podendo também complementar sua identificação clonal através de outras metodologias, como a eletroforese em campo pulsado (PFGE) e análise do polimorfismo do gene *spa*; (ii) Implementar modelos de estudo da virulência *in vitro* e *in vivo*; (iii) Captar mais dados sobre as amostras e dados epidemiológicos relacionados, como o uso de antimicrobianos no Estado, identificação das amostras como CA-MRSA ou HA-MRSA e levantamento geográfico das regiões de maior incidência dentro de SC.

9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABDULLAHI, I. N. et al. Ecology and Genetic Lineages of Nasal *Staphylococcus aureus* and MRSA Carriage in Healthy Persons with or without Animal-Related Occupational Risks of Colonization: A Review of Global Reports. **Pathogens**, vol. 10, n. 8, p. 1000, 2021.
- ABUSHAHEEN, M. A. et al. Antimicrobial resistance, mechanisms and its clinical significance. **Disease-a-Month**, v. 66, n. 6, 2020.
- ACAR, J.; ROSTEL, B. Antimicrobial resistance: an overview. **Revue Scientifique et Technique-Office International des Epizooties**, v. 20, n. 3, p. 797-810, 2001.
- ANVISA. (2007). Antimicrobianos em Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Disponível em: <https://www.anvisa.gov.br/servicosade/controlere/rede_rm/cursos/rm_controlere/opus_web/modulo1/antimicrobianos.htm> Acesso em: 16 de Abr de 2021.
- ANVISA. (2020). Boletim Segurança do Paciente e Qualidade em Serviços de Saúde nº 23 - Avaliação dos Indicadores Nacionais de Infecções Relacionadas à Assistência à Saúde (IRAS) e Resistência Microbiana, ano 2020. Disponível em: <<https://www.gov.br/anvisa/pt-br/centraisdeconteudo/publicacoes/servicosdesaude/publicacoes>> Acesso em: 23 de Dez de 2021.
- ANDRADE, M. M. et al. The History of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* in Brazil. **Journal of Infectious Diseases and Medical Microbiology**, 2020.
- APPELBAUM, P. C. Reduced glycopeptide susceptibility in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 30, n. 5, p. 398-408, 2007.
- ARIAS, C. A. et al. A Prospective Cohort Multicenter Study of Molecular Epidemiology and Phylogenomics of *Staphylococcus aureus* Bacteremia in Nine Latin American Countries. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 62, n. 3, 2018.
- ASADOLLAHI, P. et al. Distribution of the most prevalent Spa types among clinical isolates of methicillin-resistant and susceptible *Staphylococcus aureus* around the world: a review. **Frontiers in Microbiology**, v. 9, n. 1, p. 163, 2018.
- BADILLA-LOBO, A.; RODRÍGUEZ, C. Microbiological features, epidemiology, and clinical presentation of *Clostridioides difficile* strains from MLST Clade 2: A narrative review. **Anaerobe**, v. 69, 2021.
- BECKER, K. et al. Coagulase-negative staphylococci. **Clinical Microbiology Reviews**. v. 27, n. 4, p. 870-926, 2014.
- BOETTCHER, I. S. **PERFIL MICROBIOLÓGICO DAS CULTURAS POSITIVAS DA UNIDADE DE TERAPIA INTENSIVA DO HOSPITAL UNIVERSITÁRIO – UFSC**. Trabalho de Conclusão de Curso (Curso de Medicina) – Universidade Federal de Santa Catarina. Florianópolis, p. 42. 2009.
- BOTTEGA, A. et al. Evaluation of constitutive and inducible resistance to clindamycin in clinical samples of *Staphylococcus aureus* from a tertiary hospital. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 47, n. 5, p. 589-592, 2014.

Brazilian Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (BrCAST). **Teste sensibilidade aos antimicrobianos: Método de disco-difusão BrCAST**. Versão 9.0 (2021). Disponível em: <<http://brcast.org.br/documentos/>> Acesso em: 07 de Jul de 2021.

Brazilian Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (BrCAST). **Tabelas de pontos de corte para interpretação de CIMs e diâmetros de halos**. Versão 11.0 (2021). Disponível em: <<http://brcast.org.br/documentos/>> Acesso em: 15 de Abr de 2021.

BRIDE, L. L. et al. Differences in resistance profiles and virulence genes among methicillin-resistant and methicillin-susceptible *Staphylococcus aureus* of different lineages at a public tertiary hospital. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 52, 2019.

CAMPBELL, E. A. et al., Structural Mechanism for Rifampicin Inhibition of Bacterial RNA Polymerase. **Cell**, v. 104, n. 6, p. 901-912, 2001.

CANDIDO, T. J. S. Fatores de virulência e subtipagem de *Staphylococcus aureus* isolados de laticínios orgânicos e convencionais no estado de São Paulo. 84 f. 2018. Dissertação (Mestrado) - Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2018.

CANTÓN, R. et al. Antimicrobial resistance in ICUs: an update in the light of the COVID-19 pandemic. **Current Opinion in Critical Care**, v. 26, n. 5, p. 433-441, 2020.

CARVALHO, S. P. et al. Molecular characteristics of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates from hospital and community environments in northeastern Brazil. **Brazilian Journal of Infectious Diseases**, v. 23, n. 2, p. 134-138, 2019.

CASANOVA, N. G. et al. Mechanisms of resistance to daptomycin in *Staphylococcus aureus*. **Revista Española de Quimioterapia**, v. 30, n. 6, p. 391-396, 2017.

Centers for Disease Control and Prevention (CDC). Strategies for Clinical Management of MRSA in the Community: Summary of an Experts' Meeting Convened by the Centers for Disease Control and Prevention. Março, 2006. Disponível em: <<https://www.cdc.gov/mrsa/pdf/mrsa-strategies-expmtgsummary2006.pdf>>. Acesso em: 16 de Fevereiro de 2022.

CHAMON, R. C. et al. Complete substitution of the Brazilian endemic clone by other methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* lineages in two public hospitals in Rio de Janeiro, Brazil. **Brazilian Journal of Infectious Diseases**, v. 21, n. 2, p. 185-189, 2017.

Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). **Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing**. M100 ed. 31 (2021). Disponível em: <<https://clsi.org/standards/products/free-resources/access-our-free-resources/>> Acesso em: 15 de Abr. de 2021.

DE OLIVEIRA, D. M. P. et al. Antimicrobial Resistance in ESKAPE Pathogens. **Clinical microbiology reviews**, v. 33, n. 3 p.181-199, 2020.

DE JONG, N. W. M., Immune Evasion by *Staphylococcus aureus*. **Microbiology Spectrum**, v. 7, n. 2, 2019.

DIALLO, O. O. et al. Antibiotic resistance surveillance systems: A review. **Journal of Global Antimicrobial Resistance**. v. 23, p. 430-438, 2020.

DINGES, M. M. et al. Exotoxins of *Staphylococcus aureus*. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 13, p. 16-34, 2000.

DITTMANN, K. K. et al. *Staphylococcus aureus* in Some Brazilian Dairy Industries: Changes of Contamination and Diversity. **Frontiers in Microbiology**, v. 8, 2017.

DOMINSKI, B. H. **CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DE AMOSTRAS DE *Staphylococcus aureus* RESISTENTES À METICILINA (MRSA) ISOLADOS NO ESTADO DE SANTA CATARINA.** Trabalho de Conclusão de Curso (Curso de Biologia) – Universidade Federal de Santa Catarina. Florianópolis, p. 49. 2018.

DOS SANTOS, S. C. G. et al. Molecular epidemiology of *Staphylococcus aureus* in Brazil: high frequency of international epidemic|pandemic clones, CA-MRSA and perspectives. **Brazilian Journal of Development**. v. 7, n. 4, p. 35734-35751, 2021.

DUARTE, F. C. et al. Bacteremia causada por *Staphylococcus aureus*: Uma análise de quinze anos da sensibilidade a antimicrobianos em um hospital terciário do Brasil. **Revista De Epidemiologia e Controle De Infecção**, v. 8, n. 3, p. 232-238, 2018.

DUERDEN, B. MRSA: why have we got it and can we do anything about it?. **Eye** 26. p. 218-221, 2012.

EVANGELISTA, S. S., et al.. *Staphylococcus aureus* metilino resistente adquirido na comunidade: um problema mundial. **Revista Brasileira de Enfermagem**. v. 68, n. 1, p. 43-136, 2015.

European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST). Breakpoint tables for interpretation of MICs and zone diameters. Version 12.0 (2022). Disponível em: <https://www.eucast.org/clinical_breakpoints/> Acesso em: 16 de Fevereiro de 2022.

EYLER, R. F et al. Clinical Pharmacology of Antibiotics. **Clinical journal of the American Society of Nephrology**, v. 14, n. 7, p. 1080-1090, 2019.

FELDHHAUS, J. C. et al. Colonização por MRSA no projeto piloto do estudo SHIP-Brasil. **Revista Brasileira de Análises Clínicas**. v. 48, n. 1, p. 27–32, 2016.

FIGUEIREDO, A. M. S.; FERREIRA, F. A. The multifaceted resources and microevolution of the successful human and animal pathogen methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 109, n. 3, p. 265–278, 2014.

FIGUEIREDO, M. A et al. Clonal diversity and epidemiological characteristics of *Staphylococcus aureus*: high prevalence of oxacillin-susceptible mecA-positive *Staphylococcus aureus* (OS-MRSA) associated with clinical isolates in Brazil. **BMC Microbiology**, v. 16, n. 1, p. 115, 2016.

FIGUEIREDO, A. M. S. et al. The role of biofilms in persistent infections and factors involved in ica-independent biofilm development and gene regulation in *Staphylococcus aureus*. **Critical Reviews in Microbiology**, v. 0, n. 0, p. 1–19, 2017.

GALES, A. C. Antimicrobial susceptibility of gram-positive bacteria isolated in Brazilian hospitals participating in the SENTRY Program (2005-2008). **Brazilian Journal of Infectious Diseases**, v. 13, n. 2, 2009.

GOLDMANN, O. et al. *Staphylococcus aureus* strategies to evade the host acquired immune response. **International Journal of Medical Microbiology**, v. 308, n. 6, p. 625-630, 2018.

GRUMANN, D. et al. Immune cell activation by enterotoxin gene cluster (egc)-encoded and non-egc superantigens from *Staphylococcus aureus*. **Journal of Immunology**, v. 181, n. 7, p. 5054-5061, 2008.

- HASHEMIAN, S. M. R. et al. Linezolid: a review of its properties, function, and use in critical care. **Drug design, development and therapy**, v. 12, p. 1759-1767, 2018.
- HASSOUN, A. et al. Incidence, prevalence, and management of MRSA bacteremia across patient populations-a review of recent developments in MRSA management and treatment. **Critical care**, v. 21, n. 1, p. 211, 2017.
- HOMBACH, M. et al. The critical influence of the intermediate category on interpretation errors in revised EUCAST and CLSI antimicrobial susceptibility testing guidelines. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 19, n. 2, p. 59-71, 2013.
- HUSEBY, M. et al. Structure and biological activities of beta toxin from *Staphylococcus aureus*. **Journal of Bacteriology**, v. 189, n. 23, p. 8719-9726, 2007.
- International Working Group on the Classification of Staphylococcal Cassette Chromosome Elements (IWG-SCC). Classification of staphylococcal cassette chromosome mec (*SCCmec*): guidelines for reporting novel *SCCmec* elements. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 53, n.12, p.4961-4967, 2009.
- KASSIM, A. et al. Comparison of Clinical Laboratory Standards Institute and European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing guidelines for the interpretation of antibiotic susceptibility at a University teaching hospital in Nairobi, Kenya: a cross-sectional study. **Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials**, v. 15, 2016.
- KOOSHA, Z. R., et al. Distribution of *tsst-1* and *mecA* Genes in *Staphylococcus aureus* Isolated From Clinical Specimens. **Jundishapur journal of microbiology**, v. 9, n. 3, 2016.
- LAKHUNDI S.; ZHANG K. Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*: Molecular Characterization, Evolution, and Epidemiology. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 31, n. 4, 2018.
- LABARCA, J. L.; ARAOS, R. B. Resistencia antimicrobiana: Problema en aumento y soluciones escasas. **Revista Chilena de Infectología**, v. 26, n. 1, p. 8-9, 2009.
- LEE, A. et al. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. **Nature Review Disease Primers**. v. 4, 2018.
- LI, Y. et al. High flux isothermal assays on pathogenic, virulent and toxic genetics from various pathogens. **Microbial Pathogenesis**, v. 116, p. 68-72, 2018.
- LIMA, M. F. P. et al. *Staphylococcus aureus* e as infecções hospitalares - revisão de literatura. **Revista Uningá Review**. v. 21, n. 1, 2015.
- LISTER, J. L. et al. *Staphylococcus aureus* biofilms: recent developments in biofilm dispersal. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 4, p. 178, 2014.
- LIU, B. G. et al. Research progress on the oxazolidinone drug linezolid resistance. **European Review for Medical and Pharmacological Sciences**, v. 24, n. 18, p. 9274-9281, 2020.

LIU, C. et al. Clinical practice guidelines by the infectious diseases society of america for the treatment of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infections in adults and children. **Clinical Infectious Diseases**, v. 52, n. 3, p. 285-292, 2011.

LIU, W. et al. Emerging resistance mechanisms for 4 types of common anti-MRSA antibiotics in *Staphylococcus aureus*: A comprehensive review. **Microbial Pathogenesis**, 2021.

ITIS. **Integrated Taxonomic Information System**. *Staphylococcus* Rosenbach, 1884. 2021. Disponível em: <https://www.itis.gov/servlet/SingleRpt/SingleRpt?search_topic=TSN&search_value=359#null>. Acesso em: 17 de jan. 2022.

MAGIORAKOS, A. P. Multidrug-resistant, extensively drug-resistant and pandrug-resistant bacteria: an international expert proposal for interim standard definitions for acquired resistance. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 18, n. 3, p. 268-81, 2012.

MANDELL, G. L. Catalase, superoxide dismutase, and virulence of *Staphylococcus aureus*. In vitro and in vivo studies with emphasis on staphylococcal--leukocyte interaction. **Journal of Clinical Investigation**. v. 55, n. 3, p. 561-566, 1975.

GOUDARZI, M. et al. Distribution of SCCmec types, tetracycline and aminoglycoside resistance genes in hospital-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains. **Gene Reports**, v.16, 2019.

MIKLASINSKA-MAJDANIK, M. Mechanisms of Resistance to Macrolide Antibiotics among *Staphylococcus aureus*. **Antibiotics (Basel, Switzerland)**, v. 10, n.11, p. 1406, 2021.

MIMICA, M. J. et al. Diagnóstico laboratorial da resistência à oxacilina em *Staphylococcus aureus*. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v. 43, n. 6, p. 399-406, 2007.

MOORMEIER, D. E. et al. *Staphylococcus aureus* biofilm: a complex developmental organism. **Molecular Microbiology**, v. 104, n. 3, p. 365-376, 2017.

NAAS, T. et al. Beta-Lactamase DataBase (BLDB) – Structure and Function. **Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry**, v. 32, p. 917-919, 2017.

NAJARZADEH, Z. et al. Heparin promotes fibrillation of most phenol-soluble modulin virulence peptides from *Staphylococcus aureus*. **Journal of Biological Chemistry**, v. 297, n. 2, 2021.

NAKAJIMA, I. et al. *Staphylococcus* bacteremia without evidence of cardiac implantable electronic device infection. **Heart Rhythm**. v. 18, n. 5, p. 752-759, 2021.

NASCIMENTO, T. C. et al. *Staphylococcus aureus* resistente à meticilina isolado em uma unidade de terapia intensiva de Minas Gerais, Brasil, por um período de seis anos. **Revista Brasileira de Doenças Infecciosas**, v. 22, n. 1, 2018.

NOWROUZIAN, F. L. et al. Impacts of enterotoxin gene cluster-encoded superantigens on local and systemic experimental *Staphylococcus aureus* infections. **European Journal of Clinical Microbiology**, v. 34, n. 7, p. 1443-1449, 2015.

OLIVEIRA, D. et al. *Staphylococcus aureus* Toxins and Their Molecular Activity in Infectious Diseases. **Toxins (Basel)**, v. 10, n. 6, p. 252, 2018.

OLIVEIRA, C. F. et al. Molecular and phenotypic characteristics of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolated from hospitalized patients. **Journal of Infection in Developing Countries**, v. 9, n. 7, p. 743-751, 2015.

OTTO, M. Community-associated MRSA: What makes them special? **International journal of medical microbiology**. v. 303, p. 324-330, 2013.

PARASTAN, R. et al. *Staphylococcus aureus* biofilms: Structures, antibiotic resistance, inhibition, and vaccines. **Gene Reports**. v. 20, n.1, 2020.

PARRISH, K. L., et al. Carriage of the Toxic Shock Syndrome Toxin Gene by Contemporary Community-Associated *Staphylococcus aureus* Isolates. **Journal of the Pediatric Infectious Diseases**, v. 8, n. 5, p. 470-473, 2019.

PENA, D. R. et al. Perfil de resistência dos *Staphylococcus aureus* isolados de sangue e cateter. **Enciclopédia Biosfera**, v. 10, n. 19, p. 388-396, 2014.

PEREIRA, V. C. et al. Coagulase-negative staphylococci: a 20-year study on the antimicrobial resistance profile of blood culture isolates from a teaching hospital. **The Brazilian Journal of Infectious Diseases**. v. 24, n. 2, p. 160-169, 2020.

PERUGINI, M. R. E et al. Tendência de resistência entre isolados clínicos de *Staphylococcus aureus* em um hospital universitário do norte do Paraná de 2002 a 2011. **Semina: Ciências Biológicas e da Saúde**. v. 36, n. 1, Supl, p. 275-282, 2015.

PHILLIPS-JONES, M. K. et al. Antimicrobial resistance (AMR) nanomachines-mechanisms for fluoroquinolone and glycopeptide recognition, efflux and/or deactivation. **Biophysical reviews**, v. 10, n. 2, p. 347-362, 2018.

PILLONETTO, M. et al. The Experience of Implementing a National Antimicrobial Resistance Surveillance System in Brazil. **Frontiers in Public Health**, v. 8, p. 993, 2021.

RODRÍGUEZ-NORIEGA, E. et al. Evolution of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clones in Latin America. **International Journal of Infectious Diseases**, v. 14, n. 1, p. 560-566, 2010.

- ROSSATO, A. M. Coexistence of virulence genes in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clinical isolates. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 51, n. 3, p. 361-363, 2018.
- SÁNCHEZ-BAUTISTA, A. et al. From CLSI to EUCAST guidelines in the interpretation of antimicrobial susceptibility: What is the effect in our setting? **Enfermedades infecciosas y microbiología clínica**, v. 36, n. 4, p. 229-232, 2018.
- SANTILIANO, F.C. et al. Análise comparativa dos métodos de detecção de enterotoxinas estafilocócicas de importância médica e veterinária. **PUBVET**, v. 5, n. 3, 2011.
- SANTOS, A. L. et al. *Staphylococcus aureus*: visitando uma cepa de importância hospitalar. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**. v. 43, n. 6, p. 413-423, 2007.
- SANTOS, M. P. et al. Diferença nos Fatores de Virulência *Staphylococcus aureus* Meticilina-Sensível e Meticilina-Resistente. *Journal of Medicine and Health Promotion* ., v. 2, n. 3, p. 719-723, 2017.
- SEAS, C. et al. *Staphylococcus aureus* bloodstream infections in Latin America: results of a multinational prospective cohort study. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**. v. 73, n. 1, p. 212-222, 2018.
- SHARIATI, A. et al. Global prevalence and distribution of vancomycin resistant, vancomycin intermediate and heterogeneously vancomycin intermediate *Staphylococcus aureus* clinical isolates: a systematic review and meta-analysis. **Scientific reports**, v. 10, n. 1, 2020.
- SHEKARABI, M. et al. Molecular characterization of vancomycin-resistant *Staphylococcus aureus* strains isolated from clinical samples: A three year study in Tehran, Iran. **PLoS ONE**. v. 12, 2017.
- SIDELL, S. et al. New Antistaphylococcal Antibiotics: Comparative *in vitro* and *in vivo* Activity of Cephalothin, Nafcillin, Cloxacillin, Oxacillin, and Methicillin. **Archives of Internal Medicine**, v. 112, n. 1, p. 21-28, 1963.
- SILVA, D. M. Prevalence and antimicrobial susceptibility profile of ESKAPE pathogens from the Federal District, Brazil. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v. 53, n.4, p. 240-245, 2017.
- SILVA, J. B. et al. Epidemiologia Molecular de MRSA no Brasil. **Revista Transformar**, v. 14, n. 1, p. 588- 606, 2020.
- SILVA, M. O.; AQUINO, S. Resistência aos antimicrobianos: uma revisão dos desafios na busca por novas alternativas de tratamento. **Revista de epidemiologia e controle de infecções**. v. 8, n. 4, p. 472-482, 2018.
- SILVEIRA, A. C. O. et al. Molecular epidemiology of heteroresistant vancomycin intermediate *Staphylococcus aureus* in Brazil. **Brazilian Journal of Infectious Diseases**. v. 19, n. 5, p. 466–472, 2015b.

- SILVEIRA, A. C. O. et al. MRSA from Santa Catarina State, Southern Brazil: Intriguing epidemiological differences compared to other Brazilian regions. **Brazilian Journal of Infectious Diseases**, v. 19, n. 4, p. 384–389, 2015a.
- SIMJEE, S. et al. Characterization of Tn1546 in vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* isolated from canine urinary tract infections: evidence of gene exchange between human and animal enterococci. **Journal of Clinical Microbiology**. v. 40, n. 12, p. 4659-4665, 2002.
- SIMÕES-SILVA, L. et al. Oral colonization of *Staphylococcus* species in a peritoneal dialysis population: a possible reservoir for PD-Related infections?. **The Canadian Journal of Infectious Diseases & Medical Microbiology**. 2018.
- SOWASH, M. G. et al.. Community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* case studies. **Methods in Molecular Biology**. v. 1085, p. 25-69, 2014.
- STACH, C. S. et al. Novel Tissue Level Effects of the *Staphylococcus aureus* Enterotoxin Gene Cluster Are Essential for Infective Endocarditis. **PLoS One**, v. 11, n. 4, 2016.
- STOGIOS, P. J; SAVCHENKO, A. Molecular mechanisms of vancomycin resistance. **Protein science: a publication of the Protein Society**, v. 29, n.3, p. 654-669, 2020.
- TENOVER, F. C. Mechanisms of Antimicrobial Resistance in Bacteria. **The American Journal of Medicine**, v. 119, n. 6, p. 3-10, 2006.
- TONG S. Y. et al. *Staphylococcus aureus* infections: epidemiology, pathophysiology, clinical manifestations, and management. **Clinical Microbiology Reviews** . v. 28, n. 3, p. 603-661, 2015.
- TOOKE, C. L. et al. β -Lactamases and β -Lactamase Inhibitors in the 21st Century. **Journal of Molecular Biology**, vol. 431, n. 18, p. 3472-3500, 2019.
- TURNER, N. A. et al. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: an overview of basic and clinical research. **Nature Reviews Microbiology**. v. 17, n. 4, p. 203-218, 2019.
- URUSHIBARA, N. et al. Novel staphylococcal cassette chromosome *mec* (SCC*mec*) type XIV (5A) and a truncated SCC*mec* element in SCC composite islands carrying *speG* in ST5 MRSA in Japan. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**. v. 75, n. 1, p. 46-50, 2020.
- WACHINO, J. et al. Aminoglycoside Resistance: Updates with a Focus on Acquired 16S Ribosomal RNA Methyltransferases. **Infectious Disease Clinics of North America**, v. 34, n. 4, p. 887-902, 2020.
- WAN-TING, L. et al. Emerging resistance mechanisms for 4 types of common anti-MRSA antibiotics in *Staphylococcus aureus*: A comprehensive review. **Microbial Pathogenesis**, v. 156, 2021.
- YAHAV, D. et al. New β -Lactam- β -Lactamase Inhibitor Combinations. **Clinical microbiology reviews**, v. 34, n. 1, 2020.
- ZHAO, H., et al. Molecular Typing and Variations in Amount of *tst* Gene Expression of TSST-1-Producing Clinical *Staphylococcus aureus* Isolates. **Frontiers in Microbiology**, v. 10, 1388, 2019.

APÊNDICE A – Valores de diâmetro de halo de Inibição de cada amostra para cada antimicrobiano testado em duplicata

Amostras	Antimicrobianos utilizados e diâmetro de halo de inibição em milímetros (mm) e em duplicata													
	FOX		CIP		CMN		ERY		GMN		RIF		SXT	
16001	0	0	0	0	0	0	0	0	24	24	37	36	37	36
16002	0	0	0	0	0	0	0	0	24	22	30	30	32	32
16003	2	2	31	30	27	27	26	27	23	23	34	34	30	31
16004	10	11	11	12	25	27	11	10	19	21	17	17	26	28
16005	0	0	18	18	0	0	0	0	0	0	30	30	27	28
16006	0	0	0	0	0	0	0	0	23	21	30	28	33	32
16007	0	0	0	0	0	0	0	0	18	18	28	29	31	31
16008	0	0	25	25	25	25	25	24	20	20	14	13	31	30
16009	0	0	0	0	0	0	0	0	20	21	32	30	30	31
16010	11	11	15	16	23	23	0	0	21	22	25	25	30	31
16011	0	0	0	0	0	0	0	0	23	24	36	37	42	40
16012	12	11	21	21	25	25	16	17	22	22	33	35	31	29
16013	0	0	0	0	0	0	0	0	20	20	31	32	32	31
16014	17	17	23	24	30	28	17	17	23	23	36	36	31	30
17001	17	17	25	26	22	24	0	0	24	22	21	21	27	28
17002	18	16	17	16	21	20	10	10	25	25	31	31	31	30
17003	13	13	19	18	25	24	8	8	25	24	30	28	30	30
17004	11	11	23	23	25	25	15	15	22	22	30	30	31	31
17005	12	12	23	25	21	22	0	0	20	20	25	26	28	28
17006	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	29	30	32	31
17007	0	0	0	0	0	0	0	0	21	21	34	34	32	30
17008	10	10	12	13	23	23	10	9	20	21	16	15	28	29
17009	13	13	10	11	25	25	23	23	0	0	30	31	20	20
17010	11	12	18	20	21	21	11	11	0	0	26	25	25	26
17011	0	0	0	0	0	0	0	0	20	20	29	29	28	30
17012	9	8	16	16	22	21	0	0	18	18	25	26	26	28
17013	0	0	0	0	0	0	0	0	20	20	22	20	0	0
17014	0	0	0	0	0	0	0	0	19	19	27	27	29	26
17015	0	0	0	0	0	0	0	0	17	18	25	25	0	0
17016	0	0	26	27	20	20	20	21	17	18	26	24	28	28
17017	13	13	28	27	21	22	22	21	18	18	25	26	28	29
17018	0	0	0	0	0	0	0	0	17	17	25	26	26	25
17019	0	0	0	0	0	0	0	0	19	19	28	26	30	30
17020	12	11	23	21	22	22	11	11	20	18	29	30	26	26
17021	0	0	0	0	0	0	0	0	19	20	26	26	0	0
17022	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	20	19	0	0
17023	10	11	28	27	23	22	21	22	21	20	26	28	25	26
17024	0	0	0	0	0	0	0	0	20	19	31	31	31	31
17025	10	10	25	26	25	25	20	21	20	20	26	27	29	28
17026	0	0	0	0	0	0	0	0	20	20	25	25	0	0
17027	12	12	21	23	24	25	9	9	21	21	29	30	29	29
17028	0	0	0	0	0	0	0	0	20	20	28	30	31	31

17029	13	14	25	26	25	26	10	9	23	23	12	10	30	28
17030	11	11	30	30	23	22	0	0	20	20	30	31	27	26
17031	0	0	0	0	0	0	0	0	20	21	28	30	31	31
17032	0	0	0	0	0	0	0	0	21	21	31	31	32	31
17033	0	0	0	0	0	0	0	0	20	21	30	30	25	25
17034	0	0	0	0	0	0	0	0	20	20	30	32	30	31
17035	12	15	23	23	26	25	2	2	22	22	16	16	29	28
17036	10	10	25	25	24	25	24	24	21	21	31	30	29	30
17037	0	0	15	15	25	25	10	10	22	22	27	27	27	27
17038	0	0	15	15	24	25	9	9	21	22	28	27	28	28
17039	0	0	0	0	0	0	0	0	23	24	30	31	28	28
17040	10	10	25	27	24	25	24	24	21	20	26	25	27	28
17041	14	13	20	18	29	27	10	9	21	22	30	28	30	28

Legenda: FOX: Cefoxitina CIP: Ciprofloxacino; CMN: Clindamicina; ERY: Eritromicina; GMN: Gentamicina; RIF: Rifampicina; SXT: Sulfametoxazol-Trimetoprim

Fonte: O autor, 2021.

APÊNDICE B – Valores de desvio padrão (DP) de cada amostra para cada antimicrobiano testado

Amostras	Antimicrobianos utilizados e seus valores de desvio padrão (\pm DP) das duplicatas						
	FOX	CIP	CMN	ERY	GMN	RIF	SXT
16001	0	0	0	0	0	0,71	0,71
16002	0	0	0	0	1,41	0	0
16003	0	0,71	0	0,71	0	0	0,71
16004	0,71	0,71	1,41	0,71	1,41	0	1,41
16005	0	0	0	0	0	0	0,71
16006	0	0	0	0	1,41	1,41	0,71
16007	0	0	0	0	0	0,71	0
16008	0	0	0	0,71	0	0,71	0,71
16009	0	0	0	0	0,71	1,41	0,71
16010	0	0,71	0	0	0,71	0	0,71
16011	0	0	0	0	0,71	0,71	1,41
16012	0,71	0	0	0,71	0	1,41	1,41
16013	0	0	0	0	0	0,71	0,71
16014	0	0,71	1,41	0	0	0	0,71
17001	0	0,71	1,41	0	1,41	0	0,71
17002	1,41	0,71	0,71	0	0	0	0,71
17003	0	0,71	0,71	0	0,71	1,41	0
17004	0	0	0	0	0	0	0
17005	0	1,41	0,71	0	0	0,71	0
17006	0	0	0	0	0	0,71	0,71
17007	0	0	0	0	0	0	1,41
17008	0	0,71	0	0,71	0,71	0,71	0,71
17009	0	0,71	0	0	0	0,71	0
17010	0,71	1,41	0	0	0	0,71	0,71
17011	0	0	0	0	0	0	1,41
17012	0,71	0	0,71	0	0	0,71	1,41
17013	0	0	0	0	0	1,41	0
17014	0	0	0	0	0	0	2,12
17015	0	0	0	0	0,71	0	0
17016	0	0,71	0	0,71	0,71	1,41	0
17017	0	0,71	0,71	0,71	0	0,71	0,71
17018	0	0	0	0	0	0,71	0,71
17019	0	0	0	0	0	1,41	0
17020	0,71	1,41	0	0	1,41	0,71	0
17021	0	0	0	0	0,71	0	0
17022	0	0	0	0	0	0,71	0
17023	0,71	0,71	0,71	0,71	0,71	1,41	0,71
17024	0	0	0	0	0,71	0	0
17025	0	0,71	0	0,71	0	0,71	0,71
17026	0	0	0	0	0	0	0
17027	0	1,41	0,71	0	0	0,71	0
17028	0	0	0	0	0	1,41	0

17029	0,71	0,71	0,71	0,71	0	1,41	1,41
17030	0	0	0,71	0	0	0,71	0,71
17031	0	0	0	0	0,71	1,41	0
17032	0	0	0	0	0	0	0,71
17033	0	0	0	0	0, 0,71	0	0
17034	0	0	0	0	0	1,41	0,71
17035	2,12	0	0,71	0	0	0	0,71
17036	0	0	0,71	0	0	0,71	0,71
17037	0	0	0	0	0	0	0
17038	0	0	0,71	0	0,71	0,71	0
17039	0	0	0	0	0,71	0,71	0
17040	0	1,41	0,71	0	0,71	0,71	0,71
17041	0,71	1,41	1,41	0,71	0,71	1,41	1,41

Legenda: FOX: Cefoxitina CIP: Ciprofloxacino; CMN: Clindamicina; ERY: Eritromicina; GMN: Gentamicina;
RIF: Rifampicina; SXT: Sulfametoxazol-Trimetoprim

Fonte: O autor, 2021.