

CAROLINA DE OLIVEIRA WHITAKER

Caracterização da resistência antimicrobiana em células planctônicas e do biofilme de *Staphylococcus aureus* da linhagem USA100/ST5 isoladas entre 2004 e 2015 em hospitais do Rio de Janeiro



Monografia apresentada ao Instituto de Microbiologia Paulo de Góes, da Universidade Federal do Rio de Janeiro, como pré-requisito para a obtenção do grau de Bacharel em Ciências Biológicas: Microbiologia e Imunologia.

**INSTITUTO DE MICROBIOLOGIA PAULO DE GÓES
UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO
RIO DE JANEIRO
DEZEMBRO / 2018**

Trabalho realizado no Departamento de Microbiologia Médica, do Instituto de Microbiologia Paulo de Góes, UFRJ, sob a orientação da Professora Dr^a Kátia Regina Netto dos Santos e coorientação da Doutoranda Lorryne Cardoso Guimarães

CIP - Catalogação na Publicação

W571c Whitaker, Carolina de Oliveira
Caracterização da resistência antimicrobiana em células planctônicas e do biofilme de *Staphylococcus aureus* da linhagem USA100/ST5 isoladas entre 2004 e 2015 em hospitais do Rio de Janeiro / Carolina de Oliveira Whitaker. -- Rio de Janeiro, 2018.
73 f.

Orientador: Kátia Regina Netto dos Santos.
Coorientador: Lorryne Cardoso Guimarães.
Trabalho de conclusão de curso (graduação) - Universidade Federal do Rio de Janeiro, Instituto de Microbiologia, Bacharel em Ciências Biológicas: Microbiologia e Imunologia, 2018.

1. USA100. 2. Resistência antimicrobiana. 3. Biofilme. 4. Daptomicina. 5. Vancomicina. I. dos Santos, Kátia Regina Netto, orient. II. Guimarães, Lorryne Cardoso, coorient. III. Título.

INSTITUTO DE MICROBIOLOGIA PAULO DE GÓES / UFRJ
COORDENAÇÃO DE ENSINO DE GRADUAÇÃO

**ATA DA APRESENTAÇÃO DE MONOGRAFIA PARA APROVAÇÃO
 NO RCS DE TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO,
 BACHARELADO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS: MICROBIOLOGIA E
 IMUNOLOGIA**

ALUNO: Carolina de Oliveira Whitaker

DRE: 115054968

BANCA EXAMINADORA: Prof. Sérgio Eduardo Longo Fracalanza (Presidente)
 Profa. Fernanda Sampaio Cavalcante
 MSc. Tamara Lopes Rocha de Oliveira
 Prof. Rafael Silva Duarte (Suplente)

**Título da Monografia: "Caracterização da resistência antimicrobiana em células
 planctônicas e do biofilme de *Staphylococcus aureus* da linhagem USA100/ST5
 isoladas entre 2004 e 2015 em hospitais do Rio de Janeiro"**

**Local: Sala de seminários do Departamento de Microbiologia Médica / Instituto de
 Microbiologia Paulo de Góes / CCS / UFRJ**

Data e hora de início: 6 de dezembro de 2018 às 10:00h

Em sessão pública, após exposição de cerca de 50 minutos, o aluno foi argüido pelos membros da Banca Examinadora, demonstrando suficiência de conhecimentos e capacidade de sistematização no tema de sua Monografia, tendo, então, obtido nota 10,0 neste requisito do RCS de **TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO**. Na forma regulamentar, foi lavrada a presente ata que é assinada pelos membros da banca examinadora, aluno, orientador (e/ou co-orientador) e pelo coordenador do RCS.

Rio de Janeiro, de de 2018.

NOTA

10,0

9,5

10

Banca Examinadora:

Sérgio Eduardo Longo Fracalanza
 Prof. Sérgio Eduardo Longo Fracalanza

Fernanda Sampaio Cavalcante
 Profa. Fernanda Sampaio Cavalcante

Tamara Lopes Rocha de Oliveira
 MSc. Tamara Lopes Rocha de Oliveira

Rafael Silva Duarte
 Prof. Rafael Silva Duarte

Aluno:

Carolina de Oliveira Whitaker
 Carolina de Oliveira Whitaker

Orientador:

Kátia Regina Netto dos Santos
 Profa. Kátia Regina Netto dos Santos

Coorientador:

Lorrayne Cardoso Guimarães
 MSc. Lorrayne Cardoso Guimarães

Coordenador
 de TCC

Bernadete Teixeira Ferreira Carvalho
 Profa. Bernadete Teixeira Ferreira Carvalho

Para minha mãe, meu maior exemplo.
Obrigada por me ensinar a perseguir meu próprio futuro.

AGRADECIMENTOS

Sou muita grata pela realização deste trabalho, por todo o conhecimento que ele me permitiu adquirir.

Gostaria de agradecer à professora Kátia, por me aceitar como aluna em seu laboratório e por ter me dado a oportunidade de desenvolver esse trabalho. Aprendi muitas coisas durante esses três anos de estágio no LIH.

Lorrayne, você foi uma coorientadora maravilhosa e uma amiga muito querida. Obrigada (e desculpa) por todas as vezes que ficou até tarde comigo no laboratório. Você me acolheu como aluna mesmo me conhecendo tão pouco e me ensinou tanta coisa mesmo que não precisasse fazer isso na época. Cada “presente” me fez aprender muito!

Obrigada às amigas de laboratório que acabaram virando amigas para a vida: Ariane, Priscylla, Verônica e Tamara. Vocês são cientistas e mulheres incríveis! E Tatá, você é uma fonte de inspiração, e tenho certeza que não só pra mim. Eu tenho certeza que muitas coisas boas ainda esperam por você! Também agradeço muito à Andreia, por ter me ensinado e me ajudado tantas coisas durante (e até mesmo depois) o seu mestrado aqui no laboratório.

Agradeço também aos amigos que fiz durante esses anos de faculdade, Bruno, Gabi, Marcela e Thiago. Obrigada pelos momentos, tristes e felizes, que compartilhamos juntos. Vocês são incríveis, e nunca deixem que alguém diga o contrário. É um agradecimento especial para minha amiga Bruna, minha parceira de todos os momentos (fogo é com a gente mesmo). Muito obrigada, amiga, por ter estado comigo todo esse tempo, mesmo nosso azar se somando.

Obrigada à minha mãe, minha maior inspiração em toda a vida. Você sempre me incentivou a fazer as coisas por mim mesma, e se não fosse por você eu não teria conseguido chegar até aqui. Você sempre fez o possível e o impossível pela minha educação, por isso todas as minhas conquistas eu devo a você.

Também agradeço ao meu namorado, Flávio, por toda a paciência que teve comigo no decorrer desses anos. Por ter me buscado de noite e me abrigado em sua casa todas as vezes que fiquei até tarde na faculdade. Desculpa se enchi seu computador de artigos e planilhas durante estes últimos meses, e obrigada por sempre me trazer um lanche quando fico até tarde estudando e escrevendo.

Agradeço ao Instituto de Microbiologia Paulo de Góes e a toda equipe do LIH por me permitirem a realização desse trabalho.

Agradeço aos colegas do departamento de Microbiologia Médica, em especial aos grupos dos professores Rafael Duarte, Marinella Laport e Marcia Giambiagi.

Obrigada aos professores Sérgio Fracalanza, Fernanda Cavalcante e Rafael Duarte e à Tamara por terem aceitado participar da banca avaliadora deste projeto.

Agradeço aos órgãos que concederam apoio financeiro e logístico para o desenvolvimento deste trabalho: CNPq, CAPES e FAPERJ.

“Na vida, não existe nada a temer, mas a entender”

(Marie Curie)

RESUMO

CAROLINA DE OLIVEIRA WHITAKER

Caracterização da resistência antimicrobiana em células planctônicas e do biofilme de *Staphylococcus aureus* da linhagem USA100/ST5 isoladas entre 2004 e 2015 em hospitais do Rio de Janeiro

Orientadora: Kátia Regina Netto dos Santos

Resumo da Monografia apresentada no Instituto de Microbiologia Paulo de Góes da Universidade Federal do Rio de Janeiro, como parte dos requisitos necessários para obtenção do título de Bacharel em Ciências Biológicas: Microbiologia e Imunologia e aprovação no RCS Trabalho de Conclusão de Curso.

Staphylococcus aureus é um patógeno de importância clínica e sua permanência em ambientes hospitalares está associada, entre outros fatores, à capacidade de adquirir resistência antimicrobiana e de formar biofilme. A linhagem CEB/ST239, prevalente em hospitais brasileiros, tem sido substituída, nos últimos anos, por outras linhagens, como USA100/ST5, também associada com multirresistência. O objetivo do estudo foi caracterizar a ação de antimicrobianos em células planctônicas e do biofilme previamente formado por amostras MRSA da linhagem USA100/ST5 isoladas de pacientes de hospitais do Rio de Janeiro entre 2004 e 2015. Um total de 63 amostras USA100/ST5 foram avaliadas, das quais 36 obtidas no período entre 2004 e 2009, e 27 no período de 2011 a 2015. A susceptibilidade a nove antimicrobianos de diferentes classes foi determinada para todas as amostras pelo método de disco-difusão, enquanto as concentrações mínimas inibitórias (CMI) para daptomicina, linezolida, oxacilina e vancomicina foram avaliadas pela técnica de microdiluição em caldo. Uma amostra previamente classificada como produtora de biofilme forte foi selecionada para avaliação do efeito de sub-CMIs e CMIs de daptomicina, linezolida e vancomicina sobre o biofilme formado, e para determinação da concentração mínima de eliminação do biofilme (CMEB) para linezolida e vancomicina. Todas as amostras foram multirresistentes, apresentando resistência à ciprofloxacina, clindamicina, eritromicina e penicilina. O percentual de resistência à cloranfenicol, gentamicina e rifampicina se manteve baixo em ambos os períodos, sem diferença significativa entre eles. Não foi detectada resistência ao sulfametoxazol-trimetoprim e à tetraciclina. Apesar de todas as amostras serem MRSA, a CMI₅₀ para oxacilina aumentou entre os períodos avaliados, de 128 µg/mL para >256 µg/mL. Para vancomicina, as CMI₅₀ e CMI₉₀ aumentaram de 0,5 µg/mL e 1 µg/mL para 2 µg/mL e 2 µg/mL, respectivamente. Além disso, todas as amostras isoladas entre 2004 e 2009 foram sensíveis à vancomicina, mas 11% das amostras isoladas entre 2011 e 2015 apresentaram resistência intermediária (VISA). Para daptomicina, além do aumento na CMI₉₀ de 1 µg/mL para 2 µg/mL, também foi observado um aumento significativo ($p = 0,0083$) na não susceptibilidade, de 11% para 41%, entre os períodos. Houve aumento na CMI₉₀ de 1 µg/mL para 2 µg/mL para linezolida, porém sem detecção de resistência. As sub-CMIs de daptomicina, linezolida e vancomicina não influenciaram no biofilme formado pela amostra clínica 1301a. Apenas a concentração de 2 X CMI de linezolida (2 µg/mL) foi capaz de reduzir significativamente o biofilme formado por essa amostra, e as CMEBs de linezolida e

vancomicina foram $>128 \mu\text{g/mL}$. Podemos concluir que a multirresistência de amostras USA100/ST5, sua crescente resistência a antimicrobianos de importância clínica, assim como sua habilidade de produzir biofilmes fortes e resistentes à ação de fármacos podem ter contribuído para seu estabelecimento na clínica.

Palavras-chave: USA100/ST5, resistência antimicrobiana, biofilme, daptomicina, linezolida, vancomicina

ABSTRACT

Carolina de Oliveira Whitaker

Caracterização da resistência antimicrobiana em células planctônicas e do biofilme de *Staphylococcus aureus* da linhagem USA100/ST5 isoladas entre 2004 e 2015 em hospitais do Rio de Janeiro

Orientador: Kátia Regina Netto dos Santos

Abstract da Monografia apresentada no Instituto de Microbiologia Paulo de Góes da Universidade Federal do Rio de Janeiro, como parte dos requisitos necessários para obtenção do título de Bacharel em Ciências Biológicas: Microbiologia e Imunologia e aprovação no RCS Trabalho de Conclusão de Curso.

Staphylococcus aureus is a pathogen of clinical importance and its permanence in healthcare facilities is associated, among other factors, with its ability in acquiring antimicrobial resistance and forming biofilm. BEC/ST239, a prevalent lineage in Brazilian hospitals, has been replaced, in the last years, by other lineages, like USA100/ST5, also associated with multiresistance. The objective of this study was to characterize the activity of antimicrobials over planktonic cells and formed biofilm of MRSA isolates of the USA100/ST5 lineage obtained from patients in Rio de Janeiro hospitals between 2004 and 2015. Susceptibility to nine antimicrobials from different classes was determined to all isolates using disk-diffusion method, while the minimal inhibitory concentrations (MICs) to daptomycin, linezolid, oxacillin and vancomycin were evaluated by broth microdilution method. One isolate previously classified as strong biofilm producer was selected to evaluate the effect of sub-MICs and MICs of daptomycin, linezolid and vancomycin over the formed biofilm, and for determination of the minimal biofilm eradication concentration (MBEC) for linezolid and vancomycin. All isolates were multiresistant, showing resistance to ciprofloxacin, clindamycin, erythromycin and penicillin. The percentage of resistance to chloramphenicol, gentamicin and rifampicin remained low in both periods, with no statistical difference between then. It was not detected resistance to sulfamethoxazole-trimethoprim or tetracycline. Although all isolates were MRSA, MIC₅₀ to oxacillin increased from 128 µg/mL to >256 µg/mL between the periods evaluated. For vancomycin, MIC₅₀ e MIC₉₀ increased from 0.5 µg/mL and 1 µg/mL to 2 µg/mL and 2 µg/mL, respectively. Furthermore, all isolates obtained between 2004 and 2009 were sensitive to vancomycin, but 11% of the isolates obtained between 2011 and 2015 showed intermediate resistance to vancomycin (VISA). For daptomycin, besides the increase in MIC₉₀ from 1 µg/mL to 2 µg/mL, it was also observed a significant increase ($p = 0.0083$) in the non-susceptibility from 11% to 41% between the periods. There was an increase in MIC₉₀ for linezolid from 1 µg/mL to 2 µg/mL, but without detection of resistance. The sub-MICs of daptomycin, linezolid and vancomycin did not influence in the biofilm formed by the clinical isolate 1301a. Only the concentration of 2 X MIC of linezolid (2 µg/mL) was able to significantly reduce the biofilm formed by this isolate, and the MBEC for linezolid and vancomycin were >128 µg/mL. We may conclude that the multiresistance of USA100/ST5 isolates, their increasing resistance to antimicrobials of clinical importance, as well as their ability to produce strong and drug resistant biofilms may have contributed to their establishment in the clinical settings.

Keywords: USA100/ST5, antimicrobial resistance, biofilm, daptomycin, linezolid, vancomycin

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Fluxograma da metodologia a ser utilizada no estudo	17
Figura 2: Descrição da disposição das amostras, branco e concentrações de antimicrobiano utilizadas no ensaio de verificação da ação de antimicrobianos no biofilme formado por <i>Staphylococcus aureus</i> USA100/ST5	24
Figura 3: Descrição da disposição das amostras e concentrações de antimicrobiano no ensaio de determinação da concentração mínima de erradicação do biofilme formado por <i>Staphylococcus aureus</i> USA100/ST5	26
Figura 4: Distribuição de 63 amostras de <i>Staphylococcus aureus</i> USA100/ST5 por período de isolamento de acordo com os valores de concentração mínima inibitória para oxacilina (a), vancomicina (b), daptomicina (c) e linezolida (d) determinados pela técnica de microdiluição em caldo	29
Figura 5: Avaliação do efeito de concentrações subinibitórias e inibitórias de vancomicina sobre o biofilme formado por uma amostra clínica de <i>Staphylococcus aureus</i> USA100/ST5 (1301a) e por uma amostra controle (ATCC 33591)	35
Figura 6: Avaliação do efeito de concentrações subinibitórias e inibitórias de daptomicina sobre o biofilme formado por uma amostra clínica de <i>Staphylococcus aureus</i> USA100/ST5 (1301a) e por uma amostra controle (ATCC 33591)	35
Figura 7: Avaliação do efeito de concentrações subinibitórias e inibitórias de linezolida sobre o biofilme formado por uma amostra clínica de <i>Staphylococcus aureus</i> USA100/ST5 (1301a) e por uma amostra controle (ATCC 33591)	36
Figura 8: Avaliação do efeito de concentrações crescentes de linezolida sobre o biofilme formado por uma amostra clínica de <i>Staphylococcus aureus</i> USA100/ST5 (1301a) e por uma amostra controle (ATCC 33591)	37
Figura 9: Avaliação do efeito de concentrações crescentes de vancomicina sobre o biofilme formado por uma amostra clínica de <i>Staphylococcus aureus</i> USA100/ST5 (1301a) e por uma amostra controle (ATCC 33591)	38

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Descrição do significado das faixas de <i>score</i> geradas pela técnica de ionização e dessorção a laser assistida por matriz - tempo de voo - espectrometria de massas (MALDI-TOF-MS)	19
Tabela 2: Descrição dos pontos de corte para interpretação do halo de inibição de crescimento de <i>Staphylococcus aureus</i> para nove antimicrobianos utilizando a técnica de disco-difusão, segundo o <i>Clinical & Laboratory Standards Institute</i> (2018)	20
Tabela 3: Descrição dos pontos de corte para interpretação da concentração mínima inibitória pela técnica de microdiluição em caldo para daptomicina, linezolida, oxacilina e vancomicina para <i>Staphylococcus aureus</i> , segundo o <i>Clinical & Laboratory Standards Institute</i> (2018)	22
Tabela 4: Descrição dos cálculos utilizados para determinação da $DO_{\text{média amostra}}$, $DO_{\text{média branco}}$ e DO_f	25
Tabela 5: Distribuição das 63 amostras de <i>Staphylococcus aureus</i> USA100/ST5 utilizadas no estudo de acordo com o período e sítio de isolamento	27
Tabela 6: Distribuição dos percentuais de resistência a nove antimicrobianos por disco-difusão apresentados por 63 amostras de <i>Staphylococcus aureus</i> USA100/ST5 de acordo com o período de isolamento	28
Tabela 7: Distribuição de 36 amostras de <i>Staphylococcus aureus</i> USA100/ST5 isoladas no período de 2004 a 2009 de acordo com os valores de concentração mínima inibitória para daptomicina, linezolida, oxacilina e vancomicina determinados pela técnica de microdiluição em caldo	31
Tabela 8: Distribuição de 27 amostras de <i>Staphylococcus aureus</i> USA100/ST5 isoladas no período de 2011 a 2015 de acordo com os valores de concentração mínima inibitória para daptomicina, linezolida, oxacilina e vancomicina determinados pela técnica de microdiluição em caldo	32
Tabela 9: Faixa de distribuição de concentração mínima inibitória, valores de CMI_{50} e CMI_{90} e percentual de resistência ou não susceptibilidade apresentados por 63 amostras de <i>Staphylococcus aureus</i> USA100/ST5 de acordo com o período de isolamento	33
Tabela 10: Concentrações subinibitórias e inibitórias utilizadas para determinação da ação da daptomicina, linezolida e vancomicina no biofilme formado pelas amostras USA100/ST5 1301a e ATCC 33591	34
Tabela 11: Concentrações utilizadas para determinação das concentrações mínimas de linezolida e vancomicina necessárias para erradicação do biofilme formado pelas amostras USA100/ST5 1301a e ATCC 33591.....	37
Tabela 12: Descrição das características gerais e resultados encontrados para as 63 amostras de <i>Staphylococcus aureus</i> incluídas no estudo	55

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ABC:	<i>ATP-binding cassette</i>
ANVISA:	Agência de Vigilância Sanitária
ARE ABC-F:	ABC linhagem F associada à resistência a antimicrobianos
atb:	Antimicrobiano
ATCC:	Coleção americana de cultura (<i>American Type Culture Collection</i>)
CaCl ₂ :	Cloreto de cálcio
caMHB:	Caldo Mueller Hinton cátion ajustado (<i>cation-adjusted Mueller Hinton broth</i>)
CA-MRSA:	MRSA associado à comunidade (<i>community-associated MRSA</i>)
CC:	Complexo clonal
<i>ccr</i> :	Complexo cassete cromossômico recombinase (<i>cassette chromosome recombinase</i>)
CEB:	Clone Endêmico Brasileiro (<i>Brazilian Endemic Clone</i>)
CLSI:	Instituto de normativas para laboratório clínico dos Estados Unidos da America (<i>Clinical Laboratory Standard Institute</i>)
CMEB:	Concentração mínima de erradicação do biofilme
CMI:	Concentração mínima inibitória
CMI ₅₀ :	Concentração mínima na qual 50% das amostras são inibidas
CMI ₉₀ :	Concentração mínima na qual 90% das amostras são inibidas
D-ala-D-ala:	D-alanil-D-alanina
D-ala-D-lac:	D-alanil-D-lactato
DNA:	Ácido Desoxirribonucleico (<i>deoxyribonucleic acid</i>)
DO:	Densidade óptica
DOF:	Densidade óptica final
h:	Horas
HA-MRSA:	MRSA associado à ambientes de assistência à saúde (<i>healthcare-associated MRSA</i>)
HNMD:	Hospital Naval Marcílio Dias
HUCFF:	Hospital Universitário Clementino Fraga Filho
hVISA:	<i>Staphylococcus aureus</i> com heterorresistência à vancomicina (<i>heterogeneous vancomycin-intermediate S. aureus</i>)
ICS:	Infecção da corrente sanguínea
IMPPG:	Instituto de Microbiologia Professor Paulo de Góes
IRAS:	Infecções Relacionadas à Assistência à Saúde
LA-MRSA:	MRSA associado à pecuária (<i>livestock-associated MRSA</i>)
LIH:	Laboratório de Infecção Hospitalar
LPSN:	Lista de nomes de procariotos e nomenclatura permanente (<i>List of Prokaryotic names with Standing in Nomenclature</i>)
LRSA:	<i>Staphylococcus aureus</i> resistente à linezolida (<i>Linezolid Resistant S. aureus</i>)
MDC:	Microdiluição em caldo
µg/mL:	Micrograma por mililitro
µL:	Microlitro
Min:	Minutos
MLST:	Tipagem por sequenciamento multilocus (<i>Multilocus sequence typing</i>)
mm:	Milímetro
MRSA:	<i>Staphylococcus aureus</i> resistente à meticilina (<i>Methicillin resistant S. aureus</i>)
n:	Número
NA:	Não se aplica
NaCl:	Cloreto de sódio
ND:	Não definido
nm:	Nanômetro
NS:	Não susceptível
p/v:	Peso por volume

PBP:	Proteína de ligação à penicilina (<i>Penicillin binding protein</i>)
PBS:	Tampão fosfato salino (<i>phosphate buffered saline</i>)
PFGE:	Eletroforese em gel de campo pulsado (<i>Pulsed Field gel electrophoresis</i>)
pH:	Potencial hidrogeniônico
PSM:	Modulinas solúveis em fenol (<i>phenol-soluble modulins</i>)
PVL:	Leucocidina de Panton-Valentine (<i>Panton-Valentine leukocidin</i>)
R:	Resistente
RI:	Resistente intermediário
rRNA:	RNA ribossômico
SCC _{mec} :	Cassete cromossômico estafilocócico <i>mec</i> (<i>Staphylococcal Cassette Chromosome mec</i>)
SNP:	Mutação pontual (<i>single nucleotide polymorphisms</i>)
ST:	Sequência tipo (<i>sequence type</i>)
sub-CMI:	Concentração subinibitória
TSA:	Agar de soja e tripticaseína (<i>Trypticase Soy Agar</i>)
TSB:	Caldo de soja e tripticaseína (<i>Trypticase Soy Broth</i>)
U:	Unidade internacional
UFRJ:	Universidade Federal do Rio de Janeiro
UTI:	Unidade de tratamento intensivo
UFC/mL:	Unidade formadora de colônia por mililitro
v/v:	Volume por volume
VRE:	<i>Enterococcus</i> resistente à vancomicina (<i>Vancomycin Resistant Enterococcus</i>)
VISA:	<i>Staphylococcus aureus</i> com resistência intermediária à vancomicina (<i>Vancomycin Intermediate S. aureus</i>)
VRSA:	<i>Staphylococcus aureus</i> resistente à vancomicina (<i>Vancomycin Resistant S. aureus</i>)
°C:	Grau Celcius

ÍNDICE

RESUMO	ix
ABSTRACT	xi
LISTA DE FIGURAS	xii
LISTA DE TABELAS	xiii
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS	xiv
ÍNDICE	xvi
1. INTRODUÇÃO	1
1.1. <i>Staphylococcus aureus</i>	1
1.2. Resistência aos antimicrobianos	2
1.2.1. Meticilina/Oxacilina	2
1.2.2. Vancomicina	5
1.2.3. Linezolida	6
1.2.4. Daptomicina	8
1.3. Biofilme x Antimicrobianos.....	9
1.4. Epidemiologia da linhagem USA100/ST5 em hospitais brasileiros.....	11
2. JUSTIFICATIVA	14
3. OBJETIVOS	15
3.1. Estratégias.....	15
4. METODOLOGIA.....	16
4.1. Características do estudo	16
4.2. Confirmação da espécie <i>Staphylococcus aureus</i> por MALDI-TOF-MS	18
4.3. Determinação do perfil de susceptibilidade a antimicrobianos	19
4.3.1. Determinação do perfil de susceptibilidade a nove antimicrobianos por disco-difusão	19
4.3.2. Determinação do perfil de susceptibilidade a quatro antimicrobianos por microdiluição em caldo	20
4.4. Determinação da ação de antimicrobianos sobre o biofilme formado	22
4.4.1. Formação do biofilme bacteriano.....	22
4.4.2. Exposição do biofilme formado a diferentes concentrações de antimicrobianos .	23
4.4.3. Coloração do biofilme	24
4.4.4. Interpretação dos valores de DO obtidos	25

4.5. Determinação da concentração mínima de erradicação do biofilme	25
4.6. Análise comparativa dos dados	26
5. RESULTADOS	27
5.1. Características das amostras	27
5.2. Determinação do perfil de susceptibilidade	28
5.3. Determinação da concentração mínima inibitória	29
5.4. Determinação da ação dos antimicrobianos sobre o biofilme formado	34
5.5. Determinação da concentração mínima de erradicação do biofilme	36
6. DISCUSSÃO	39
7. CONCLUSÕES	46
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	47
ANEXO	55

1. Introdução

1.1. *Staphylococcus aureus*

O gênero *Staphylococcus* pertence à família *Staphylococcaceae* e possui 50 espécies e 22 subespécies (Euzéby, 2018). As espécies deste gênero possuem morfologia de cocos Gram-positivos e se agrupam em forma de cacho (estafilococos), além de serem caracterizados como produtores da enzima catalase, imóveis, não esporulados, anaeróbios facultativos, tolerantes a altas concentrações de cloreto de sódio (até 10% de NaCl) e resistentes a 0,04 U de bacitracina. Embora a maioria não produza a proteína coagulase e utilize apenas glicose como fonte de carbono, a espécie *Staphylococcus aureus* é coagulase positiva e realiza a fermentação do manitol como alternativa à glicose. A temperatura ótima de crescimento para *S. aureus* está entre 30 °C e 37 °C, e, quando crescidas em ágar suplementado com sangue de carneiro, as colônias formadas são grandes, com bordas uniformes e coloração que varia de branca a amarelada (devido aos pigmentos carotenoides produzidos durante o crescimento) (Bannerman e Peacock, 2007; Lee *et al.*, 2018).

S. aureus pode ser considerado tanto um microrganismo comensal como agente etiológico de diversos quadros infecciosos. Como comensal, tem como principal nicho de colonização as narinas anteriores. Além disso, também pode constituir a microbiota intestinal e ser encontrado colonizando axilas e virilha (Gordon e Lowy, 2008; Lee *et al.*, 2018). Por outro lado, *S. aureus* também é considerado um patógeno de importância médica (Peacock e Paterson, 2015; Tong *et al.*, 2015). As infecções causadas por *S. aureus* podem estar associadas aos ambientes comunitários e aos de assistência à saúde (Otto, 2012). As Infecções Relacionadas à Assistência à Saúde (IRAS) podem ser definidas como aquelas contraídas a partir do serviço de saúde prestado ao indivíduo. Essas infecções não estão presentes no momento de admissão, e podem se manifestar durante a internação ou após a alta do paciente (Costa, Silva e Noriega, 2007). Dentre as IRAS causadas por *S. aureus*, podem ser citadas: pneumonia, infecção de sítio cirúrgico e infecção de corrente sanguínea (ICS), entre outras (Magill *et al.*, 2014; Braga *et al.*, 2018).

S. aureus dispõe de uma gama de fatores de virulência que contribuem para seu sucesso como patógeno, tais como: expressão de adesinas, produção de toxinas e capacidade de formação de biofilme (McCarthy *et al.*, 2015). Um importante fator de virulência produzido por *S. aureus* é a proteína A, uma proteína de superfície que além de ter função de adesina também reconhece a porção Fc da imunoglobulina G, impedindo o processo de

opsonização da bactéria (Navarre e Schneewind, 1999; Foster *et al.*, 2014). Além da proteína A, *S. aureus* codifica um vasto e variável repertório de toxinas que contribui para a patogenicidade e evasão do sistema imune através, principalmente, do dano à membrana celular, interferência com a funcionalidade de receptores ou degradação de moléculas (Otto, 2014b). Essas toxinas podem ser codificadas por elementos genéticos móveis, como, por exemplo, a leucocidina de Panton-Valentine (PVL, *Panton-Valentine leukocidin*), que está associada com formas específicas de infecções de pele, como furunculose (Otto, 2012). Além disso, há aquelas codificadas pelo cromossoma bacteriano, como as modulinas solúveis em fenol, PSMs (*phenol-soluble modulins*), peptídeos anfipáticos com alta capacidade citolítica, principalmente contra neutrófilos (Wang *et al.*, 2007; Otto, 2014a). Outro fator de virulência apresentado por algumas cepas de *S. aureus* é a capacidade de formar biofilme, que contribui para o estabelecimento de infecções relacionadas a dispositivos médicos, como próteses e cateteres (McCarthy *et al.*, 2015).

1.2. Resistência aos antimicrobianos

Além da apresentação de um vasto repertório de fatores de virulência, as cepas de *S. aureus* são notórias em adquirir resistência a diferentes classes de antimicrobianos. Esse evento pode ocorrer a partir da aquisição de genes de resistência por meio de transferência horizontal de genes, uma vez que estes são, geralmente, carregados por elementos genéticos móveis (van Hoek *et al.*, 2011; Hiramatsu *et al.*, 2014; Yilmaz e Aslantas, 2017). Também pode haver a aquisição de resistência ou tolerância através da maior expressão de bombas de efluxo e por meio de mutações pontuais no genoma bacteriano, causando alterações no sítio alvo da ação do antimicrobiano (van Hoek *et al.*, 2011; Yilmaz e Aslantas, 2017). Outra opção é a resistência cruzada, que faz com que o mecanismo adquirido pela bactéria para uma substância proteja-a contra outros agentes, sejam eles atuantes no mesmo sítio ou em sítios diferentes (Chen, Huang e Chiu, 2015).

1.2.1. Meticilina/Oxacilina

Os β -lactâmicos constituem uma classe de antimicrobianos que atuam na parede celular de bactérias de modo a inibir a transpeptidação, etapa que confere rigidez à estrutura. Esse mecanismo de ação se dá através da associação às proteínas ligadoras de penicilina

(PBP, *penicillin binding proteins*), enzimas responsáveis pela realização das ligações cruzadas na formação da parede celular (Hiramatsu, 2001; Miller, 2002).

O primeiro antimicrobiano da classe dos β -lactâmicos a ser utilizado na clínica foi a penicilina, na década de 1940. Entretanto, foram descritos os primeiros casos de resistência devido à aquisição de um plasmídeo contendo o gene *blaZ* poucos anos após sua implementação. Esse gene codifica a penicilinase, uma enzima que hidrolisa o anel β -lactâmico presente na estrutura da penicilina e desativa o antimicrobiano (Peacock e Paterson, 2015; Aguayo-Reyes *et al.*, 2018). Assim, foram realizadas modificações na estrutura da penicilina para síntese de antimicrobianos com maior espectro antibacteriano e resistentes à ação da penicilinase, também conhecida como β -lactamase (Wright, 1999). A primeira penicilina semissintética desenvolvida foi a meticilina, cujas alterações no anel β -lactâmico favoreceram a resistência à ação das penicilinas. A meticilina passou a ser utilizada na clínica em 1959, como alternativa para o tratamento de infecções causadas por cepas resistentes à penicilina. Porém, cepas de *S. aureus* resistentes à meticilina (MRSA, *methicillin-resistant S. aureus*) começaram a ser isoladas em 1961 (Jevons, 1961; Otto, 2012; Peacock e Paterson, 2015). A resistência ocorre devido à aquisição, principalmente, do gene *mecA*, que codifica uma PBP2 alterada, denominada PBP2a ou PBP2', que apresenta baixa afinidade pelos β -lactâmicos (Chambers e DeLeo, 2009; Aguayo-Reyes *et al.*, 2018). Embora a meticilina não seja mais utilizada clinicamente devido à sua instabilidade, sendo substituída, principalmente, pela oxacilina, o termo MRSA foi mantido. Isso se deve ao fato de o mecanismo de resistência à meticilina conferir resistência a todos os antimicrobianos membros da classe de β -lactâmicos, com exceção às cefalosporinas com atividade contra MRSA (Peacock e Paterson, 2015; CLSI, 2018).

O gene *mecA* é carregado por um elemento genético móvel denominado de cassete cromossômico estafilocócico *mec*, *SCCmec* (*staphylococcal chromosome cassette mec*) (Katayama, Ito e Hiramatsu, 2000). O *SCCmec* é composto pelo complexo gênico *mec*, que contém o gene *mecA* e seus reguladores *mecI* e *mecR*; pelo complexo gênico *ccr* (*cassette chromosome recombinase*), que contém os genes para recombinases responsáveis pela excisão e inserção do *SCCmec* ao genoma bacteriano; e as regiões J, que podem conter genes de resistência a outras classes de antimicrobianos e aos metais pesados (Liu *et al.*, 2016; Lee *et al.*, 2018). A transmissão do *SCCmec* entre diferentes cepas de *S. aureus* ocorre através de transferência horizontal de genes a partir da atuação das recombinases codificadas pelo complexo gênico *ccr*. A estrutura do *SCCmec* é bastante variada, sendo descritos até o

momento 13 alotipos (I a XIII) diferentes com base na tipagem dos complexos *mec* e *ccr* (Wu, *et al.*, 2015; Baig *et al.*, 2018; Lee *et al.*, 2018).

Inicialmente, as linhagens MRSA eram relatadas causando surtos apenas em ambientes hospitalares, sendo denominadas HA-MRSA (MRSA associado a ambientes de assistência à saúde, do inglês *healthcare-associated* MRSA). Nesses ambientes, foram identificadas amostras carreando os tipos I, II e III de SCC*mec*, os primeiros descritos na literatura, cujas estruturas podem carrear também genes de resistência a outras classes de antimicrobianos (Ito *et al.*, 2001; Liu *et al.*, 2016; Lee *et al.*, 2018). Na década de 1980, surgiram relatos de surtos causados por amostras MRSA em ambientes comunitários (CA-MRSA, MRSA associado à comunidade, do inglês *community-associated* MRSA), em indivíduos sem qualquer contato prévio com ambientes de assistência à saúde ou fatores de risco para infecções hospitalares (Ma *et al.*, 2002; Liu *et al.*, 2016; Junie *et al.*, 2018). Entretanto, posteriormente, essas cepas passaram a ser relatadas em surtos hospitalares sendo, atualmente, encontradas causando infecções em ambos os ambientes (Lee *et al.*, 2018). Genotipicamente, as cepas de CA-MRSA podem ser discriminadas das HA-MRSA por carregarem os SCC*mec* tipos IV e V, variantes com menor tamanho do cassete SCC*mec* e sem resistência múltipla aos antimicrobianos (Ito *et al.*, 2004; Liu *et al.*, 2016; Lee *et al.*, 2018). Em meados da década de 2000, também passaram a ser relatados casos de infecções por MRSA associadas à exposição a animais pecuários (LA-MRSA, *livestock-associated* MRSA) (Cuny, Wieler e Witte, 2015). O SCC*mec* tipo XI está associado a essas cepas e sua estrutura é a única, até o momento, que não apresenta o gene *mecA*, sendo a PBP2 alterada, PBP2c, codificada pelo gene *mecC*, homólogo ao *mecA* (Harrison *et al.*, 2012; Ballhausen *et al.*, 2014). Recentemente, também foi descrita resistência à meticilina em *S. aureus* através da aquisição de plasmídeo contendo o gene *mecB*, homólogo aos genes *mecA* e *mecC*, em sua estrutura (Becker *et al.*, 2018).

Após o aparecimento das primeiras cepas de MRSA, infecções por esse patógeno passaram a ser relatadas em diversas partes do mundo, com prevalência aumentando continuamente. Atualmente, a prevalência de MRSA em IRAS varia bastante entre os países, e essa diferença pode ser atribuída, em parte, a variações nas práticas de controle de infecções e à política de utilização de antimicrobianos em cada país (Kock *et al.*, 2010).

1.2.2. Vancomicina

A vancomicina é um antimicrobiano tricíclico pertencente à classe dos glicopeptídeos utilizado para tratamento de infecções graves por bactérias Gram-positivas (Gupta, Biyani e Khaira, 2011; Gardete e Tomasz, 2014; *Baxter Healthcare Corporation*, 2015). O primeiro uso clínico desse antimicrobiano data de 1958, embora o início de sua utilização em larga escala tenha começado com a emergência de amostras MRSA na década de 1980. Desde então, é considerada a primeira escolha terapêutica para tratar infecções causadas por MRSA em diversos países, inclusive no Brasil (Smith *et al.*, 1999; Hiramatsu, 2001; Gardete e Tomasz, 2014; Anvisa, 2018).

Assim como a oxacilina, a vancomicina atua na parede celular bacteriana de modo a inibir a etapa de transpeptidação. Contudo, enquanto a oxacilina age sobre as PBP_s, o mecanismo de ação da vancomicina consiste em inibir, por impedimento estereoquímico, a sequência reconhecida pelas transpeptidases. Para isso, associa-se por pontes de hidrogênio ao carbono terminal do resíduo de D-Ala-D-Ala do pentapeptídeo, formando um complexo estável. Dessa forma, a transpeptidase não consegue atuar e não há formação da malha rígida, levando a célula à morte celular por lise osmótica (Reynolds, 1989; Hiramatsu, 2001).

Com o aumento de casos de infecções por MRSA, a vancomicina foi gradualmente sendo mais utilizada na clínica, sendo atualmente a primeira escolha para tratamento de ICS por MRSA (Gardete e Tomasz, 2014). Entretanto, no fim da década de 1990, foram relatadas as primeiras cepas de *S. aureus* com resistência intermediária à vancomicina, denominadas VISA (*S. aureus* com resistência intermediária à vancomicina, *vancomycin-intermediate resistant S. aureus*) (Hiramatsu, 2001; Gardete e Tomasz, 2014). Essas cepas estão relacionadas com falha terapêutica e valores aumentados de Concentração Mínima Inibitória (CMI) (entre 4 e 8 µg/mL) para vancomicina (Liñares, 2001; CLSI, 2018). Apesar de não serem classificadas como plenamente resistentes, a utilização de vancomicina para combater amostras VISA requer um aumento na dosagem devido à maior CMI (Bruniera *et al.*, 2015; CLSI, 2018). Isso representa um risco à saúde do paciente, uma vez que a administração de maiores doses do antimicrobiano está associada com o desenvolvimento de nefropatia (Dehority, 2010; Gupta, Biyani e Khaira, 2011; Bruniera *et al.*, 2015).

Após o isolamento da primeira cepa VISA, foi relatada também a detecção de cepas com heterorresistência intermediária à vancomicina (hVISA, *heterogeneous vancomycin-intermediate resistant S. aureus*) (Hiramatsu, 2001). Essas cepas apresentam uma população heterogênea, com presença tanto de células sensíveis à vancomicina quanto uma

subpopulação (10^{-5} a 10^{-6} UFC/mL) com valores de CMI característicos de resistência intermediária (Howden *et al.*, 2010; Howden, Peleg e Stinear, 2013; Gardete e Tomasz, 2014). Estudos que avaliaram as características de resistência de *S. aureus* no decorrer da terapia antimicrobiana com vancomicina constataram que a pressão seletiva exercida leva a uma heterogeneidade da susceptibilidade ao antimicrobiano e, caso a terapia persista, a incidência de subpopulações com susceptibilidade reduzida aumenta até que a população bacteriana adquira, homogeneamente, o fenótipo VISA (Sieradzki *et al.*, 1999; Gardete e Tomasz, 2014; Gomes, Ward e LaPlante, 2015).

A redução na susceptibilidade observada em amostras VISA não é atribuída à aquisição de genes de resistência, sendo descrito como multifatorial, com relatos de mutações em diferentes genes (Hiramatsu *et al.*, 2014). Outra característica comum à maioria das amostras VISA é o espessamento da parede celular, em parte devido ao número elevado de resíduos D-Ala-D-Ala disponíveis, fazendo com que haja uma menor difusão da vancomicina para o septo de divisão celular, onde a mesma atua (Hiramatsu, 2001; Howden, Peleg e Stinear, 2013).

Ainda que raros, já existem relatos de cepas de *S. aureus* resistentes à vancomicina (VRSA, *vancomycin-resistant S. aureus*), em que o mecanismo pode se dar a partir da aquisição de plasmídeo oriundo de cepas de *Enterococcus* resistentes à vancomicina (VRE, *vancomycin-resistant Enterococcus*) (Gardete e Tomasz, 2014; Hiramatsu *et al.*, 2014). O plasmídeo pode conter os genes *vanA* e/ou *vanB*, relacionados com a alteração do resíduo D-Ala-D-Ala (D-alanil-D-alanina) para D-Ala-D-Lac (D-alanil-D-lactato), que possui baixa afinidade pelo antimicrobiano, conferindo valores de CMI maiores ou iguais a 16 µg/mL (Gardete e Tomasz, 2014; Hiramatsu *et al.*, 2014; Saadat *et al.*, 2014; CLSI, 2018).

1.2.3. Linezolida

A linezolida é um antimicrobiano sintético pertencente à classe das oxazolidinonas, sendo o primeiro da classe a ser implementado na clínica (*Pharmacia & Upjohn Company*, 2001; Bozdogan e Appelbaum, 2004). Seu espectro de ação abrange bactérias Gram-positivas, incluindo cepas multirresistentes (Birmingham *et al.*, 2003; Bozdogan e Appelbaum, 2004). Dessa forma, a linezolida tem sido uma opção de tratamento contra infecções causadas por amostras MRSA, incluindo aquelas com susceptibilidade reduzida à vancomicina (amostras hVISA, VISA e VRSA) (Birmingham *et al.*, 2003; Bozdogan e Appelbaum, 2004; Hashemian, Farhadi e Ganjparvar, 2018).

A atuação da linezolida consiste em inibir a síntese proteica bacteriana a partir da sua ligação ao centro peptidil-transferase da subunidade ribossomal 50S, impedindo a formação do complexo de iniciação 70S funcional (Roger, Roberts e Muller, 2017). Isso faz com que sua atividade seja classificada como bacteriostática contra o gênero *Staphylococcus*, o que impede que a linezolida seja considerada um antimicrobiano de primeira escolha para tratamento de bacteremias causadas por MRSA (Gudiol *et al.*, 2017). Entretanto, é demonstrada a eficácia da linezolida para tratamento de bacteremias persistentes por MRSA quando comparada ao uso de vancomicina (Park *et al.*, 2012).

Embora a linezolida tenha sido implementada na clínica em 2000, o primeiro caso de resistência em *S. aureus* (LRSA, *linezolid-resistant Staphylococcus aureus*) foi descrito na literatura em 2001 (Tsiodras *et al.*, 2001). Apesar disso, relatos de infecções por amostras LRSA são raramente descritos (Mendes *et al.*, 2018). A resistência à linezolida pode ocorrer devido a mutações no genoma bacteriano ou pela aquisição de genes de resistência (Roger, Roberts e Muller, 2017). Nos casos em que a resistência é adquirida por mutações, as mais descritas ocorrem no domínio V do gene que codifica o rRNA 23S, constituinte da subunidade ribossomal 50S, reduzindo a afinidade ao antimicrobiano (Stefani *et al.*, 2010). Devido à presença de múltiplas cópias de rRNA 23S nas células bacterianas, o desenvolvimento de resistência à linezolida por esse mecanismo é menos comumente identificado (Tsiodras *et al.*, 2001; Stefani *et al.*, 2010; Roger, Roberts e Muller, 2017). Mutações nos genes que codificam as proteínas ribossomais L3 e L4, embora menos frequentes, também podem conferir resistência (Stefani *et al.*, 2010). A resistência conferida por elemento genético móvel, por sua vez, pode ocorrer pela aquisição de um plasmídeo contendo o gene *cfr*, que codifica uma RNA-metiltransferase responsável pela adição de um grupamento metil ao RNA 23S, afetando a ligação do antimicrobiano ao centro peptidil-transferase. Deve-se ressaltar que esse gene também confere resistência a outras classes de antimicrobianos que atuam no ribossomo bacteriano, como antibióticos fenicóis (cloranfenicol, entre outros), lincosamidas, estreptogramina A e macrolídeos (Long *et al.*, 2006; Roger, Roberts e Muller, 2017). Também foi recentemente descrito em *S. aureus* um mecanismo associado à presença do gene *poxTA*, que leva à redução da susceptibilidade à fenicóis, oxazolidinonas e tetraciclina (Antonelli *et al.*, 2018). Esse gene codifica a proteína PoxTA que pertence à linhagem F da família de proteínas ABC (*ATP-binding cassette*) associada com resistência a antimicrobianos, ARE ABC-F, sendo capaz de se disseminar entre diferentes espécies de cocos Gram-positivos. A proteína PoxTA pertence à mesma sublinhagem da proteína OptrA, descrita em espécies de *Enterococcus*, cujo mecanismo

consiste em remover o antimicrobiano de seu sítio de ligação no ribossomo (Sharkey, Edwards e O'Neill, 2016; Antonelli *et al.*, 2018).

1.2.4. Daptomicina

A daptomicina é um antimicrobiano cíclico pertencente à classe de lipopeptídeos, com atividade bactericida contra Gram-positivos (Cubist Pharmaceuticals, Inc., 2011). Ela é produto da fermentação do fungo *Streptomyces roseosporus*, sendo seu uso como agente antimicrobiano na clínica aprovado em 2003, nos Estados Unidos, (Heidary *et al.*, 2017) e sua introdução no mercado brasileiro ocorrendo em 2009 (Simpro, 2009). Assim como a linezolida, tem se mostrado uma das principais opções para o tratamento de infecções causadas por amostras MRSA com susceptibilidade reduzida à vancomicina (Gudiol *et al.*, 2017). Entretanto, por ser inativada por líquido surfactante, a daptomicina não é considerada uma opção de tratamento contra pneumonia (Silverman *et al.*, 2004).

Embora o mecanismo de ação da daptomicina não seja completamente elucidado, sabe-se que ela atua na membrana celular bacteriana de forma cálcio-dependente, principalmente no septo de divisão celular. Os monômeros de daptomicina se inserem na membrana celular ao se associarem ao fosfatidilglicerol (Stefani *et al.*, 2015; Heidary *et al.*, 2017). Após a inserção, os monômeros se oligomerizam e formam pequenos poros na membrana (Stefani *et al.*, 2015). Esses poros geram uma despolarização da membrana, levando ao efluxo de componentes celulares e, conseqüentemente, à morte bacteriana (Stefani *et al.*, 2015; Heidary *et al.*, 2017).

Apesar de haver relatos de amostras de *S. aureus* com susceptibilidade reduzida à daptomicina, o mecanismo pelo qual isso ocorre ainda é pouco compreendido (Heidary *et al.*, 2017). A redução da susceptibilidade à daptomicina em *S. aureus* é descrita como multifatorial, envolvendo mutações gênicas que levam a alterações na composição e na fluidez da membrana plasmática da bactéria (Heidary *et al.*, 2017). Um fator bem descrito como determinante para redução da susceptibilidade à daptomicina em MRSA é a repulsão eletrostática do complexo daptomicina-cálcio da superfície bacteriana (Casanova, Ruiz e Bellido, 2017; Heidary *et al.*, 2017). Dentre as mutações frequentemente associadas a esse fenômeno, as mais comuns são aquelas relacionadas ao aumento da expressão do gene *mprF* (Friedman, Alder e Silverman, 2006; Bayer *et al.*, 2015; Casanova, Ruiz e Bellido, 2017). É relatado que embora possam ocorrer mutações pontuais (SNPs, *single nucleotide polymorphisms*) em genes adicionais como *rpoB*, *rpoC* e *yycG*, SNPs em *mprF* geralmente

são as primeiras a ocorrer (Friedman, Alder e Silverman, 2006). Esse gene codifica uma enzima denominada lisilfosfatidilglicerolsintetase, responsável por adicionar ao fosfatidilglicerol presente na membrana celular uma molécula de lisina, um aminoácido positivamente carregado, e por facilitar a translocação dessa molécula da porção interna da membrana celular para a externa (Ernst *et al.*, 2009).

1.3. Biofilme x antimicrobianos

O biofilme consiste em um agregado microbiano envolto em uma matriz polimérica extracelular, com capacidade de aderir em superfícies bióticas e abióticas (Flemming e Wingender, 2010). A estrutura do biofilme confere proteção contra o sistema imune do hospedeiro e contra a ação de antimicrobianos, contribuindo para a persistência da infecção e elevação nas taxas de morbidade e mortalidade (Høiby *et al.*, 2010; Zapotoczna, O'Neill e O'Gara, 2016).

A formação do biofilme se inicia a partir da adesão da bactéria a uma superfície, onde a mesma se multiplica confluentemente enquanto produz e secreta os componentes da matriz extracelular, que auxilia na adesão a outras células e à superfície. Em amostras de *S. aureus*, a matriz pode ser composta de polissacarídeos, proteínas, DNA extracelular, entre outros (Flemming *et al.*, 2016). Entretanto, estudos indicam que a matriz do biofilme formado por amostras MRSA é composta majoritariamente por elementos protéicos, enquanto amostras sensíveis apresentam predominantemente conteúdo polissacarídico (Beeken *et al.*, 2004; Fitzpatrick, Humphreys e O'Gara, 2005; O'Neil *et al.*, 2007; Martí *et al.*, 2010; Pozzi *et al.*, 2012). Por fim, há a fase de dispersão do biofilme, que pode permitir a disseminação das células bacterianas para outros sítios. Esta fase pode se dar através do desprendimento de subpopulações bacterianas pela ação de forças mecânicas, atuação de compostos químicos que degradam a matriz ou pelo cessamento da síntese dos componentes da matriz (Moormeier *et al.*, 2014; Flemming *et al.*, 2016).

As células bacterianas que compõem o biofilme apresentam fenótipo alterado, com heterogeneidade de expressão proteica, devido a diferenças na expressão gênica (Donlan e Costerton, 2002). Além disso, essas células apresentam estados metabólicos distintos, devido ao perfil variado de distribuição de recursos na estrutura do biofilme. Em biofilmes estafilocócicos é possível identificar quatro tipos de estado metabólicos principais: as células mais superficiais mantêm um metabolismo aeróbico ativo, uma porção de células mantém o

metabolismo fermentativo, a maioria das células mantém um estado dormente e uma parte é composta por células mortas (Archer *et al.*, 2011).

É demonstrado que as células bacterianas que constituem o biofilme podem ser de dez a mil vezes mais resistentes a alguns antimicrobianos do que as células planctônicas (Davies, 2003). A capacidade de resistir aos antimicrobianos conferida pelo biofilme provém de diferentes fatores (Archer *et al.*, 2011; Hall e Mah, 2017). A maioria das células presentes no biofilme se encontra em estado dormente em resposta ao microambiente com disponibilidade reduzida de oxigênio e nutrientes, o que faz com que haja diminuição do metabolismo e da taxa de divisão celular. Com isso, elas se tornam mais tolerantes aos antimicrobianos que atuam em etapas ativas do metabolismo e durante a divisão celular, pois há uma redução dos alvos destes antimicrobianos (Davies, 2003; Archer *et al.*, 2011). A estrutura do biofilme pode retardar a penetração de determinados antimicrobianos nas camadas mais profundas, induzindo uma situação de estresse e estimulando o desencadeamento de respostas celulares que culminam em menor susceptibilidade (Davies, 2003; Harms, Maisonneuve e Gerdes, 2016, Hall e Mah, 2017). Devido à maior proximidade entre as células, a transferência horizontal de genes de resistência também se torna mais eficaz em biofilmes (Hall e Mah, 2017).

Na clínica, as concentrações de antimicrobianos administradas no tratamento de pacientes com infecções relacionadas a biofilmes são eficazes em eliminar apenas as células nas camadas mais externas da estrutura. Contudo, as células localizadas nas camadas mais profundas do biofilme não são atingidas pelos antimicrobianos, levando à persistência e potencial disseminação da infecção (Davies, 2003). Além disso, situações em que há redução da biodisponibilidade de antimicrobianos no organismo, como administração de dose incorreta, baixa distribuição e penetração nos sítios de infecção, descontinuidade do uso da droga, início e final de tratamento, podem culminar em concentrações subinibitórias (sub-CMIs) no biofilme (Andersson e Hughes, 2014; Majidpour *et al.*, 2017). Estudos têm demonstrado que sub-CMIs de antimicrobianos como oxacilina, vancomicina ou linezolida podem impactar na produção de biofilme por algumas cepas de *Staphylococcus* spp. (Frank *et al.*, 2007; Mirani e Jamil, 2011; Majidpour *et al.*, 2017). Kaplan e colaboradores (2012), por exemplo, observaram que sub-CMIs de oxacilina promoveram uma maior liberação de DNA extracelular, que atua como um constituinte da matriz polimérica do biofilme de *S. aureus*, levando a um aumento na acumulação de biofilme (Kaplan *et al.*, 2012).

1.4. Epidemiologia da linhagem USA100/ST5 em hospitais brasileiros

O estudo epidemiológico das infecções causadas por *S. aureus* permite determinar a origem de uma cepa, estabelecer relações clonais e identificar e controlar surtos hospitalares ou comunitários causados por determinadas linhagens (Shopsin *et al.*). Para identificar a linhagem causadora do surto, são utilizados métodos fenotípicos de identificação seguidos por métodos de tipagem molecular que diferenciam as linhagens dentro da mesma espécie (Shopsin *et al.*, 1999; Tenover *et al.*, 2007).

Além da determinação do tipo de SCCmec, um dos principais métodos de tipagem utilizado para diferenciar as linhagens de *S. aureus* é a técnica de eletroforese em gel de campo pulsado (PFGE, *pulsed-field gel electrophoresis*) (McDougal *et al.*, 2003). A técnica de PFGE consiste em determinar o perfil de bandamento das amostras de *S. aureus* a partir da fragmentação do genoma bacteriano pela enzima de restrição *SmaI*, que cliva o DNA em regiões específicas e leva à formação de bandas de tamanhos característicos (Tenover *et al.*, 1995). Devido à laboriosidade da técnica de PFGE, podem ser utilizadas como alternativa ou em conjunto com ela a técnica de tipagem de sequências multilocus (MLST, *multilocus sequence typing*) e a tipagem do gene *spa* (Tenover *et al.*, 2007). A técnica de MLST consiste em determinar a sequência tipo (ST, *sequence type*) de uma determinada amostra a partir do sequenciamento de sete genes *house-keeping* (Enright *et al.*, 2000). Por outro lado, a tipagem do gene *spa*, que codifica a proteína A presente na membrana plasmática de *S. aureus*, é baseada no sequenciamento da região polimórfica X, uma região com repetição de sequência curta (Shopsin *et al.*, 1999).

Em 2003, McDougal e colaboradores propuseram a uniformização da nomenclatura, baseado nas linhagens mais prevalentes nos EUA, identificadas por tipagem de SCCmec e do gene *spa*, PFGE e MLST. Nesta proposta, foram reveladas oito linhagens clonais, nomeadas de USA100 a USA800. As linhagens USA100 (ST5), associada ao clone Nova Iorque/Japão, e USA200 (ST36) foram descritas como as mais prevalentes em hospitais norte-americanos, sendo ambas carreadoras do SCCmec II. A linhagem USA800, associada ao clone Pediátrico, apesar de também apresentar ST5, difere da USA100 por carrear o SCCmec IV. Assim como a linhagem USA800, as linhagens USA300, USA400 e USA700 carregam o SCCmec IV e estão associadas a infecções comunitárias. A linhagem USA500 foi associada a amostras do clone Arcaico/Ibérico com perfil de multirresistência. Amostras da linhagem USA600 (ST45) podem carrear os SCCmec tipos II ou IV, sendo USA600-II associada ao clone Canadense e USA600-IV associada ao clone Berlim (McDougal *et al.*, 2003). Alguns anos após a

classificação de McDougal e colaboradores (2003), foram descritas outras quatro linhagens: USA900, USA1000, USA1100 e USA1200. Destas, as linhagens USA1100, do ST30 e associada ao clone Oceania, e USA1000, do ST59, apresentam SCCmec IV em sua estrutura, enquanto que as linhagens USA900, do ST15, e USA1200, de ST desconhecido, são principalmente relacionadas com amostras MSSA (Tenover *et al.*, 2008; Monecke *et al.*, 2011).

Embora a linhagem USA100/ST5 tenha sido amplamente isolada em hospitais dos EUA e Japão durante a década de 2000, a linhagem prevalente em hospitais brasileiros durante o período era o clone endêmico brasileiro (CEB) do ST239/SCCmecIII (McDougal *et al.*, 2003; Ko *et al.*, 2005; Vivoni *et al.*, 2006), ainda que amostras com SCCmec II associadas à linhagem USA100/ST5 fossem isoladas em pequena proporção e amostras com SCCmec IV estivessem emergindo na clínica (Caboclo *et al.*, 2013). Entretanto, estudos recentes relataram um aumento na frequência de isolamento da linhagem USA100/ST5 em hospitais nacionais (Caiaffa-Filho *et al.*, 2013; Chamon *et al.*, 2017; Damasco, 2017), incluindo sua emergência em Unidades de Terapia Intensiva (UTI) (Nascimento *et al.*, 2018). Em 2017, foi descrita a completa substituição do clone CEB por essa linhagem em alguns hospitais do Rio de Janeiro (Chamon *et al.*, 2017).

A linhagem USA100/ST5 é historicamente relacionada à aquisição de mecanismos de resistência, uma vez que a primeira amostra VISA identificada (Mu50) foi identificada como membro da linhagem USA100/ST5 (McDougal *et al.*, 2003). Diferentes estudos epidemiológicos também relataram a associação da linhagem USA100/ST5 com amostras hVISA, VISA e VRSA (Tenover *et al.*, 2004; Sader *et al.*, 2009; Limbago *et al.*, 2014; da Costa *et al.*, 2016). Estudos conduzidos recentemente vêm mostrando uma associação entre a linhagem USA100/ST5 e a redução da susceptibilidade à daptomicina, que, junto com a vancomicina, são as principais escolhas para o tratamento de infecções de corrente sanguínea causadas por MRSA (Cavalcante *et al.*, 2014; da Costa *et al.*, 2016; Gudiol *et al.*, 2017). Além disso, amostras clínicas dessa linhagem tendem a apresentar resistência a antimicrobianos utilizados na rotina clínica, sendo relatada resistência à eritromicina, clindamicina e ciprofloxacina (McDougal *et al.*, 2003; Klevens *et al.*, 2006). Estudos que investigam o perfil de susceptibilidade à mupirocina, utilizada para descolonização de *S. aureus*, frequentemente também associam a resistência a esse antimicrobiano com a linhagem USA100/ST5 (Simor *et al.*, 2007; Seah *et al.*, 2012; Chamon, 2017).

Um fator que pode contribuir para o aumento da resistência antimicrobiana é a capacidade de formação de biofilme (Davies, 2003). Apesar de esse aspecto ser pouco

estudado na linhagem USA100/ST5/SCC*mec* II, é descrito que este tipo de amostra tende a ser produtora de biofilme (Souza *et al.*, 2009; Baldan *et al.*, 2012; Vanhommerig *et al.*, 2014; Côrtes *et al.*, 2015; Bastião *et al.*, 2016; King *et al.*, 2016; Guimarães, 2018). Entretanto, não há uniformidade na literatura em relação à quantidade de biofilme formado por essa linhagem, sendo relatadas amostras produtoras de biofilme fraco (Baldan *et al.*, 2012), moderado (Vanhommerig *et al.*, 2014; Côrtes *et al.*, 2015; Batistão *et al.*, 2016) e forte (Côrtes *et al.*, 2015; King *et al.*, 2016). Alguns estudos avaliaram a capacidade de formação de biofilme em amostras carreadoras de diferentes tipos de SCC*mec*, e também relataram que grande parte das amostras com SCC*mec* tipo II são capazes de produzir biofilme (Cha *et al.*, 2013; Lim *et al.*, 2013; Batistão *et al.*, 2016).

2. Justificativa

Uma das principais dificuldades enfrentadas atualmente no tratamento de infecções bacterianas é a multirresistência aos antimicrobianos, sendo esta uma importante característica que vem contribuindo para a permanência de *S. aureus* como principal patógeno Gram-positivo causador de infecções hospitalares. Nesse ambiente, pacientes submetidos a processos invasivos estão propensos a adquirir infecções de corrente sanguínea e associadas a biofilme. Entre as linhagens de MRSA prevalentes em hospitais brasileiros, o clone endêmico brasileiro (CEB/ST239) era amplamente isolado durante a década de 2000. Entretanto, estudos de vigilância conduzidos pelo nosso grupo no Rio de Janeiro relataram a completa substituição da linhagem CEB/ST239 pelas linhagens USA400/ST1 e USA100/ST5 em alguns hospitais. A disseminação da linhagem USA100/ST5 é preocupante, uma vez que ela está associada com a aquisição de resistência à vancomicina e de não susceptibilidade à daptomicina, drogas utilizadas como escolha para o tratamento de infecções de corrente sanguínea causadas por cepas MRSA. Embora seja raro o relato de resistência à linezolida, também se torna relevante o monitoramento do seu perfil de susceptibilidade, já que esta linhagem é notória por sua aquisição de resistência múltipla aos antimicrobianos. Além disso, a linhagem USA100/ST5 também é apontada em alguns estudos como capaz de produzir biofilme, fator que antimicrobiana entre amostras dessa linhagem em hospitais do Rio de Janeiro. O laboratório onde o estudo foi realizado conta com uma coleção de amostras MRSA USA100/ST5 obtidas ao longo de cerca de dez anos que permitiu comparar as características das amostras em dois períodos distintos, elucidando características adquiridas que contribuíram para que esta linhagem ganhasse espaço na clínica.

3. Objetivos

Caracterizar a ação de diferentes classes de antimicrobianos em células planctônicas e no biofilme previamente formado de amostras MRSA da linhagem USA100/ST5 coletadas em hospitais do Rio de Janeiro entre 2004 e 2015.

3.1. Estratégias

- Confirmar a identificação da espécie *S. aureus* através de MALDI-TOF-MS;
- Determinar o perfil de susceptibilidade das amostras a nove antimicrobianos através da técnica de disco-difusão;
- Determinar as concentrações mínimas inibitórias das amostras através da técnica de microdiluição em caldo para daptomicina, linezolida, oxacilina e vancomicina;
- Verificar o efeito de daptomicina, linezolida e vancomicina sobre o biofilme formado por uma amostra previamente caracterizada como forte produtora;
- Determinar as concentrações mínimas de vancomicina e linezolida necessárias para erradicação do biofilme formado por uma amostra previamente classificada como produtora de biofilme forte;
- Comparar através de análise estatística os resultados obtidos para as amostras coletadas nos dois períodos distintos avaliados, 2004 - 2009 e 2011 - 2015.

4. Metodologia

4.1. Características do estudo

O estudo possui caráter retrospectivo, descritivo e laboratorial. Foram selecionadas todas as amostras clínicas MRSA USA100/ST5, previamente caracterizadas através de testes fenotípicos convencionais e genotípicos, coletadas entre 2004 e 2015 e pertencentes à coleção de amostras do Laboratório de Infecção Hospitalar (LIH), do Instituto de Microbiologia Paulo de Góes (IMPPG), da Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ). Desta forma, este estudo incluiu 63 amostras isoladas de dois hospitais públicos do Rio de Janeiro, Hospital Universitário Clementino Fraga Filho (HUCFF) e Hospital Naval Marcílio Dias (HNMD). As mesmas se encontram estocadas a -20 °C em TSB (Caldo triptona de soja, *Tryptic Soy Broth*, BD, Becton, Dickinson and Company; Sparks, MD, EUA) acrescido de 20% (v/v) glicerol (Proquimios Comércio e Indústria Ltda; Rio de Janeiro, RJ, Brasil) (Sambrock, Fritsch e Maniatis, 1989).

O fluxograma da metodologia utilizada está descrito na Figura 1.

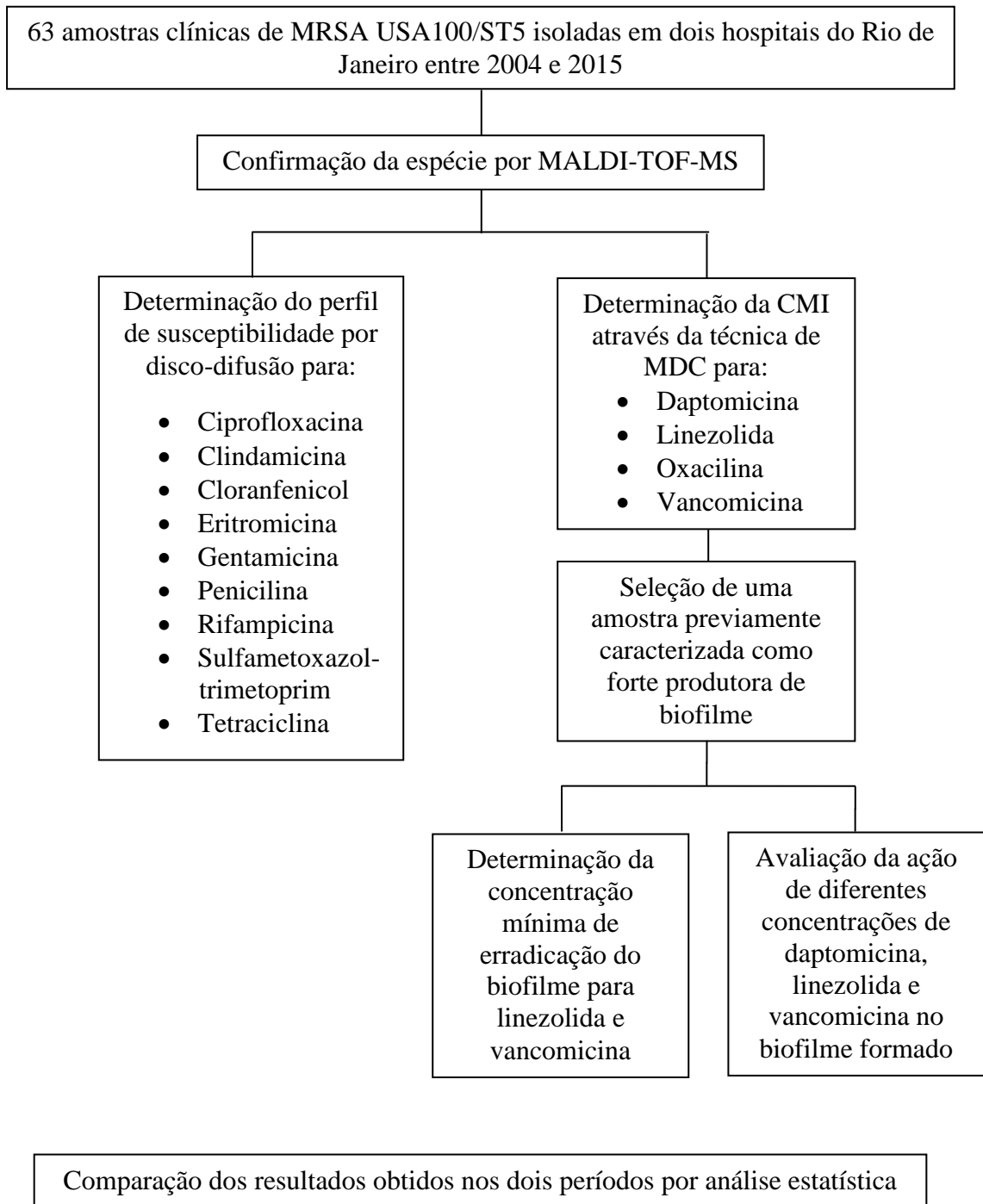


Figura 1: Fluxograma da metodologia a ser utilizada no estudo.

CMI – Concentração mínima inibitória; MALDI-TOF – Ionização e dessorção a laser assistida por matriz - tempo de voo - espectrometria de massa; MDC – Microdiluição em caldo; MRSA – *Staphylococcus aureus* resistente à meticilina; ST – Sequência tipo.

4.2. Confirmação da espécie *Staphylococcus aureus* por MALDI-TOF-MS (Ionização e dessorção a laser assistida por matriz - tempo de voo - espectrometria de massa, *Matrix Assisted Laser Desorption Ionization - Time Of Flight - Mass Spectrometry*)

As amostras utilizadas no estudo foram previamente caracterizadas pelo nosso grupo. Entretanto, para confirmação da espécie bacteriana, as amostras foram avaliadas através da técnica de MALDI-TOF-MS.

Para realizar a técnica, as amostras foram semeadas em TSA (*Tryptic Soy Agar*, BD, Becton, Dickinson and Company; Sparks, MD, EUA) e incubadas a 35 °C por 24 h. Após o crescimento, uma colônia isolada foi transferida com auxílio de um palito de madeira estéril para um poço da placa metálica (Sample Target) fornecida pelo fabricante do equipamento MALDI-TOF Microflex LT (Bruker Daltonics). Cada amostra foi inoculada e analisada em duplicata. Após a inoculação das amostras, foi adicionado 1 µL de ácido fórmico a 70% (Sigma-Aldrich Chemical Company; Saint Louis, MO, EUA) por poço e a placa foi mantida em temperatura ambiente até que o material estivesse completamente seco. Em seguida, em cada poço, foi inoculado 1 µL da matriz composta por ácido α -ciano-4-hidroxicinâmico (HCCA, Sigma; Saint Louis, MO, EUA) preparado em acetonitrila 50% e ácido trifluoroacético 2,5% (Sigma; Saint Louis, MO, EUA). Após a secagem da mistura e formação dos cristais, a placa de metal foi inserida no aparelho para a leitura das amostras. Como calibrador, foi empregada a estirpe de *Escherichia coli* DH5 α , e os espectros obtidos foram processados pelo software de bioinformática MALDI Biotyper versão 7.0 (Bruker Daltonics) em modo operacional padrão, que realizou uma pesquisa em sua biblioteca de espectros de referência para encontrar aqueles que mais se assemelham ao obtido com a amostra. Os dez microrganismos com os picos mais próximos foram listados de acordo com o *score* gerado pelo software, que varia de 0 a 3,0 (Tabela 1). A pontuação de corte utilizada pelo estudo foi de 2,0, que indica alta probabilidade de gênero e a provável espécie.

Tabela 1: Descrição do significado das faixas de *score* geradas pela técnica de ionização e dessorção a laser assistida por matriz - tempo de voo - espectrometria de massas (MALDI-TOF-MS).

Faixa de <i>score</i>	Descrição
2,300 - 3,000	Identificação de espécie altamente provável
2,000 - 2,299	Identificação de espécie provável, identificação de gênero segura
1,700 - 1,999	Identificação de gênero provável
0.000 - 1,699	Identificação não confiável

4.3. Determinação do perfil de susceptibilidade a antimicrobianos

O perfil de susceptibilidade das 63 amostras foi determinado para nove antimicrobianos de classes diferentes por meio da técnica de disco-difusão, seguindo as recomendações do CLSI (2018). Os antimicrobianos avaliados foram: ciprofloxacina (5 µg), clindamicina (2 µg), cloranfenicol (30 µg), eritromicina (15 µg), gentamicina (10 µg), penicilina (10 U), rifampicina (5 µg), sulfametoxazol-trimetoprim (1,25/23,75 µg) e tetraciclina (30 µg) (Oxoid, Hants, Reino Unido). Além disso, a CMI para daptomicina, linezolida, oxacilina e vancomicina (Sigma-Aldrich Chemical Company; Saint Louis, MO, EUA) foi determinada para cada uma das 63 amostras através da técnica de microdiluição em caldo, de acordo com as recomendações do CLSI (2018). As amostras foram consideradas multirresistentes quando apresentaram resistência a pelo menos três antimicrobianos de classes diferentes (Chamon *et al.*, 2017).

4.3.1. Determinação do perfil de susceptibilidade a nove antimicrobianos por disco-difusão

Para a realização da técnica, as amostras foram semeadas em TSA e incubadas por 24 h a 35 °C. A partir do crescimento, foram preparadas suspensões bacterianas em solução salina (NaCl; Proquimios Comércio e Indústria Ltda, Rio de Janeiro, RJ, Brasil) a 0,85% (p/v) ajustadas de acordo com a turbidez equivalente à escala 0,5 de McFarland ($1,5 \times 10^8$ UFC/mL; absorvância entre 0,08 e 0,1 a 600 nm). Com o auxílio de um *swab* estéril, as suspensões foram semeadas de forma confluyente em ágar Mueller-Hinton (BD, Becton, Dickinson and Company; Sparks, MD, EUA). Após a semeadura, os discos dos antimicrobianos foram depositados sobre as placas e as mesmas foram incubadas a 35 °C por 16 a 20 h. Após esse período, os diâmetros dos halos de inibição de crescimento foram medidos e comparados com

os parâmetros fornecidos pelo CLSI (2018). Os valores indicativos de sensibilidade, resistência intermediária e resistência para cada antimicrobiano estão listados na Tabela 2. A amostra de *S. aureus* ATCC 25923 foi utilizada como controle da técnica, de acordo com as recomendações do CLSI (2018).

Tabela 2: Descrição dos pontos de corte para interpretação do halo de inibição de crescimento de *Staphylococcus aureus* para nove antimicrobianos utilizando a técnica de disco-difusão, segundo o *Clinical & Laboratory Standards Institute* (2018).

Antimicrobiano	Diâmetro do halo de inibição (mm)		
	Sensível	Resistência Intermediária	Resistência
Ciprofloxacina	≥21	16 - 20	≤15
Clindamicina	≥21	15 - 20	≤14
Cloranfenicol	≥18	13 - 17	≤12
Eritromicina	≥23	14 - 22	≤13
Gentamicina	≥15	13 - 14	≤12
Penicilina	≥29	NA ^a	≤28
Rifampicina	≥20	17 - 19	≤16
Sulfametoxazol-Trimetoprim	≥16	11 - 15	≤10
Tetraciclina	≥19	15 - 18	≤14

^aNA: Não se aplica

4.3.2. Determinação do perfil de susceptibilidade a quatro antimicrobianos por microdiluição em caldo

Foi utilizada uma placa de 96 poços de fundo côncavo (CRALPLAST; Cotia, SP, Brasil). Cada poço foi preenchido com 100 µL de caMHB (Caldo Muller-Hinton cátion ajustado, *cation adjusted Muller-Hinton Broth*, BD, Becton, Dickinson and Company; Sparks, MD, EUA), sendo a primeira coluna acrescida de mais 90 µL de meio e 10 µL do antimicrobiano com concentração vinte vezes superior à da maior concentração testada. Dessa forma, a solução estoque do antimicrobiano foi diluída 1:20 (v/v), atingindo a concentração máxima utilizada no teste (256 µg/mL para oxacilina e 16 µg/mL para os demais antimicrobianos) na primeira coluna. Para o teste com oxacilina, o meio foi preparado com adição de 2% (p/v) de cloreto de sódio (NaCl); enquanto que para o teste com daptomicina, foi realizada uma suplementação do meio com cloreto de cálcio (CaCl₂) (Macalé; Juiz de Fora, MG, Brasil), a fim de atingir uma concentração final de 50 µg/mL, como preconizado pelo CLSI (2018).

A partir da primeira coluna, foi realizada uma diluição seriada até a penúltima coluna, em que 100 µL foram retirados e transferidos para a coluna adjacente. Cada passagem faz com que a concentração do antimicrobiano seja reduzida à metade, variando de 256 a 0,25 µg/mL para oxacilina e de 16 a 0,25 µg/mL para os demais antimicrobianos. A última coluna foi utilizada como controle da técnica, na qual dois poços foram acrescidos de 3 µL do antimicrobiano (controle de esterilidade do antimicrobiano), dois poços foram acrescidos de 5 µL da suspensão da amostra controle sem adição do antimicrobiano (controle do crescimento bacteriano) e os demais poços continham apenas o meio de cultura (controle de esterilidade do meio).

Para preparar o inóculo, as amostras foram semeadas em TSA e incubadas por 24 h a 35 °C. Após esse período, foram preparadas suspensões bacterianas em solução salina a 0,85% (p/v) ajustadas de acordo com a turbidez equivalente à escala 0,5 de McFarland ($1,5 \times 10^8$ UFC/mL; absorvância entre 0,08 e 0,1 a 600 nm). Dessas suspensões, 100 µL foram transferidos para um microtubo contendo 900 µL de solução salina estéril. A partir desta diluição 1:10 ($\sim 1,5 \times 10^7$ UFC/mL), 5 µL foram transferidos para cada poço da fileira correspondente à amostra, da menor para a maior concentração.

A leitura foi feita visualmente de acordo com as recomendações do CLSI (2018). A CMI foi determinada como a menor concentração em que não foi observada a formação de um “botão” ou turvação do meio. Para linezolid, a CMI foi determinada como a menor concentração em que não foi possível visualizar um “botão” bem definido. Foi utilizada como controle a amostra ATCC 29213, amostra sensível a todos os antimicrobianos testados, conforme descrito pela referência adotada (CLSI, 2018).

Os resultados foram relatados conforme os pontos de corte determinados pelo CLSI (2018), descritos na tabela abaixo (Tabela 3).

Tabela 3: Descrição dos pontos de corte para interpretação da concentração mínima inibitória pela técnica de microdiluição em caldo para daptomicina, linezolida, oxacilina e vancomicina para *Staphylococcus aureus*, segundo o *Clinical & Laboratory Standards Institute* (2018).

Antimicrobiano	Pontos de corte para CMI ^a (µg/mL)		
	Sensibilidade/ Susceptibilidade	Resistência Intermediária	Resistência / Não- susceptibilidade
Daptomicina	≤1	NA ^b	NA
Linezolida	≤4	NA	≥8
Oxacilina	≤2	NA	≥4
Vancomicina	≤2	4 - 8	≥16

^aCMI: Concentração Mínima Inibitória; ^bNA: Não se aplica.

A partir dos resultados obtidos para cada antimicrobiano, foram determinadas as CMI₅₀ e CMI₉₀, ou seja, as CMIs capazes de inibir 50% e 90% dos microrganismos, respectivamente (Schwarz *et al.*, 2010). Além disso, foi determinada a CMI modal, faixa de CMI em que a maioria das amostras se encontra.

4.4. Determinação da ação de antimicrobianos sobre o biofilme formado

Uma amostra previamente caracterizada como fortemente produtora de biofilme foi selecionada para avaliar a ação da daptomicina, linezolida e vancomicina em diferentes concentrações (0,25 x CMI, 0,5 x CMI, 1 x CMI e 2 x CMI) no biofilme formado. Para a formação e coloração do biofilme, foi adotada a metodologia descrita por Stepanovic´ e colaboradores (2007), com pequenas alterações. Para avaliação do efeito dos antimicrobianos no biofilme formado, foi utilizada a metodologia descrita por Antunes e colaboradores (2011), com algumas modificações. Como controle do experimento, foi utilizada a amostra ATCC 33591 (produtora de biofilme moderado). O experimento foi realizado em triplicata biológica e duplicata experimental.

4.4.1. Formação do biofilme bacteriano

As amostras foram semeadas em TSA e incubadas por 24 h a 35 °C. As amostras crescidas foram utilizadas para preparar suspensões ajustadas para o padrão de turbidez da escala 0,5 de McFarland ($1,5 \times 10^8$ UFC/mL; absorvância entre 0,08 e 0,1 a 600 nm) em tubos contendo 3 mL de água destilada estéril. Em uma placa de poliestireno de 96 poços com fundo chato modelo TPP 92096 (Techno Plastic Products, Trasadingen, Suíça), foram

adicionados 180 μL de TSB acrescido de 1% glicose (p/v) (Isofar; Duque de Caxias, RJ, Brasil) e 20 μL da suspensão bacteriana. Foram reservados nove poços em que não houve adição da suspensão bacteriana para controle do teste (branco). A placa foi incubada por 24 h a 37 °C.

4.4.2. Exposição do biofilme formado a diferentes concentrações de antimicrobianos

Após a etapa de formação do biofilme, o meio foi retirado com auxílio de pipeta e foram realizadas duas etapas de lavagem com 200 μL de PBS (Tampão fosfato salino, *phosphate buffered saline*, Laborclin; Pinhais, PN, Brasil) 1 X pH 7,2 \pm 0,1 estéril para retirar as células não aderidas. Em seguida, foram adicionados, em triplicata para cada amostra, 190 μL de caMHB e 10 μL de antimicrobiano. Para daptomicina, o meio foi suplementado com cloreto de cálcio de forma a apresentar uma concentração final de 50 $\mu\text{g/mL}$. A daptomicina, linezolida e vancomicina tiveram soluções estoque preparadas previamente, de modo a estarem 20 vezes mais concentrados do que as concentrações desejadas. Dessa forma, foi realizada uma diluição 1:20 (v/v) e obtido, na placa, as concentrações equivalentes a 0,25 x CMI, 0,5 x CMI, 1 x CMI e 2 x CMI de cada amostra. Além disso, foram adicionados 200 μL de caMHB sem antimicrobiano em seis dos nove poços do branco para controle do meio de cultura e os outros três poços receberam 190 μL de caMHB e 10 μL de antimicrobiano 20 vezes concentrado (maior diluição) para controle de esterilidade do antimicrobiano (Figura 2). A placa foi novamente incubada a 35 °C por 20 h, quando utilizadas linezolida e daptomicina e, por 24 h, quando utilizada vancomicina.

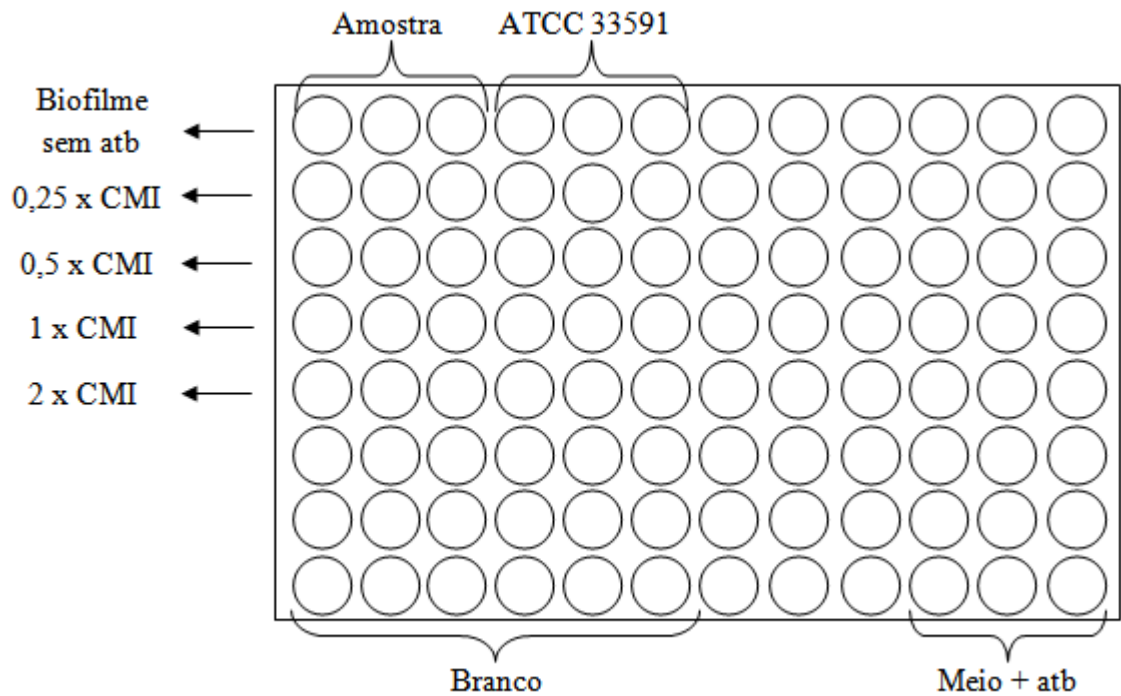


Figura 2: Descrição da disposição das amostras, branco e concentrações de antimicrobiano utilizadas no ensaio de verificação da ação de antimicrobianos no biofilme formado por *Staphylococcus aureus* USA100/ST5 e a amostra controle ATCC 33591.
atb: antimicrobiano; CMI: Concentração mínima inibitória.

4.4.3. Coloração do biofilme

Conforme descrito por Stepanovic' e colaboradores (2007), ao final da segunda incubação, o meio foi desprezado e foram realizadas duas lavagens com 200 μL de PBS 1 X. A placa foi incubada a 60 °C por 1 h para fixação do biofilme. Para a coloração do biofilme, foram adicionados 150 μL de safranina (Fisher Scientific Company; Fair Lawn, NJ, EUA) a 0,1% (p/v) filtrada em cada poço e a placa foi incubada a temperatura ambiente por 15 min. Em seguida, o corante foi desprezado por inversão da placa, foram realizadas duas lavagens com 200 μL de PBS 1 X e a placa permaneceu invertida por 10 min para remoção do excesso de tampão. Após esse período, foram adicionados 150 μL de etanol a 95% (v/v) para eluição do corante retido no biofilme e a placa permaneceu tampada a temperatura ambiente por 30 min. Após a eluição, a placa foi inserida em um espectrofotômetro (Thermoplate TP Reader MN) para a leitura da densidade óptica (DO) em comprimento de onda de 492 nm.

4.4.4. Interpretação dos valores de DO obtidos

A partir dos valores de DO obtidos, foram realizados os devidos cálculos para as análises comparativas da ação de diferentes concentrações de antimicrobiano sobre o biofilme formado (Tabela 4). Primeiramente, foi calculada a média das DOs dos poços correspondentes ao branco ($DO_{\text{média branco}}$). Em seguida, foi calculada a média da DO da triplicata de cada concentração a que cada amostra foi submetida ($DO_{\text{média amostra}}$), e dessa média foi subtraída a $DO_{\text{média branco}}$, conferindo um valor de DO final (DO_f) para cada concentração em cada amostra. Dessa forma, foi possível realizar a comparação entre a DO_f da amostra submetida a determinada concentração de antimicrobiano com a DO_f da amostra sem adição de antimicrobiano.

Tabela 4: Descrição dos cálculos utilizados para determinação da $DO_{\text{média amostra}}$, $DO_{\text{média branco}}$ e DO_f.

$DO^a_{\text{média da amostra}}$	$DO_{\text{média do branco}}$	DO _f ^b
<u>Poço 1 + Poço 2 + Poço 3</u> 3	<u>Branco 1 + ... + Branco 6</u> 6	DO média da amostra – DO média do branco

^aDO: Densidade óptica

^bDO_f: Densidade óptica final

4.5. Determinação da concentração mínima de erradicação de biofilme (CMEB)

A concentração mínima de vancomicina e linezolida necessária para erradicação do biofilme formado por uma amostra forte produtora foi determinada utilizando a metodologia descrita por Antunes e colaboradores (2011), com algumas modificações. Foi considerada a erradicação do biofilme quando a DO obtida na avaliação do biofilme da amostra foi similar a do controle negativo na técnica. Como controle do experimento, foi utilizada a amostra MRSA ATCC 33591 (produtora de biofilme moderado). O experimento foi realizado em triplicata biológica e duplicata experimental.

O biofilme foi formado conforme descrito no item 4.5.1. Após a incubação, o meio foi retirado com o auxílio de uma pipeta e foram realizadas duas etapas de lavagem com 200 µL de PBS 1 X. Posteriormente, foram adicionados, em triplicata para cada amostra, 160 µL de caMHB e 40 µL de antimicrobiano em concentração cinco vezes maior que a desejada, realizando uma diluição 1:5 (v/v). Foram preparadas soluções estoque em diferentes

concentrações, de modo que o antimicrobiano atingisse, na placa, as concentrações correspondentes à 4 x, 8 x, 16 x, 32 x, 64 x e 128 x a CMI de cada amostra (Figura 3). A placa foi novamente incubada a 35 °C por 20 h, quando utilizada linezolid e, por 24 h, quando utilizada vancomicina. Ao término da segunda incubação, procedeu-se com a coloração do biofilme conforme descrita no tópico 4.5.3. Os cálculos de $DO_{\text{média amostra}}$, $DO_{\text{média branco}}$ e DO_f , assim como as comparações entre DOs para diferentes concentrações, também foram realizados como descrito no tópico 4.5.4.

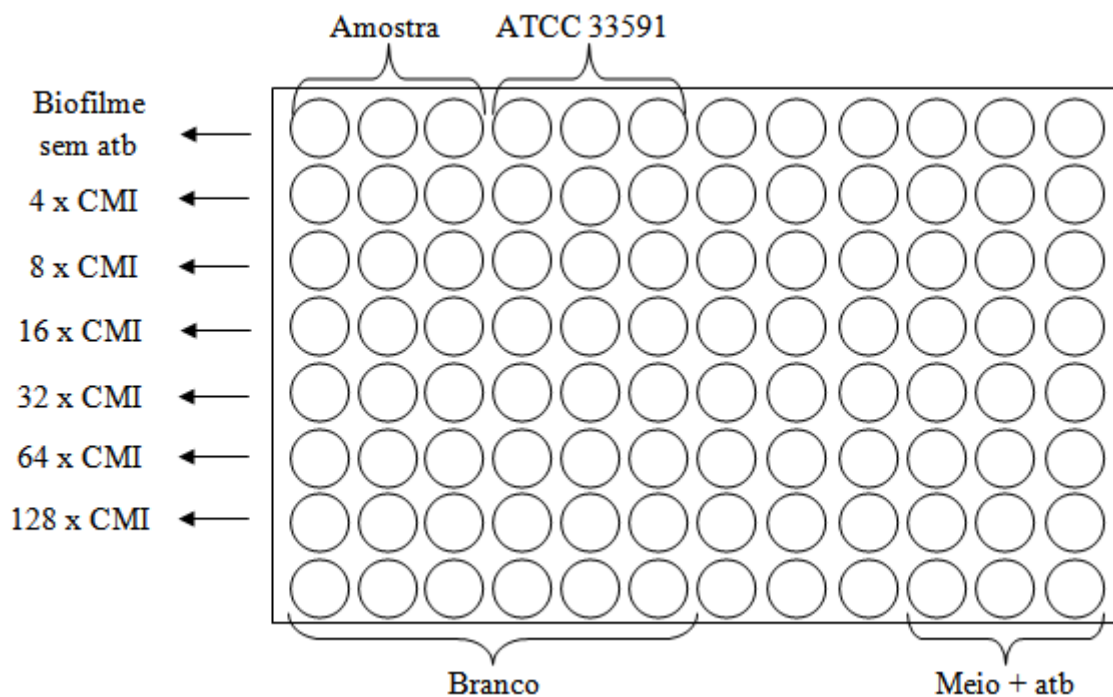


Figura 3: Descrição da disposição das amostras e concentrações de antimicrobiano no ensaio de determinação da concentração mínima de erradicação do biofilme formado por *Staphylococcus aureus* USA100/ST5 e a amostra controle ATCC 33591. CMI: Concentração mínima inibitória; atb: antimicrobiano.

4.6. Análise estatística

O programa GraphPad Prism 6.01 foi utilizado para as análises estatísticas dos dados. Os valores de CMI, assim como os valores de CMI_{50} e CMI_{90} , para os antimicrobianos avaliados foram comparados entre as amostras coletadas nos dois períodos de estudo (2004 - 2009 e 2011 - 2015) utilizando o teste exato de Fisher. Os resultados de DOs obtidos ao submeter o biofilme a diferentes concentrações de antimicrobianos e ao determinar a CMEB foram comparados como descrito no tópico 4.5.4, utilizando o teste *Two-way* ANOVA, seguido do teste de Dunnett para correção de múltiplas comparações. Diferenças nas quais os valores de p eram $<0,05$ foram consideradas estatisticamente significantes.

5. Resultados

5.1. Características das amostras

Todas as 63 amostras clínicas, previamente caracterizadas como MRSA USA100/ST5 e pertencentes à coleção de amostras do LIH, foram isoladas entre 2004 e 2015, sendo 36 (57%) de 2004 a 2009 e 27 (43%) de 2011 a 2015. Cada amostra foi isolada de um único paciente, sendo 32 (51%) provenientes do HNMD e 31 (49%) do HUCFF. Dentre estas, 52 (83%) foram provenientes de ICS, correspondendo a 69% (25 amostras) do total de amostras referentes ao período de 2004 - 2009 e 100% (27) das isoladas entre 2011 e 2015. Outros sítios dos quais as amostras investigadas foram isoladas incluíram: escara (1; 2%), narina (3; 5%), secreção traqueal (1; 2%), secreção óssea (1; 2%) e urina (1; 2%). Apenas 6% (4) do total de amostras, todas referentes ao período de 2004 - 2009, não possuíam sítio de isolamento determinado (Tabela 5). As amostras foram submetidas ao MALDI-TOF-MS para confirmação da espécie bacteriana e apresentaram *score* igual ou superior a 2,0.

Tabela 5: Distribuição das 63 amostras de *Staphylococcus aureus* USA100/ST5 utilizadas no estudo de acordo com o período e sítio de isolamento.

Sítio de isolamento	n (%) de amostras	
	2004 - 2009	2011 - 2015
Escara	1 (3)	0 (0)
Narina	3 (8)	0 (0)
Sangue	25 (69)	27 (100)
Secreção traqueal	1 (3)	0 (0)
Secreção óssea	1 (3)	0 (0)
Urina	1 (3)	0 (0)
ND ^a	4 (11)	0 (0)
Total	36 (100)	27 (100)

^aND: Não determinado

5.2. Determinação do perfil de susceptibilidade a nove antimicrobianos por disco-difusão

O perfil de susceptibilidade a nove diferentes antimicrobianos foi determinado pela técnica de disco-difusão para as 63 amostras incluídas no estudo (Tabela 6). Todas as amostras foram multirresistentes, apresentando resistência a pelo menos três antimicrobianos de classes distintas. Em ambos os períodos (2004 - 2009 e 2011 - 2015), todas as amostras foram resistentes à ciprofloxacina, clindamicina, eritromicina e penicilina. Por outro lado, nenhuma amostra apresentou resistência à tetraciclina e à combinação de sulfametoxazol com trimetoprim. Os percentuais de resistência para cloranfenicol e gentamicina foram de 22% (8 amostras) e 6% (2), respectivamente, para as amostras correspondentes ao período de 2004 - 2009, enquanto os percentuais referentes ao período de 2011 - 2015 foram de 30% (8) e 15% (4). Além disso, 3 amostras do período de 2004 - 2009 foram resistentes à rifampicina. Não houve diferença estatística entre os percentuais de resistência apresentados entre os períodos.

Tabela 6: Distribuição dos percentuais de resistência a nove antimicrobianos por disco-difusão apresentados por 63 amostras de *Staphylococcus aureus* USA100/ST5 de acordo com o período de isolamento.

Antimicrobiano	n (%) de amostras resistentes		Valor de <i>p</i>
	2004 - 2009 (n=36)	2011 - 2015 (n=27)	
Ciprofloxacina	36 (100)	27 (100)	NA ^a
Clindamicina	36 (100)	27 (100)	NA
Cloranfenicol	8 (22)	8 (30)	0,5665
Eritromicina	36 (100)	27 (100)	NA
Gentamicina	2 (6)	4 (15)	0,3883
Penicilina	36 (100)	27 (100)	NA
Rifampicina	3 (8)	0 (0)	0,2535
Sulfametoxazol-trimetoprim	0 (0)	0 (0)	NA
Tetraciclina	0 (0)	0 (0)	NA

^aNA: Não se aplica.

5.3. Determinação da CMI para quatro antimicrobianos

As CMIs para daptomicina, linezolida, oxacilina e vancomicina foram determinadas para todas as amostras USA100/ST5 através da técnica de microdiluição em caldo. A figura 4 e as Tabelas 7 e 8 apresentam os valores de CMI referentes aos períodos de 2004 - 2009 e 2011 - 2015, respectivamente, enquanto a Tabela 9 apresenta os valores de faixa de CMI, CMI₅₀, CMI₉₀, CMI modal e percentual de resistência ou não susceptibilidade de acordo com o período de isolamento.

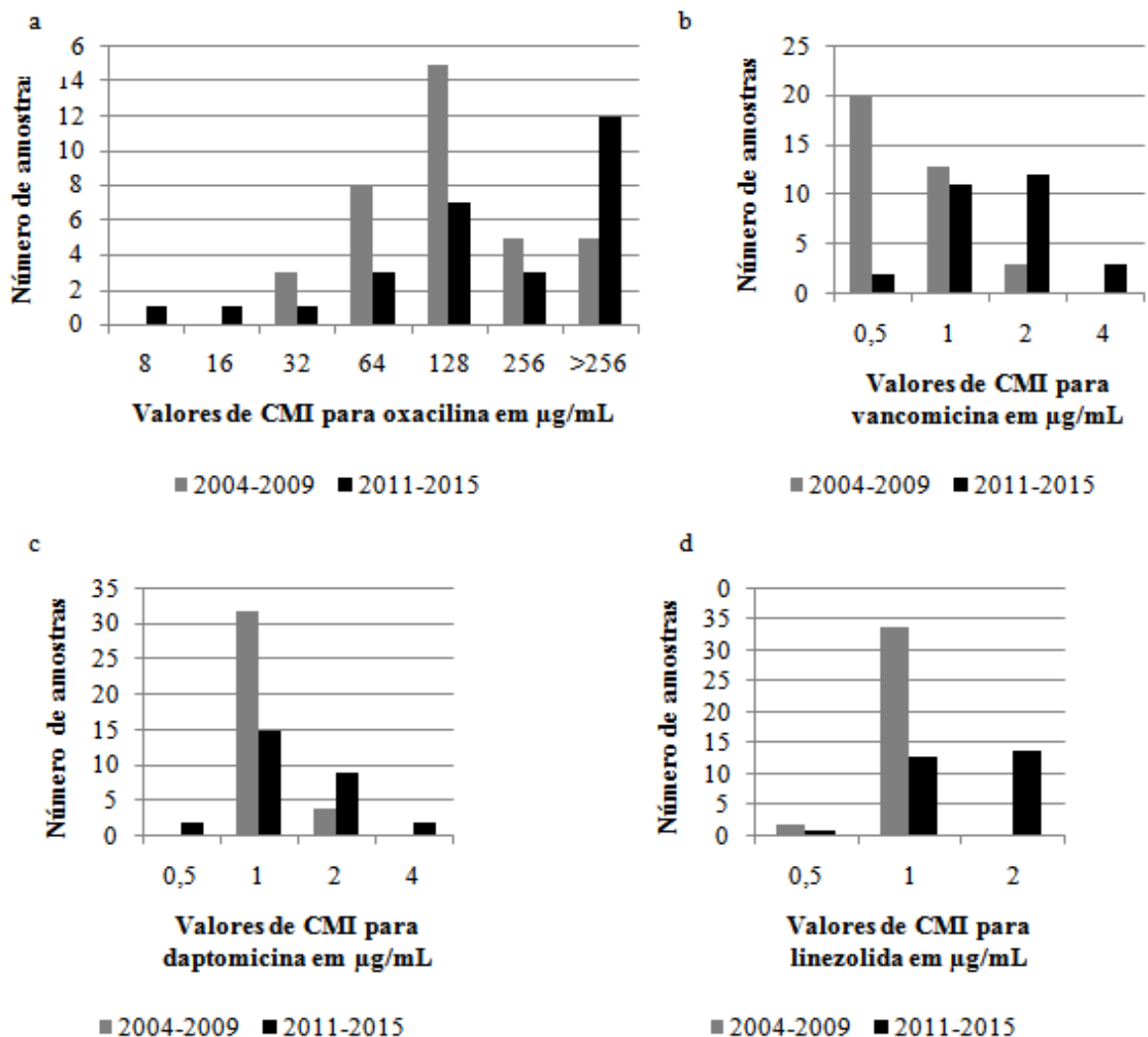


Figura 4: Distribuição de 63 amostras de *Staphylococcus aureus* USA100/ST5 por período de isolamento de acordo com os valores de concentração mínima inibitória para oxacilina (a), vancomicina (b), daptomicina (c) e linezolida (d) determinados pela técnica de microdiluição em caldo.

CMI: Concentração mínima inibitória; Pontos de corte (CLSI, 2018): Daptomicina: Sensível ≤ 1 µg/mL; Linezolida: Sensível ≤ 4 µg/mL; Oxacilina: Sensível: ≤ 2 µg/mL; Vancomicina: Sensível: ≤ 2 µg/mL; Resistência intermediária: 4 - 8 µg/mL.

Todas as amostras foram resistentes à oxacilina, apresentando CMI's superiores a 4 µg/mL. A faixa de distribuição de CMI se manteve similar entre os períodos (Tabelas 7 e 8), variando entre 16 µg/mL e >256 µg/mL. Porém, foi observado que os valores de CMI₅₀, CMI₉₀ e CMI modal foram mais elevados no período de 2011 - 2015 (256 µg/mL, >256 µg/mL e >256 µg/mL, respectivamente) do que no período de 2004 - 2009 (128 µg/mL, >256 µg/mL e 128 µg/mL, respectivamente) (Tabela 9).

Em relação à susceptibilidade à vancomicina, todas as amostras referentes ao período entre 2004 e 2009 foram sensíveis, apresentando valores de CMI menores ou iguais a 2 µg/mL (Tabela 7). Por outro lado, 3 (11%) amostras referentes aos anos de 2011 a 2015 apresentaram CMI de 4 µg/mL, sendo este valor correspondente à resistência intermediária e, conseqüentemente, ao fenótipo VISA (Tabela 8). Além disso, também foi observado aumento nos períodos avaliados das CMI₅₀ e CMI₉₀, de 0,5 e 1 µg/mL para 2 e 2 µg/mL, respectivamente, e da CMI modal de 0,5 µg/mL para 1 e 2 µg/mL (Tabela 9).

Uma vez que a daptomicina foi inserida no mercado nacional em 2009 (Simpro, 2009), foi possível comparar os valores de CMI das amostras obtidas antes e depois de sua inclusão. Embora tenham sido detectadas quatro amostras não suscetíveis à daptomicina no período anterior à sua introdução no Brasil (Tabela 7), as CMI₅₀, CMI₉₀ e CMI modal se mantiveram dentro da faixa de susceptibilidade estabelecida pelo CLSI (2018), todas correspondendo ao valor de 1 µg/mL (Tabela 9). Contudo, quase metade das amostras (11; 41%) referentes ao período posterior à introdução deste antimicrobiano na clínica foram não suscetíveis, percentual estatisticamente diferente ao primeiro período. Além disso, os valores de CMI apresentados entre 2011 e 2015 variaram de 2 a 4 µg/mL (Tabela 8). Deve-se ressaltar que 2 amostras não suscetíveis à daptomicina isoladas no período de 2011 - 2015 também apresentaram fenótipo VISA.

Para linezolid, não foram detectadas amostras resistentes em nenhum dos períodos avaliados, mas foi observado o aumento na faixa de distribuição de CMI de 0,5 a 1 µg/mL no primeiro período para 0,5 a 2 µg/mL no segundo (Tabelas 7 e 8). Também foi observado o aumento das CMI₅₀ e CMI₉₀, respectivamente, de 1 e 1 µg/mL para 1 e 2 µg/mL e da CMI modal, de 1 µg/mL para 1 e 2 µg/mL (Tabela 9).

Tabela 7: Distribuição de 36 amostras de *Staphylococcus aureus* USA100/ST5 isoladas no período de 2004 - 2009 de acordo com os valores de concentração mínima inibitória para daptomicina, linezolida, oxacilina e vancomicina determinados pela técnica de microdiluição em caldo.

Valores de CMI ^a relacionados às amostras do período de 2004 - 2009												
Antimicrobiano	n (%) de amostras											
	0,25	0,5	1	2	4	8	16	32	64	128	256	>256
Daptomicina	0 (0)	0 (0)	32 (89)	4 (11)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
Linezolida	0 (0)	2 (6)	34 (94)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
Oxacilina	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	3 (8)	8 (22)	15 (42)	5 (14)	5 (14)
Vancomicina	0 (0)	20 (56)	13 (36)	3 (8)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)

^aCMI: Concentração mínima inibitória em µg/mL.

Tabela 8: Distribuição de 27 amostras de *Staphylococcus aureus* USA100/ST5 isoladas no período de 2011 - 2015 de acordo com os valores de concentração mínima inibitória para daptomicina, linezolid, oxacilina e vancomicina determinados pela técnica de microdiluição em caldo.

Antimicrobiano	Valores de CMI ^a relacionados às amostras do período de 2011 - 2015											
	n (%) de amostras											
	0,25	0,5	1	2	4	8	16	32	64	128	256	>256
Daptomicina	0 (0)	2 (7)	14 (52)	9 (34)	2 (7)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
Linezolid	0 (0)	1 (4)	13 (48)	13 (48)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
Oxacilina	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	1 (4)	1 (4)	3 (11)	7 (26)	3 (11)	12 (44)
Vancomicina	0 (0)	2 (7)	11 (41)	11 (41)	3 (11)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)

^aCMI: Concentração mínima inibitória em µg/mL.

Tabela 9: Faixa de distribuição de concentração mínima inibitória, valores de CMI₅₀ e CMI₉₀ e percentual de resistência ou não susceptibilidade apresentados por 63 amostras de *Staphylococcus aureus* USA100/ST5 de acordo com o período de isolamento.

Antimicrobiano	2004 - 2009 (n=36)					2011 - 2015 (n=27)					Valor de <i>p</i>
	Faixa de distribuição de CMI ^a	CMI ₅₀ ^b	CMI ₉₀ ^c	CMI modal	n (%) de amostras RI ^d , R ^e ou NS ^f	Faixa de distribuição de CMI	CMI ₅₀	CMI ₉₀	CMI modal	n (%) de amostras RI, R ou NS	
Daptomicina	1 - 2	1	1	1	4 (11)	0,5 - 4	1	2	1	11 (41)	0,0083*
Linezolida	0,5 - 1	1	1	1	0 (0)	0,5 - 2	1	2	1 e 2	0 (0)	NA ^g
Oxacilina	32 - >256	128	>256	128	36 (100)	16 - >256	256	>256	>256	27 (100)	NA
Vancomicina	0,5 - 2	0,5	1	0,5	0 (0)	0,5 - 4	2	2	1 e 2	3 (11)	0,0737

^aCMI: Concentração mínima inibitória em µg/mL;

^bCMI₅₀: Valor de CMI capaz de inibir 50 % das amostras

^cCMI₉₀: Valor de CMI capaz de inibir 90 % das amostras

^dRI: Resistente intermediário

^eR: Resistente

^fNS: Não-susceptibilidade

^gNA: Não se aplica

*Valor de *p* <0,05 (estatisticamente significante).

5.4. Determinação da ação dos antimicrobianos sobre o biofilme formado

A amostra 1301a, caracterizada previamente como produtora de biofilme forte e de matriz proteica com presença de DNA extracelular, foi selecionada para avaliação da ação de daptomicina, linezolida e vancomicina sobre o biofilme previamente formado. Além de produzir uma quantidade estável de biofilme, característica pela qual foi selecionada, essa amostra é proveniente de ICS e foi coletada no ano de 2009. Ela é não suscetível à daptomicina e resistente à ciprofloxacina, clindamicina, cloranfenicol, eritromicina e penicilina. Além disso, a amostra MRSA ATCC 33591, produtora de biofilme moderado, também foi incluída na análise como controle do teste. As concentrações subinibitórias (0,25 x e 0,5 x CMI) e inibitórias (1 x e 2 x CMI) utilizadas no ensaio estão descritas na Tabela 10.

Tabela 10: Concentrações subinibitórias e inibitórias utilizadas para determinação da ação da daptomicina, linezolida e vancomicina no biofilme formado pelas amostras 1301a e ATCC 33591.

Amostra	Antimicrobiano	Valores de CMI ^a			
		0,25 x	0,5 x	1 x	2 x
1301a	Daptomicina	0,5	1	2	4
	Linezolida	0,25	0,5	1	2
	Vancomicina	0,25	0,5	1	2
ATCC ^b 33591	Daptomicina	0,25	0,5	1	2
	Linezolida	0,25	0,5	1	2
	Vancomicina	0,25	0,5	1	2

^aCMI: Concentração mínima inibitória em µg/mL; ^bATCC: *American Type Culture Collection*

Não foram observadas alterações significativas nos biofilmes formados pelas duas amostras avaliadas no ensaio, quando submetidos às diferentes concentrações testadas para vancomicina, conforme representado na Figura 5.

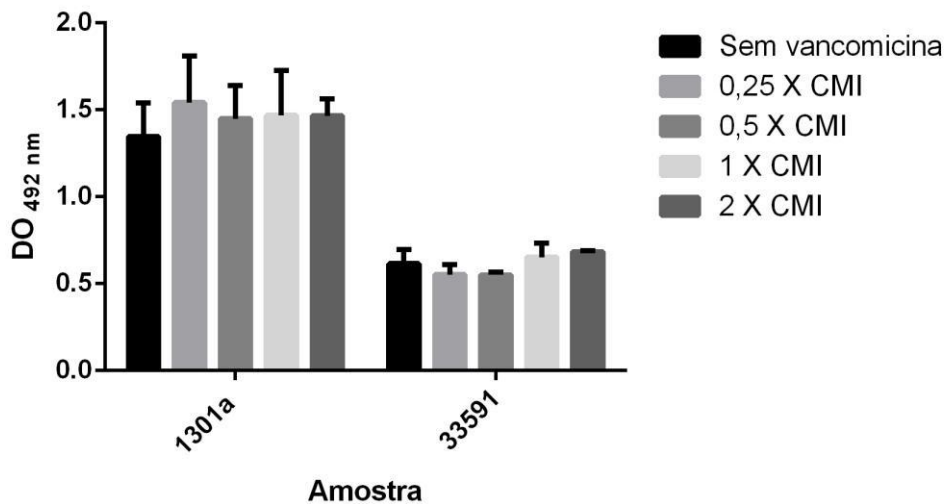


Figura 5: Avaliação do efeito de concentrações subinibitórias e inibitórias de vancomicina sobre o biofilme formado por uma amostra clínica de *Staphylococcus aureus* USA100/ST5 (1301a) e por uma amostra controle (ATCC 33591).

CMI: Concentração mínima inibitória; DO_{492 nm}: Densidade óptica a 492 nm.

Foi observado que as concentrações subinibitórias e inibitórias de daptomicina utilizadas não promoveram aumento ou redução significativos sobre o biofilme da amostra clínica selecionada (Figura 6). Em relação à amostra MRSA ATCC 33591, amostra padrão previamente caracterizada como produtora de biofilme moderado, apenas a concentração equivalente a 0,25 x CMI (sub-CMI) induziu aumento significativo na formação de biofilme ($p = 0,004$), enquanto as demais concentrações não resultaram em alteração (Figura 6).

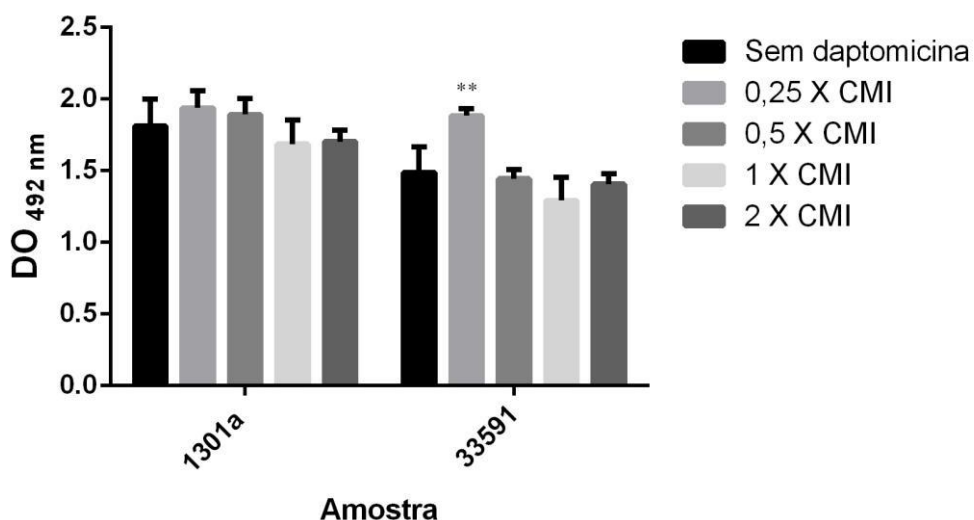


Figura 6: Avaliação do efeito de concentrações subinibitórias e inibitórias de daptomicina sobre o biofilme formado por uma amostra clínica de *Staphylococcus aureus* USA100/ST5 (1301a) e por uma amostra controle (ATCC 33591).

CMI: Concentração mínima inibitória; DO_{492 nm}: Densidade óptica a 492 nm. O símbolo ** indica valor de $p < 0,01$.

O biofilme produzido pela amostra 1301a foi significativamente reduzido quando submetido a 2 x CMI de linezolida ($p = 0,047$), enquanto as demais concentrações não induziram efeitos significativos (Figura 7). Assim como observado para daptomicina, a linezolida induziu um aumento na produção de biofilme pela amostra ATCC 33591 em concentrações de sub-CMIs, sendo este aumento significativo quando utilizada a concentração equivalente a 0,5 x CMI ($p = 0,007$) (Figura 7).

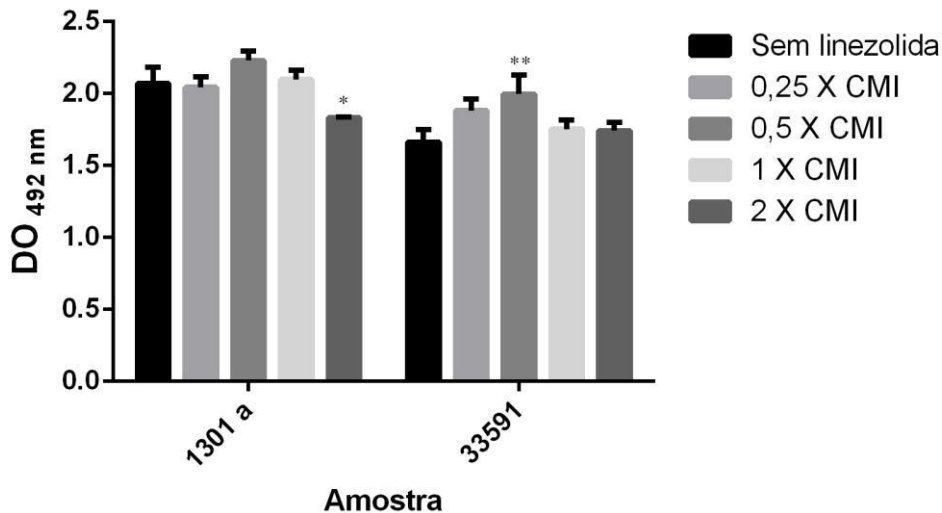


Figura 7: Avaliação do efeito de concentrações subinibitórias e inibitórias de linezolida sobre o biofilme formado por uma amostra clínica de *Staphylococcus aureus* USA100/ST5 (1301a) e por uma amostra controle (ATCC 33591).

CMI: Concentração mínima inibitória; $DO_{492\text{ nm}}$: Densidade óptica a 492 nm. Os símbolos * e ** indicam valores de $p < 0,05$ e $0,01$, respectivamente.

5.5. Determinação da CMEB

As amostras 1301a e ATCC 33591 também foram selecionadas para determinação das concentrações mínimas necessárias para erradicação do biofilme. Para realização do teste, foram selecionados os antimicrobianos aos quais a amostra clínica é considerada sensível. Portanto, nesta técnica, foram utilizadas concentrações equivalentes à 4 x, 8 x, 16 x, 32 x, 64 x e 128 x CMI de vancomicina e linezolida, cujos valores estão descritos na Tabela 11.

Tabela 11: Concentrações utilizadas para determinação das concentrações mínimas de linezolida e vancomicina necessárias para erradicação do biofilme formado pelas amostras 1301a e ATCC 33591.

Amostra	Antimicrobiano	Valores de CMI ^a					
		4 X	8 X	16 X	32 X	64 X	128 X
1301a	Linezolida	4	8	16	32	64	128
	Vancomicina	4	8	16	32	64	128
ATCC ^b 33591	Linezolida	4	8	16	32	64	128
	Vancomicina	4	8	16	32	64	128

^aCMI: Concentração mínima inibitória em µg/mL; ^bATCC: *American Type Culture Collection*

As concentrações utilizadas de ambos os antimicrobianos não foram suficientes para erradicar o biofilme de nenhuma das amostras, visto que o valor de DO obtido não foi similar ao da DO do controle negativo. Dessa forma, a CMEB para ambos os antimicrobianos pode ser interpretada como sendo >128 µg/mL. Porém, todas as concentrações testadas de linezolida reduziram significativamente o biofilme formado pela amostra clínica 1301a (valores de $p < 0,05$), sendo a concentração de 128 µg/mL (128 x CMI) capaz de reduzir aproximadamente 45% do biofilme. Concentrações maiores ou iguais a 32 µg/mL (32 x CMI) induziram alterações significativas (valores de $p < 0,05$) no biofilme formado pela ATCC 33591 (Figura 8).

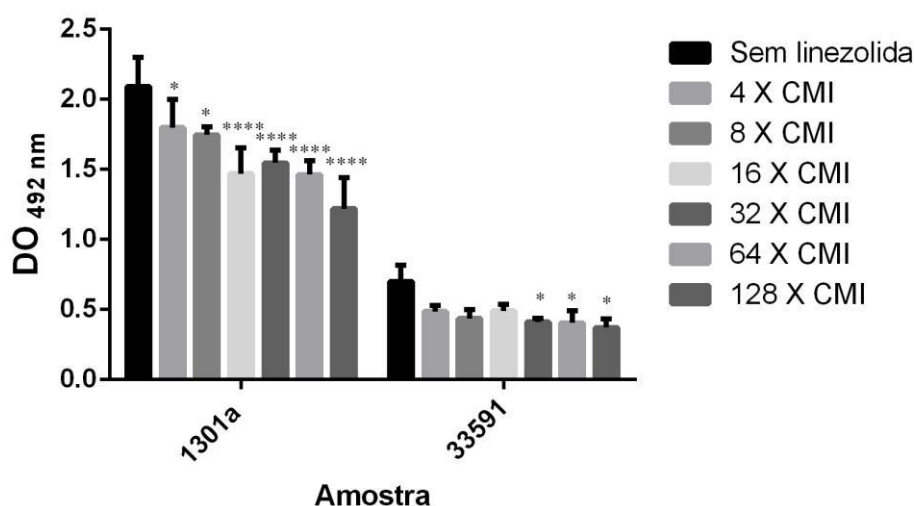


Figura 8: Avaliação do efeito de concentrações crescentes de linezolida sobre o biofilme formado por uma amostra clínica de *Staphylococcus aureus* USA100/ST5 (1301a) e por uma amostra controle (ATCC 33591).

CMI: Concentração mínima inibitória; DO_{492 nm}: Densidade óptica a 492 nm. Os símbolos * e **** indicam valores de $p < 0,05$ e 0,0001, respectivamente.

Ao utilizar a vancomicina (Figura 9), pôde-se observar a redução do biofilme formado pela amostra clínica 1301a quando exposto a concentrações maiores ou iguais a 8 x CMI, porém essa redução não foi estatisticamente significativa. Assim como observado para linezolida, o biofilme produzido pela ATCC 33591 foi reduzido significativamente (valores de $p < 0,05$) ao serem aplicadas concentrações iguais ou superiores a 32 x CMI.

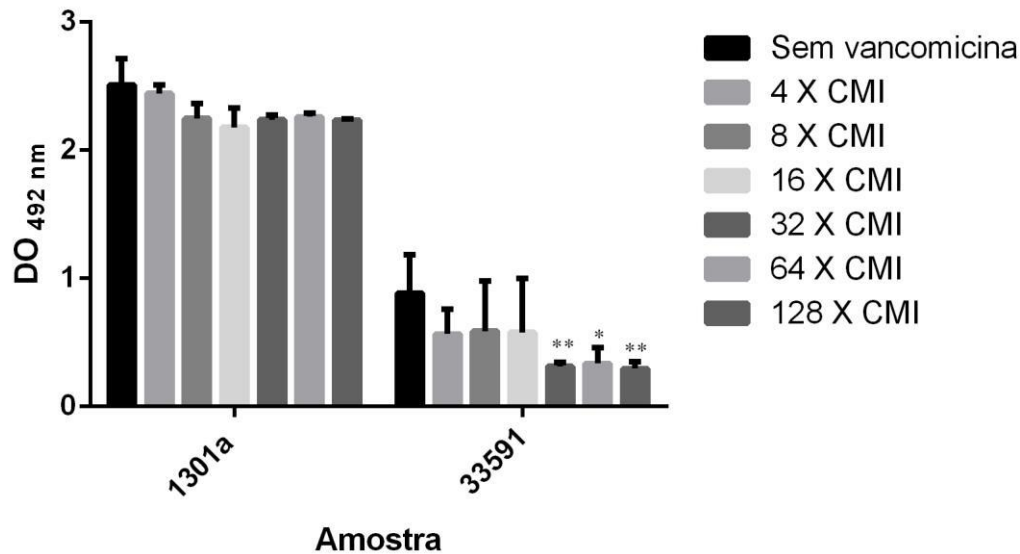


Figura 9: Avaliação do efeito de concentrações crescentes de vancomicina sobre o biofilme formado por uma amostra clínica de *Staphylococcus aureus* USA100/ST5 (1301a) e por uma amostra controle (ATCC 33591).

CMI: Concentração mínima inibitória; $DO_{492\text{ nm}}$: Densidade óptica a 492 nm. Os símbolos * e ** indicam valores de $p < 0,05$ e $0,01$, respectivamente.

6. Discussão

Staphylococcus aureus resistente à meticilina (MRSA) é um patógeno associado a IRAS, cuja prevalência de linhagens pode variar de acordo com a localização geográfica e o período avaliado (Arias *et al.*, 2017). No Brasil, enquanto a linhagem CEB/ST239 era relatada como a mais isolada na década de 90, a linhagem USA100/ST5 era amplamente isolada em hospitais nos EUA e Japão neste mesmo período (Teixeira *et al.*, 1995; Teixeira, Lourenço e Figueiredo, 1996; Hiramatsu *et al.*, 1997; Santos *et al.*, 1999; McDougal *et al.*, 2003; Ko *et al.*, 2005). Entretanto, estudos conduzidos no início dos anos 2000 mostraram a emergência de outras linhagens em hospitais brasileiros, com destaque para cepas USA100/ST5, que tem se mostrado prevalentes até hoje (Caiaffa-Filho *et al.*, 2013; Arias *et al.*, 2017; Chamon *et al.*, 2017; Damasco, 2017; Duarte *et al.*, 2018; Nascimento *et al.*, 2018). Os diferentes relatos mostram que amostras dessa linhagem apresentam resistência múltipla aos antimicrobianos, incluindo fármacos utilizados na terapêutica de ICS, como vancomicina e daptomicina (da Costa *et al.*, 2016; Chamon *et al.*, 2017), e também são capazes de produzir biofilme, fator que pode levar à falha terapêutica (Souza *et al.*, 2009; Baldan *et al.*, 2012; Vanhommerig *et al.*, 2014; Côrtes *et al.*, 2015; Batistão *et al.*, 2016; King *et al.*, 2016; Guimarães, 2018). Pelo fato de termos uma coleção de amostras MRSA USA100/ST5 obtidas ao longo de cerca de dez anos, o presente estudo buscou avaliar aspectos relacionados à resistência antimicrobiana em células planctônicas e do biofilme em 63 amostras desta linhagem.

A resistência aos β -lactâmicos apresentada por cepas MRSA pode limitar o tratamento de infecções causadas por estas amostras (Peacock e Paterson, 2015). Desta forma, a fim de reduzir o risco de falha terapêutica, o conhecimento do perfil de susceptibilidade a antimicrobianos de diferentes classes utilizados na clínica médica se torna relevante. De acordo com a padronização de testes de sensibilidade a antimicrobianos estabelecida pelo CLSI, amostras HA-MRSA, geralmente, podem apresentar resistência múltipla aos antimicrobianos. Ainda que nenhuma das amostras avaliadas no estudo tenha sido resistente a todos os antimicrobianos no teste de disco-difusão, todas as amostras, além de resistentes a oxacilina e penicilina (β -lactâmicos), foram resistentes à clindamicina (lincosamida), ciprofloxacina (fluoroquinolona) e eritromicina (macrolídeo), caracterizando-as como multirresistentes. A resistência a esses antimicrobianos já foi relatada como associada à linhagem USA100/ST5 (McDougal *et al.*, 2003; Klevens *et al.*, 2006). Por outro lado, no presente estudo, todas as amostras foram sensíveis à tetraciclina e à combinação de sulfametoxazol e trimetoprim. A sensibilidade a esses antimicrobianos é, geralmente,

observada em amostras carreadoras de SCCmec IV, podendo ser utilizada como marcador para amostras CA-MRSA (Cavalcante *et al.*, 2013). Contudo, a sensibilidade à tetraciclina e à combinação de sulfametoxazol e trimetoprim encontrada em amostras MRSA USA100/ST5, carreadoras de SCCmec II, neste estudo, indica uma mudança no perfil de susceptibilidade a estes antimicrobianos, sugerindo que a triagem com este fármaco não deva mais ser utilizada na clínica como sugestiva de amostras com SCCmec tipo IV.

Alguns estudos brasileiros observaram um padrão de resistência semelhante ao observado no presente trabalho (Caboclo *et al.*, 2013; Caiaffa-Filho *et al.*, 2013; Dabul e Camargo, 2014; Chamon *et al.*, 2017; Duarte *et al.*, 2018a; Duarte *et al.*, 2018b). Duarte e colaboradores (2018a), por exemplo, ao avaliarem o perfil de susceptibilidade de 59 amostras MRSA isoladas de infecção do trato respiratório e ICS entre 2015 e 2016, no Paraná, observaram que 23 (39%) foram SCCmec II/CC5, sendo todas resistentes à clindamicina, ciprofloxacina e eritromicina ao mesmo tempo em que foram sensíveis à rifampicina e sulfametoxazol-trimetoprim, com baixo percentual de resistência à gentamicina. Em outro estudo conduzido pelo mesmo grupo (Duarte *et al.*, 2018b), no mesmo hospital, foi avaliado o perfil de susceptibilidade aos antimicrobianos de 720 amostras de *S. aureus* coletadas de ICS ao longo de 15 anos (2001 - 2015). A taxa de resistência à rifampicina observada pelos autores foi similar ao apresentado neste estudo, com diminuição ao longo dos anos. Por outro lado, os autores descreveram um aumento nas taxas de resistência à clindamicina, ciprofloxacina e eritromicina (Duarte *et al.*, 2018b). No presente estudo, todas as amostras se mostraram resistentes a esses três antimicrobianos no período avaliado. No mesmo estudo citado anteriormente, o grupo também observou uma redução da taxa de resistência à gentamicina (Duarte *et al.*, 2018b), enquanto o presente estudo observou seu aumento ao longo dos anos. Contudo, os perfis de susceptibilidade observados por esses grupos, semelhantes aos de amostras isoladas no Rio de Janeiro, sugerem que cepas da linhagem USA100/ST5, que vem prevalecendo na clínica em diferentes Estados do país, podem apresentar um perfil de susceptibilidade antimicrobiano característico, prevalecendo a multirresistência entre elas.

Ao comparar o perfil de susceptibilidade das amostras utilizadas neste trabalho com as 25 amostras USA100/ST5 estudadas por Gandara e colaboradores nos EUA (2016), entre os anos de 1996 e 2014, foi observada uma similaridade entre os perfis de resistência em ambos os estudos. Este grupo observou altas taxas de resistência a ciprofloxacina (23; 92%), clindamicina (21; 84%) e eritromicina (23; 92%), e baixos índices para gentamicina (2; 8%), rifampicina (2; 8%) e sulfametoxazol-trimetoprim (3; 12%), além de observarem que todas as

amostras estudadas foram sensíveis à tetraciclina (Gandara *et al.*, 2016). Isso pode indicar que esse perfil de susceptibilidade em amostras USA100/ST5 esteja presente não apenas no Brasil, mas também em outros países, podendo ser uma característica comum à esta linhagem.

Como a maioria (83%) das amostras utilizadas no estudo foi proveniente de ICS, foram determinadas as CMI's para oxacilina, vancomicina, daptomicina e linezolida, antimicrobianos de escolha no tratamento de ICS (Gardete e Tomasz, 2014; Gudiol *et al.*, 2017). Todas as amostras selecionadas para o estudo já haviam sido previamente caracterizadas como MRSA, de forma que valores de CMI para oxacilina iguais ou superiores a 4 µg/mL eram esperados. Entretanto, foram observadas CMI₅₀ e CMI₉₀ altas em ambos os períodos avaliados, entre 128 µg/mL e >256 µg/mL. Além disso, a CMI modal para oxacilina das amostras do período entre 2011 e 2015 (>256 µg/mL) foi maior que a do primeiro período (128 µg/mL). Esse resultado mostra que, apesar de todas as amostras do estudo serem resistentes à oxacilina, nos últimos anos um número maior de amostras tem sido capaz de resistir a maiores concentrações do antimicrobiano.

Um aumento dos valores de CMI para linezolida e vancomicina foi observado ao longo de todo o período estudado, embora estes valores não tenham ultrapassado o limite de sensibilidade estabelecido pelo CLSI (2018). Porém, deve-se ressaltar que no período entre 2011 e 2015 foram detectadas três amostras VISA. Nascimento e colaboradores (2018), ao avaliarem as características de resistência de 45 amostras MRSA isoladas entre 2005 e 2010 em uma UTI de Minas Gerais, constataram que todas as amostras, incluindo 8 caracterizadas como USA100/ST5, eram sensíveis à linezolida e vancomicina, o que se assemelha ao encontrado no presente estudo. Entretanto, esse grupo não detectou amostras VISA. Resultados semelhantes foram encontrados por Caiaffa-Filho e colaboradores (2013), em que todas as 30 amostras carreadoras de SCC_{mec} II avaliadas, coletadas no ano de 2010 em São Paulo, foram sensíveis à linezolida e vancomicina. Por outro lado, das 24 amostras SCC_{mec} II avaliadas no estudo de Bodnar e colaboradores (2016) isoladas em 2010, no Paraná, 9 (38%) apresentaram resistência intermediária à vancomicina. Duarte e colaboradores (2018b), também no Paraná, ao avaliarem 174 amostras de *S. aureus* entre 2010 e 2015 verificaram que 49 (29%) apresentavam resistência intermediária à vancomicina, enquanto outro estudo conduzido pelo mesmo grupo, entre 2015 e 2016, não detectou o fenótipo VISA entre as 59 amostras MRSA isoladas (Duarte *et al.*, 2018a). Portanto, embora amostras MRSA USA100/ST5 isoladas no Brasil tendam a ser sensíveis à vancomicina e linezolida (Caiaffa-Filho *et al.*, 2013; Dabul e Camargo, 2014; Bodnar *et al.*, 2016; Nascimento *et al.*, 2018; Okado *et al.*, 2018), o aumento nos valores de CMI₅₀ e CMI₉₀ ao longo dos anos e a detecção

de amostras VISA observados no presente trabalho e por outros autores demonstram a importância do monitoramento contínuo do perfil de susceptibilidade a estes antimicrobianos.

Com relação às CMI₉₀ de daptomicina, o presente estudo observou um aumento no percentual de não-susceptibilidade entre as amostras avaliadas durante o período estudado. Além do aumento no número de amostras não-suscetíveis à daptomicina, também foi observado aumento na CMI₉₀ de 1 µg/mL, no primeiro período, para 2 µg/mL, no segundo período. Em um estudo conduzido por Dabul e Camargo (2014), das 36 amostras MRSA coletadas de colonização e infecção de pacientes de uma UTI, no ano de 2009, em São Paulo, 12 (33%) pertenciam à linhagem USA100/ST5. Dessas, duas amostras (17%) foram não suscetíveis à daptomicina. Esse dado corrobora com o período semelhante do presente estudo, entre 2004 e 2009, em que 4 (11%) das amostras foram não suscetíveis à daptomicina, período este em que o antimicrobiano ainda não era amplamente utilizado. Contudo, no segundo período do estudo, entre 2011 e 2015, foi observada uma alta taxa de amostras USA100/ST5 não suscetíveis à daptomicina (11 amostras; 41%). Apesar de ter sido relatado pelo nosso grupo a ocorrência de uma amostra USA100/ST5 não suscetível à daptomicina em um caso de endocardite em 2014 (Cavalcante *et al.*, 2014), o alto percentual de resistência observado nesse estudo entre amostras desta linhagem não tem sido relatado no Brasil, e foi demonstrado pelo nosso grupo no estudo prévio realizado por Damasco (2017), quando foram analisadas 200 amostras isoladas de ICS em um hospital do Rio de Janeiro. A daptomicina é uma das principais opções para o tratamento de infecções causadas por amostras MRSA com susceptibilidade reduzida à vancomicina (Gudiol *et al.*, 2017), destacando a importância da vigilância contínua da susceptibilidade a este fármaco.

Além da capacidade de adquirir resistência a diferentes classes de antimicrobianos, infecções por MRSA podem ser agravadas pela capacidade das cepas de formar biofilme (Høiby *et al.*, 2010; Zapotoczna, O'Neil e O'Gara, 2016). Alguns estudos apontam que a exposição do biofilme a concentrações subinibitórias de antimicrobianos pode levar a estímulos que culminam em aumento da acumulação do mesmo (Frank *et al.*, 2007; Mirani e Jamil, 2011; Kaplan *et al.*, 2012). Nesse contexto, o presente estudo avaliou o efeito de concentrações subinibitórias e inibitórias de daptomicina, linezolid e vancomicina sobre o biofilme formado por uma amostra clínica USA100/ST5 (1301a) classificada como fortemente produtora e uma amostra MRSA de SCC_{mec} III (ATCC 33591) produtora de biofilme moderado.

Ao avaliar o efeito da daptomicina sobre o biofilme formado pela amostra 1301a, não foi possível observar alteração na produção de biofilme, enquanto um aumento expressivo do

biofilme formado pela amostra ATCC 33591 foi observado na presença do antimicrobiano em 0,5 x CMI. Um padrão semelhante ao da amostra padrão neste estudo foi observado por Bauer e colaboradores (2013), que constataram que a exposição das células do biofilme da amostra ATCC 33591 a sub-CMIs de daptomicina culminava em aumento na produção deste fator de virulência. Esse mesmo grupo também observou que a daptomicina induzia a dispersão do biofilme a partir de 2 x CMI nessa amostra (Bauer *et al.*, 2013). Entretanto, o presente estudo observou que a mesma concentração (2 x CMI) de daptomicina não induziu alterações significativas sobre o biofilme formado pelas amostras avaliadas.

Com relação à linezolida, a concentração equivalente à 0,5 x CMI foi capaz de estimular maior produção de biofilme pela amostra ATCC 33591, enquanto que a concentração de 2 x CMI foi capaz de reduzir significativamente o biofilme formado pela amostra clínica 1301a. Por outro lado, nenhuma das concentrações utilizadas de vancomicina foi capaz de causar alterações significativas sobre o biofilme formado entre as amostras avaliadas. Estudos que avaliaram o efeito de concentrações subinibitórias e inibitórias de vancomicina e linezolida sobre o biofilme formado por amostras MRSA também observaram pouca ou nenhuma alteração na produção de biofilme quando submetidos às concentrações de 0,25 x a 1 x CMI (Mirani e Jamil, 2011; Bauer *et al.*, 2013; Chamon, 2017; Yang *et al.*, 2018). Porém, diferente do observado neste estudo, Bauer e colaboradores (2013) relataram diminuição de cerca de 50% do biofilme quando utilizadas concentrações maiores que 2 x CMI de vancomicina, mas não observaram redução do biofilme quando este foi submetido à 2 x CMI de linezolida. Ao avaliar o efeito de sub-CMIs (0,25 x e 0,5 x CMI) de vancomicina e linezolida sobre o biofilme previamente formado por diferentes linhagens MRSA, Chamon (2017) observou que amostras de diferentes linhagens, assim como amostras da mesma linhagem, apresentaram perfis diferentes diante da exposição aos antimicrobianos. Portanto, é possível que os efeitos observados em amostras MRSA em geral sejam cepa-dependente e não se apliquem a todas as amostras.

A formação de biofilme é uma condição que dificulta a ação de antimicrobianos e pode levar à persistência do processo infeccioso (Høiby *et al.*, 2010; Zapotoczna, O'Neil e O'Gara, 2016). Com base nisso, o estudo utilizou as amostras 1301a e ATCC 33591 para determinar a CMEB das mesmas. Nenhuma das concentrações utilizadas no estudo, até 128 x CMI, foi capaz de erradicar o biofilme das amostras avaliadas, podendo-se presumir que as CMEBs para linezolida e vancomicina sejam >128 µg/mL. Contudo, todas as concentrações de linezolida utilizadas foram capazes de reduzir significativamente o biofilme formado pela amostra 1301a, enquanto nenhuma das concentrações de vancomicina foi capaz de reduzir

significativamente o biofilme formado por esta amostra produtora de biofilme forte. Por outro lado, concentrações iguais ou maiores a 32 x CMI de cada antimicrobiano foram capazes de reduzir o biofilme formado pela ATCC 33591, amostra produtora de biofilme moderado. A baixa eficácia da vancomicina em eliminar células sésseis pode ser atribuída à sua lenta penetração na matriz do biofilme (Jefferson, Goldmann e Pier, 2005; Singh *et al.*, 2010). Uma possível explicação para essa baixa penetração poderia estar relacionada com o fato de a vancomicina ser uma molécula grande (1449.265 g/mol). Isso também poderia justificar a melhor atuação da linezolida sobre o biofilme, visto que o menor tamanho da molécula (337.351 g/mol) poderia contribuir para sua passagem pela matriz. Além disso, estudos relatam que o biofilme formado por amostras MRSA possui matriz majoritariamente protéica (Beeken *et al.*, 2004; Fitzpatrick, Humphreys e O’Gara, 2005; O’Neil *et al.*, 2007; Martí *et al.*, 2010; Pozzi *et al.*, 2012), fato este que também poderia explicar a melhor atuação da linezolida na dispersão do biofilme formado pelas amostras MRSA investigadas, uma vez que ao inibir a síntese proteica, interromperia a síntese da matriz do biofilme dessas amostras.

Diversos estudos relatam que altas concentrações de linezolida ou vancomicina são necessárias para erradicar o biofilme formado por *S. aureus*, mesmo em casos onde a amostra é sensível a estes antimicrobianos, o que corrobora com os resultados obtidos neste trabalho (Raad *et al.*, 2007; Rose e Poppens, 2009; Antunes *et al.*, 2011; Cha *et al.*, 2011; Reiter *et al.*, 2012; Dosler e Mataraci, 2013; Dall *et al.*, 2018). Entretanto, o uso dessas concentrações na clínica se torna inviável devido à toxicidade. Para vancomicina, as dosagens terapêuticas utilizadas resultam em concentrações séricas de até 50 µg/mL (após a infusão) e de até 15 µg/mL (quando em equilíbrio), sendo concentrações superiores a esta associadas à toxicidade (Eurofarma Laboratórios S.A., 2014). A dose de linezolida frequentemente administrada em adultos é de 2 mg/mL, porém já foram relatados casos de efeitos tóxicos em pacientes submetidos a esta concentração (Eurofarma Laboratórios S.A., 2015). Dessa forma, os resultados do presente estudo demonstram que classificar uma amostra como sensível à linezolida e vancomicina por testes *in vitro* nem sempre significa o sucesso do tratamento, uma vez que a utilização destes antimicrobianos pode ser inviável contra infecções associadas a biofilme.

Considerando que a epidemiologia das infecções por amostras MRSA tem sofrido alterações ao longo dos anos, com linhagens prevalentes se alternando nos ambientes hospitalares, é relevante que sejam estudadas as características apresentadas por estas linhagens emergentes. Os resultados obtidos neste estudo relatam aumento na resistência aos antimicrobianos entre amostras da linhagem USA100/ST5, emergente em hospitais do Rio de

Janeiro. O estudo também mostra a capacidade dessas amostras em formar biofilme, podendo contribuir para sua persistência frente ao uso de antimicrobianos utilizados para tratamento de infecções por MRSA. Esses resultados sugerem que as taxas de resistência, as terapias antimicrobianas e suas respectivas dosagens sejam monitoradas continuamente nas instituições estudadas para prevenir a aquisição de novos mecanismos de resistência por amostras da linhagem USA100/ST5 que possuem tendência a multirresistência.

7. Conclusões

- Todas as 63 amostras USA100/ST5 avaliadas no estudo foram multirresistentes.
- O perfil de susceptibilidade das amostras se manteve entre os períodos avaliados. Todas foram resistentes à ciprofloxacina, clindamicina e eritromicina, e sensíveis à sulfametoxazol-trimetoprim e tetraciclina. Os percentuais de resistência à cloranfenicol, gentamicina e rifampicina permaneceram baixos e não apresentaram diferenças estatísticas entre os períodos avaliados;
- Das 63 amostras avaliadas no estudo, 24% foram não suscetíveis à daptomicina. O percentual de amostras não suscetíveis aumentou de 11% no período entre 2004 e 2009 para 41% entre 2011 e 2015, embora a CMI modal tenha permanecido 1 µg/mL;
- O percentual de resistência à linezolida se manteve nulo em ambos os períodos, mas a CMI modal aumentou de 1 µg/mL no período entre 2004 e 2009 para 1 e 2 µg/mL entre 2011 e 2015;
- Enquanto no período entre 2004 e 2009 todas as amostras foram sensíveis à vancomicina, com CMI₉₀ igual a 1 µg/mL, entre 2011 e 2015, 11% das amostras foram resistentes intermediárias, com CMI₅₀ e CMI₉₀ no limite da faixa de sensibilidade (2 µg/mL);
- Concentrações subinibitórias de daptomicina, linezolida e vancomicina não foram capazes de induzir significativamente dispersão ou acumulação de biofilme em uma amostra clínica de *S. aureus* USA100/ST5;
- Concentrações inibitórias múltiplas da CMI para linezolida diminuíram significativamente o biofilme formado por uma amostra clínica de *S. aureus* USA100/ST5, embora sua CMEB tenha sido >128 µg/mL;
- As concentrações inibitórias múltiplas da CMI para vancomicina utilizadas não foram capazes de diminuir o biofilme formado por uma amostra clínica de *S. aureus* USA100/ST5 (CMEB >128 µg/mL).

8. Referências Bibliográficas

- ANVISA (2018). Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Disponível em: http://www.anvisa.gov.br/servicos/controle/rede_rm/cursos/rm_controle/opas_web/modulo1/glicopepticope.htm. Acesso em 26/4/2018.
- Aguayo-Reyes, A., Quezada-Aguiluz, M., Mella, S., Riedel, G., Opazo-Capurro, A., Bello-Toledo, H., Domínguez, M. e González-Rocha, G. (2018). Bases moleculares de la resistencia a meticilina en *Staphylococcus aureus*. Rev. Chilena Infectol. 35, 7-14.
- Andersson, D.I. e Hughes, D. (2014). Microbiological effects of sublethal levels of antibiotics. Nat. Rev. Microbiol. 12, 465-78.
- Antonelli, A., D'Andrea, M.M., Brenciani, A., Galeotti, C.L., Morroni, G., Pollini, S., Varaldo, P.E. e Rossolini, G.M. (2018). Characterization of *poxtA*, a novel phenicol-oxazolidinone-tetracycline resistance gene from an MRSA of clinical origin. J. Antimicrob. Chemother. 73, 1763-1769.
- Antunes, A.L.S., Bonfanti, J.W., Perez, L.R.R., Pinto, C.C.F., Freitas, A.L.P., Macedo, A.J. e Barth, A.L. (2011). High vancomycin resistance among biofilms produced by *Staphylococcus* species isolated from central venous catheters. Mem. Inst. Oswaldo Cruz. 106, 51-55.
- Archer, N.K., Mazaitis, M.J., Costerton, J.W., Leid, J.G., Powers, M.E. e Shirtliff, M.E. (2011). *Staphylococcus aureus* biofilms: Properties, regulation and roles in human disease. Virulence 2, 445-459.
- Arias, C.A., Reyes, J., Carvajal, L.O., Rincon, S., Diaz, L., Panesso, D., Ibarra, G., Rios, R., Munita, J.M., Salles, M.J., Alvarez-Moreno, C., Labarca, J., Garcia, C., Luna, C.M., Mejia-Villatoro, C., Zurita, J., Guzman-Blanco, M., Rodriguez-Noriega, E., Narechania, A., Rojas, L.J., Planet, P.J., Weinstock, G.M., Gotuzzo, E. e Seag, C. (2017). A Prospective Cohort Multicenter Study of Molecular Epidemiology and Phylogenomics of *Staphylococcus aureus* Bacteremia in Nine Latin American Countries. Antimicrob. Agents Chemother. 61, e00816-17.
- Baldan, R., Testa, F., Lorè, N.I., Bragonzi, A., Cichero, P., Ossi, C., Biancardi, A., Nizzero, P., Moro, M., e Cirillo, D.M. (2012). Factors contributing to epidemic MRSA clones replacement in a hospital setting. PLoS One. 8, e43153.
- Ballhausen, B., Kriegeskorte, A., Schleimer, N., Peters, G. e Becker, K. (2014). The *mecA* homolog *mecC* confers resistance against β -Lactams in *Staphylococcus aureus* irrespective of the genetic strain background. Antimicrob. Agents Chemother. 58, 3791-3798.
- Bannerman, T.L. e Peacock, S.J. (2007). *Staphylococcus*, *Micrococcus*, and other catalase-positive cocci. In: Manual of Clinical Microbiology – 9th edition. Murray, P.R., Baron, E.J., Jorgensen, J.H., Landry, M.J. e Tenover, F.C., eds. (Washington: ASM Press), pp. 390-410.
- Batistão D.W., Campos, P.A., Camilo, N.C., Royer, S., Araujo, B.F., Naves, K.S., Martins, M., Pereira, M.O., Henriques, M., Gontijo-Filho, P.P., Botelho, C., Oliveira, R., e Ribas, R.M. (2016). Biofilm formation of Brazilian MRSA strains: prevalence of biofilm determinants and clonal profiles. J. Med. Microbiol. Epub ahead of print.
- Bauer, J., Siala, W., Tulkens, P.M. e Van Bambeke, F. (2013). A Combined Pharmacodynamic Quantitative and Qualitative Model Reveals the Potent Activity of Daptomycin and Delafloxacin against *Staphylococcus aureus* Biofilms. Antimicrob. Agents Chemother. 57, 2726-2737.
- Bayer, A.S., Mishra, N.N., Chen, L., Kreiswirth, B.N., Rubio, A. e Yang, S. (2015). Frequency and distribution of single-nucleotide polymorphisms within *mprF* in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clinical isolates and their role in cross-resistance to daptomycin and host defense antimicrobial peptides. Antimicrob. Agents Chemother. 59, 4930-4937.
- Becker, K., van Alen, S., Idelevich, E.A., Schleimer, N., Seggewiß, J., Mellmann, A., Kaspar, U. e Peters, G. (2018). Plasmid-encoded transferable *mecB*-mediated methicillin resistance in *Staphylococcus aureus*. Emerg. Infect. Dis. 24, 242-248.
- Birmingham, M.C., Rayner, C.R., Meagher, A.K., Flavin, S.M., Batts, D.H. e Schentag, J.J. (2003). Linezolid for the treatment of multidrug-resistant, Gram-Positive infections: Experience from a compassionate-use program. Clin. Infect. Dis. 36, 159-168.

- Bodnar, G.C., Martins, H.M., de Oliveira, C.F., Morey, A.T., Tavares, E.R., Cardoso, J.D., Perugini, M.R.E., Lioni, L.M.Y., Yamada-Ogatta, S.F., Kobayashi, R.K.T. e Nakazato, G. (2016). Comparison of HRM analysis and three REP-PCR genomic fingerprint methods for rapid typing of MRSA at a Brazilian hospital. *J. Infect. Dev. Ctries.* 10, 1306-1317.
- Bozdogan, B. e Appelbaum, P.C. (2004). Oxazolidinones: activity, mode of action, and mechanism of resistance. *Int. J. Antimicrob. Agents* 23, 113-119.
- Bruniera, F.R., Ferreira, F.M., Saviolli, L.R.M., Bacci, M.R., Feder, D., Pedreira, M.L.G., Peterlini, M.A.S., Azzalis, L.A., Junqueira, V.B.C. e Fonseca F.L.A. (2015). The use of vancomycin with its therapeutic and adverse effects: a review. *Eur. Rev. Med. Pharmacol. Sci.* 19, 694-700.
- Caboclo, R.M.F., Cavalcante, F.S., Iorio, N.L.P., Schuenck, R.P., Olendzki, A.N., Felix, M.J., Chamon, R.C. e dos Santos, K.R.N. (2013). Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in Rio de Janeiro hospitals: Dissemination of the USA400/ST1 and USA800/ST5 SCCmec type IV and USA100/ST5 SCCmec type II lineages in a public institution and polyclonal presence in a private one. *Am. J. Infect. Control* 41, e21-26.
- Caiaffa-Filho, H.H., Trindade, P.A., da Cunha, P.G., Alencar, C.S., Prado, G.V.B., Rossi, F. e Levin, A.S. (2013). Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* carrying SCCmec type II was more frequent than the Brazilian endemic clone as a cause of nosocomial bacteremia. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* 76, 518-520.
- Casanova, N.G., Ruiz, M.S. e Bellido, J.L.M. (2017). Mechanisms of resistance to daptomycin in *Staphylococcus aureus*. *Rev. Esp. Quimioter.* 30, 391-396.
- Cavalcante, F.S., Ferreira, D.C., Chamon, R.C., da Costa, T.M., Maia, F., Barros, E.M., Dantas, T.S. e dos Santos, K.R.N. (2014). Daptomycin and methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolated from a catheter-related bloodstream infection: a case report. *BMC Res. Notes* 7, 59.
- Cha, J.O., Park, T.K., Lee, Y.S. e Chung, G.T. (2011). In vitro biofilm formation and bactericidal activities of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clones prevalent in Korea. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* 70, 112-118.
- Cha, J.O., Yoo, J.I., Yoo, J.S., Chung, H.S., Park, S.H., Kim, H.S., Lee, Y.S., e Chung, G.T. (2013). Investigation of biofilm formation and its association with the molecular and clinical characteristics of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Osong Public Health Res. Perspect.* 4, 225-232.
- Chambers, H.F. e DeLeo, F.R. (2009). Waves of Resistance: *Staphylococcus aureus* in the Antibiotic Era. *Nat. Rev. Microbiol.* 7, 629-641.
- Chamon, R.C., Ribeiro, S.S., da Costa, T.M., Nouér, S.A. e dos Santos, K.R.N. (2017). Complete substitution of the Brazilian endemic clone by other methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* lineages in two public hospitals in Rio de Janeiro, Brazil. *Braz. J. Infect. Dis.* 21, 185-189.
- Chen, C.J., Huang, Y.C. e Chiu, C.H. (2015). Multiple pathways of cross-resistance to glycopeptides and daptomycin in persistent MRSA bacteraemia. *J. Antimicrob. Chemother.* 70, 2965-2972.
- CLSI - Clinical and Laboratory Standards Institute (2018). Performance standards for antimicrobial susceptibility testing M100. Wayne, Pennsylvania, USA.
- Côrtes, M.F., Beltrame, C.O., Ramundo, M.S., Ferreira, F.A., e Figueiredo, A.M. (2015). The influence of different factors including *fnbA* and *mecA* expression on biofilm formed by MRSA clinical isolates with different genetic backgrounds. *Int. J. Med. Microbiol.* 305, 140-147.
- Costa, A.C., Silva, M.G. e Noriega, E. (2007). Manual de operacionalização do Programa Nacional de Prevenção e Controlo da Infecção Associada aos Cuidados de Saúde. Ministério da Saúde, Portugal. Disponível em <http://www.arslvt.min-saude.pt>.
- Cuny, C., Wieler, L.H. e Witte, W. (2015). Livestock-associated MRSA: the impact on humans. *Antibiotics* 4, 521-543.
- da Costa, T.M., Morgado, P.G.M., Cavalcantes, F.S., Damasco, A.P., Nouér, S.A. e dos Santos, K.R.N. (2016). Clinical and microbiological characteristics of heteroresistant and vancomycin-intermediate *Staphylococcus aureus* from bloodstream infections in a Brazilian teaching hospital. *PLoS One* 11, e0160506.
- Dabul, A. N. G. e Camargo, I. L. B. C. (2014). Molecular characterization of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* resistant to tigecycline and daptomycin isolated from a hospital in Brazil. *Epidemiol Infect.* 142, 479-483.

- Dall G.F., Tsang, S.T.J., Gwynne, P.J., MacKenzie, S.P., Simpson, A.H.R.W., Breusch, S.J. e Gallagher, M.P. (2018). Unexpected synergistic and antagonistic antibiotic activity against *Staphylococcus biofilms*. J. Antimicrob. Chemother., *Epub ahead of print*.
- Damasco, A.P. (2017). *Staphylococcus aureus* isolados de infecção da corrente sanguínea em um hospital universitário do Rio de Janeiro entre 2011 e 2015: análise fenotípica e genotípica da resistência aos antimicrobianos e clonalidade. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Médica) – Instituto de Microbiologia Paulo de Góes, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 82 f.
- Davies, D. (2003). Understanding biofilm resistance to antibacterial agents. Nat. Rev. Drug Discov. 2, 114-122.
- Dehority, W. (2010). Use of Vancomycin in Pediatrics. Pediatr. Infect. Dis. J. 29, 462–464.
- Donlan, R.M. e Costerton, J.W. (2002). Biofilms: survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. Clin. Microbiol. Rev. 15, 167-193.
- Dosler, S. e Mataraci, E. (2013). In vitro pharmacokinetics of antimicrobial cationic peptides alone and in combination with antibiotics against methicillin resistant *Staphylococcus aureus* biofilms. Peptides 49, 53-58.
- Duarte, F.C., Tavares, E.R., Danelli, T., Alice, M., Ribeiro, G., Yamauchi, L.M., Yamada-Ogatta, S.F. e Perugini, M.R.E. (2018a). Disseminated Clonal Complex 5 (CC5) methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* SCCmec type II in a tertiary hospital of Southern Brazil. Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo 60, e32.
- Duarte, F.C., Danelli, T., Ribeiro, M.A.G., Perugini, L.F., Vespero, E.C., Carrara-Marroni, F.E., Pelisson, M., Yamauchi, L.M., Yamada-Ogatta e S.F., Perugini, M.R.E. (2018b). Bacteremia causada por *Staphylococcus aureus*: Uma análise de quinze anos da sensibilidade a antimicrobianos em um hospital terciário do Brasil. R. Epidemiol. Control. Infec. 8, 232-238.
- Enright, M.C., Day, N.P.J., Davies, C.E., Peacock, S.J. e Spratt, B.G. (2000). Multilocus sequence typing for characterization of methicillin-resistant and methicillin-susceptible clones of *Staphylococcus aureus*. J. Clin. Microbiol. 38, 1008-1015.
- Ernst, C.M., Staubitz, P., Mishra, N.N., Yang, S., Hornig, G., Kalbacher, H., Bayer, A.S., Kraus, D. e Peschel, A. (2009). The bacterial defensin resistance protein MprF consists of separable domains for lipid lysinylation and antimicrobial peptide repulsion. PLoS Pathog. 5, e1000660.
- Flemming, H.C. e Wingender, J. (2010). The biofilm matrix. Nat. Rev. Microbiol. 8, 623-633.
- Foster, T.J., Geoghegan, J.A., Ganesh, V.K. e Höök, M. (2014). Adhesion, invasion and evasion: the many functions of the surface proteins of *Staphylococcus aureus*. Nat. Rev. Microbiol. 12, 49-62.
- Frank, K.L., Reichert, E.J., Piper, K.E. e Patel, R. (2007). In vitro effects of antimicrobial agents on planktonic and biofilm forms of *Staphylococcus lugdunensis* clinical isolates. Antimicrob. Agents Chemother. 51, 888-895.
- Friedman, L., Alder, J.D. e Silverman, J.A. (2006). Genetic changes that correlate with reduced susceptibility to daptomycin in *Staphylococcus aureus*. Antimicrob. Agents Chemother. 50, 2137-2145.
- Gardete, S. e Tomasz, A. (2014). Mechanisms of vancomycin resistance in *Staphylococcus aureus*. J. Clin. Invest. 124, 2836-2840.
- Gomes, D.M., Ward, K.E. e LaPlante, K.L. (2015). clinical implications of vancomycin heteroresistant and intermediately susceptible *Staphylococcus aureus*. Pharmacotherapy 35, 424-432.
- Gordon, R.J. e Lowy, F.D. (2008). Pathogenesis of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infection. Clin. Infect. Dis. 46, 350-359.
- Gudiol, C., Cuervo, G., Shaw, E., Pujol, M. e Carratalà, J. (2017). Pharmacotherapeutic options for treating *Staphylococcus aureus* bacteremia. Expert Opin. Pharmacother. 18, 1947-1963.
- Guimarães, L.C. (2018). Adesão e formação de biofilme por linhagens brasileiras de *Staphylococcus aureus* isoladas de hospitais do Rio de Janeiro. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Médica) – Instituto de Microbiologia Paulo de Góes, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 106 f.
- Gupta, A., Biyani, M. e Khaira, A. (2011). Vancomycin nephrotoxicity: myths and facts. Neth. J. Med. 69, 379-383.
- Hall, C.W. e Mah, T. (2017). Molecular mechanisms of biofilm-based antibiotic resistance and tolerance in pathogenic bacteria. FEMS Microbiol. Rev. 41, 276-301.

- Harms, A., Maisonneuve, E. e Gerdes, K. (2016). Mechanisms of bacterial persistence during stress and antibiotic exposure. *Science* 354, aaf4268.
- Harrison, E.M., Paterson, G.K., Holden, M.T.G., Morgan, F.J.E., Larsen, A.R., Petersen, A., Leroy, S., De Vliegheer, S., Perreten, V., Fox, L.K., Lam, T.J.G., Sampimon, O.C., Zadoks, R.N., Peacock, S.J., Parkhill, J. e Holmes, M.A. (2012). A *Staphylococcus xylosus* Isolate with a new *mecC* allotype. *Antimicrob. Agents Chemother.* 57, 1524-1528.
- Hashemian, S.M.R., Farhadi, T. e Ganjparvar, M. (2018). Linezolid: a review of its properties, function, and use in critical care. *Drug Des. Devel. Ther.* 12, 1759-1767.
- Heidary, M., Khosravi, A.D., Khoshnood, S., Nasiri, M.J., Soleimani, S. e Goudarzi, M. (2017). Daptomycin. *J. Antimicrob. Chemother.* 73, 1-11.
- Hiramatsu, K., Aritaka, N., Hnaki, H., Kawasaki, S., Hosoda, Y., Hori, S., Fukuchi, Y. e Kobayashi, I. (1997). Dissemination in Japanese hospitals of strains of *Staphylococcus aureus* heterogeneously resistant to vancomycin. *Lancet* 350, 1670-1673.
- Hiramatsu, K. (2001). Vancomycin-resistant *Staphylococcus aureus*: a new model of antibiotic resistance. *Lancet Infect. Dis.* 1, 147-155.
- Hiramatsu, K., Katayama, Y., Matsuo, M., Sasaki, T., Morimoto, Y., Sekiguchi, A. e Baba, T. (2014). Multi-drug-resistant *Staphylococcus aureus* and future chemotherapy. *J. Infect. Chemother.* 20, 593-601.
- Høiby, N., Bjarnsholt, T., Givskov, M., Molin, S. e Ciofu, O. (2010). Antibiotic resistance of bacterial biofilms. *Int. J. Antimicrob. Agents* 35, 322-332.
- Howden, B.P., Davies, J.K., Johnson, P.D.R., Stinear, T.P. e Grayson, M.L. (2010). Reduced vancomycin susceptibility in *Staphylococcus aureus*, including vancomycin-intermediate and heterogeneous vancomycin-intermediate strains: resistance mechanisms, laboratory detection, and clinical implications. *Clin. Microbiol. Rev.* 23, 99-139.
- Howden, B.P., Peleg, A.Y. e Stinear, T.P. (2013). The evolution of vancomycin intermediate *Staphylococcus aureus* (VISA) and heterogenous-VISA. *Infect. Genet. Evol.* 21, 575-582.
- Ito, T., Katayama, Y., Asada, K., Mori, N., Tsutsumimoto, K., Tiensasitorn, C. e Hiramatsu, K. (2001). Structural comparison of three types of staphylococcal cassette chromosome *mec* integrated in the chromosome in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 45, 1323-1336.
- Ito, T., Ma, X.X., Takeuchi, F., Okuma, K., Yuzawa, H. e Hiramatsu, K. (2004). Novel type V staphylococcal cassette Chromosome *mec* driven by a novel cassette chromosome recombinase, *ccrC*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 48, 2637-2651.
- Jefferson, k.k., Goldmann, D.A. e Pier, G.B. (2005). Use of Confocal Microscopy To Analyze the Rate of Vancomycin Penetration through *Staphylococcus aureus* Biofilms. *Antimicrob. Agents Chemother.* 49, 2467-2473.
- Jevons, M.P. "Celbenin"-resistant *Staphylococci*. *Br. Med. J.* 1, 124-125.
- Junie, L.M., Jeican, I.I., Matros, L. e Pandrea, S. (2018). Molecular epidemiology of the community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clones: a synthetic review. *Clujul Med.* 91, 7-11.
- Kaplan, J.B., Izano, E.A., Gopal, P., Karwacki, M.T., Kim, S., Bose, J.L., Bayles, K.W. e Horswil, K.R. (2012). Low levels of β -Lactam antibiotics induce extracellular DNA release and biofilm formation in *Staphylococcus aureus*. *MBio.* 3, e00198-12.
- Katayama, Y., Ito, T. e Hiramatsu, K. (2000). A new class of genetic element, *Staphylococcus* cassette chromosome *mec*, encodes methicillin resistance in *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 44, 1549-1555.
- King, J.M., Kulhankova, K., Stach, C.S., Vu, B.G., Salgado-Pabón, W. (2016). Phenotypes and virulence among *Staphylococcus aureus* USA100, USA200, USA300, USA400, and USA600 clonal lineages. *mSphere* 1, e00071-16.
- Klevens, R.M., Edwards, J.R., Tenover, F.C., McDonald, L.C., Horan, T., Gaynes, R. e The National Nosocomial Infections Surveillance System (2006). Changes in the epidemiology of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in intensive care units in US Hospitals, 1992–2003. *Clin. Infect. Dis.* 42, 389-391.

- Ko, K. S., Peck, K.R., Oh, W. S., Lee, N. Y., Hiramatsu, K., Song, J. (2005). Genetic differentiation of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains from Korea and Japan. *Microb. Drug Resist.* 11, 279-86.
- Kock, R., Becker, K., Cookson, B., Gemert-Pijnen, J.E., Harbarth, S., Kluytmans, J., Mielke, M., Peters, G., Skov, R.L., Struelens, M.J., Tacconelli, E., Torné, A. N., Witte, W. e Friedrich, A.W. (2010). Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA): burden of disease and control challenges in Europe. *Euro. Surveill.* 15, e19688.
- Lee, A.S., de Lencastre, H., Garau, J., Kluytmans, J., Malhotra-Kumar, S., Peschel, A. e Harbarth, S. (2018). Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Nat. Rev. Dis. Primers* 4, 1-23.
- Lim, Y., Shin, H.J., Kwon, A.S., Reu, J.H., Park, G., e Kim, J. (2013). Predictive genetic risk markers for strong biofilm-forming *Staphylococcus aureus*: *fnbB* gene and SCCmec type III. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* 76, 539-541.
- Limbago, B.M., Kallen, A. J., Zhu, W., Eggers, P., McDougal, L. K., Albrechts, V. S. (2014). Report of the 13th Vancomycin-Resistant *Staphylococcus aureus* isolate from the United States. *J. Clin. Microbiol.* 52, 998-1002.
- Liñares, J. (2001). The VISA/GISA problem: therapeutic implications. *Clin. Microbiol. Infect.* 7, 8-15.
- LPSN (2018). List of Prokaryotic names with Standing in Nomenclature – Genus *Staphylococcus*. Disponível em: <http://www.bacterio.cict.fr/s/staphylococcus.html>. Acesso em 25/5/2018.
- Liu, J., Chen, D., Peters, B.M., Li, L., Li, B., Xu, Z. e Shirriff, M.E. (2016). Staphylococcal chromosomal cassettes *mec* (SCCmec): a mobile genetic element in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Microb. Pathog.* 101, 56-67.
- Long, K.S., Poehlsgaard, J., Kehrenberg, C., Schwarz, S. e Vester, B. (2006). The Cfr rRNA methyltransferase confers resistance to phenicols, lincosamides, oxazolidinones, pleuromutilins, and streptogramin A antibiotics. *Antimicrob. Agents Chemother.* 50, 2500-2505.
- Ma, X.X., Ito, T., Tiensasitorn, C., Jamklang, M., Chongtrakool, P., Boyle-Vavra, S., Daum, R.S. e Hiramatsu, K. (2002). Novel type of staphylococcal cassette chromosome *mec* identified in community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains. *Antimicrob. Agents Chemother.* 46, 1147-1152.
- Magill, S.S., Edwards, J.R., Stat, M., Bamberg, W., Beldavs, Z.D., Dumyati, G., Kainer, M.A., Lynfield, R., Maloney, M., McAllister-Hollod, L., Nadle, J., Ray, S.M., Thompson, D.L., Wilson, L.E. e Fridkin, S.K. (2014). Multistate point-prevalence survey of health care-associated infections. *N. Engl. J. Med.* 370, 1198-1208.
- Majidpour, A., Fathzadeh, S., Afshar, M., Rahbar, M., Boustanshenas, M., Heidarzadeh, M., Arbabi, L. e Moghadam, S.S. (2017). Dose-dependent effects of common antibiotics used to treat *Staphylococcus aureus* on biofilm formation. *Iran J. Pathol.* 12, 362-370.
- McCarthy, H., Rudkin, J.K., Black, N.S., Gallagher, L., O'Neill, E. e O'Gara J.P. (2015). Methicillin resistance and the biofilm phenotype in *Staphylococcus aureus*. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* 5, 1-9.
- McDougal, L.K., Steward, C.D., Killgore, G.E., Chaitram, J.M., McAllister, S.K. e Tenover, F.C. (2003). Pulsed-field gel electrophoresis typing of oxacillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates from the United States: establishing a national database. *J. Clin. Microbiol.* 41, 5113-5120.
- Mendes, R.E., Deshpande, L., Streit, J.M., Sader, H.S., Castanheira, M., Hogan, P.A. e Flamm, R.K. (2018). ZAAPS programme results for 2016: an activity and spectrum analysis of linezolid using clinical isolates from medical centres in 42 countries. *J. Antimicrob. Chemother.* 73, 1880-1887.
- Miller, E.L. (2002). The penicillins: a review and update. *J. Midwifery Womens Health* 47, 426-434.
- Mirani, Z.A. e Jamil, N. (2011). Effect of sub-lethal doses of vancomycin and oxacillin on biofilm formation by vancomycin intermediate resistant *Staphylococcus aureus*. *J. Basic Microbiol.* 51, 191-195.
- Monecke, S., Coombs, G., Shore, A.C., Coleman, D.C., Akpaka, P., Borg, M., Chow, H., Ip, M., Jatzwauk, L., Jonas, D., Kadlec, K., Kearns, A., Laurent, F., O'Brien, F.G., Pearson, J., Ruppelt, A., Schwarz, S., Scicluna, E., Slickers, P., Tan, H.L., Weber, S. e Ehrlich, R. (2011). A field guide to pandemic, epidemic and sporadic clones of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *PLoS One* 6, e17936.
- Moormeier, D.E., Bose, J.L., Horswill, A.R. e Bayles, K.W. (2014). Temporal and stochastic control of *Staphylococcus aureus* biofilm development. *MBio.* 5, e01341-14.

- Nascimento, T.C., Diniz, C.G., Silva, V.L., Ferreira-Machado, A.B., Fajardo, M.O., de Oliveira, T.L.R., Ferreira, D.C., Cavalcante, F.S. e dos Santos, K.R.N. (2018). Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolated from an intensive care unit in Minas Gerais, Brazil, over a six-year period. *Braz. J. Infect. Dis.* 22, 55-59.
- Navarre, W.W. e Schneewind, O. (1999). Surface proteins of Gram-Positive bacteria and mechanisms of their targeting to the cell wall envelope. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 63, 174-229.
- Okado, J.B., Avaca-Crusca, J.S., Oliveira, A.L., Dabul, A.N.G. e Camargo, I.L.C. (2018). Daptomycin and vancomycin heteroresistance revealed among CC5-SCCmecII MRSA clone and in vitro evaluation of treatment alternatives. *J. Glob. Antimicrob. Resist.* 14, 209-216.
- Otto, M. (2012). MRSA virulence and spread. *Cell. Microbiol.* 14, 1513-1521.
- Otto, M. (2014). Phenol-soluble modulins. *Int. J. Med. Microbiol.* 304, 164-169.
- Otto, M. (2014). *Staphylococcus aureus* toxins. *Curr. Opin. Microbiol.* 17, 32-37.
- Park, H.J., Kim, S., Kim, M., Lee, W., Park, S., Moon, S.M., Park, K., Chong, Y.P., Lee, S., Choi, S., Woo, J.H. e Kim, Y.S. (2012). Efficacy of linezolid-based salvage therapy compared with glycopeptide-based therapy in patients with persistent methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* bacteremia. *J. Infect.* 65, 505-512.
- Peacock, S.J. e Paterson, G.K. (2015). Mechanisms of methicillin resistance in *Staphylococcus aureus*. *Annu. Rev. Biochem.* 84, 577-601.
- Raad, I., Hanna, H., Jiang, Y., Dvorak, T., Reitzel, R., Chaiban, G., Sherertz, R. e Hachem, R. (2007). Comparative activities of daptomycin, linezolid, and tigecycline against catheter-related methicillin-resistant *Staphylococcus* bacteremic isolates embedded in biofilm. *Antimicrob. Agents Chemother.* 51, 1656-1660.
- Reiter, K.C., Sambrano, G.E., Villa, B., Paim, T.G.S., de Oliveira, C.F. e d'Azevedo, P.A. (2012). Rifampicin fails to eradicate mature biofilm formed by methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* 45, 471-474.
- Reynolds, P. E. (1989). Structure, biochemistry and mechanisms of action of glycopeptide antibiotics. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 8, 943-950.
- Roger, C., Roberts, J.A. e Muller, L. (2017). Clinical pharmacokinetics and pharmacodynamics of oxazolidinones. *Clin. Pharmacokinet.* 57, 559-575.
- Rose, W.E. e Poppens, P.T. (2009). Impact of biofilm on the in vitro activity of vancomycin alone and in combination with tigecycline and rifampicin against *Staphylococcus aureus*. *J. Antimicrob. Chemother.* 63, 485-488.
- Saadat, S., Solhjoo, K., Norooz-Nejad, M. e Kazemi, A. (2014). *VanA* and *VanB* positive vancomycin-resistant *Staphylococcus aureus* among clinical isolates in Shiraz, South of Iran. *Oman Med. J.* 29, 335-339.
- Sader, H.S., Fey, P.D., Fish, D.N., Limaye, A.P., Pankey, G., Rahal, J., Rybak, M.J., Snyderman, D.R., Steed, L.L., Waites, K. e Jones, R.N. (2009). Evaluation of vancomycin and daptomycin potency trends (MIC Creep) against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates collected in nine U.S. medical centers from 2002 to 2006. *Antimicrob. Agents Chemother.* 53, 4127-4132.
- Sambrook, J., Fritsch, E.F. e Maniatis, T. (1989). Extraction and purification of plasmid DNA. In: *Molecular cloning: a laboratory manual*. 2. ed. (New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press), apêndice A5.
- Santos, K.R.N., Teixeira, L.M., Bravo Neto, G.P., Fonseca, L.S. e Gontijo Filho, P.P. (1999). Mupirocin- and methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* spreading in an intermediate-care unit in a Brazilian hospital. *Infect. Control Hosp. Epidemiol.* 9, 622-623.
- Seah, C., Alexander, D.C., Louie, L., Simor, A., Low, D.E., Longtin, J. e Melano R.G. (2012). MupB, a new high-level mupirocin resistance mechanism in *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 56, 1916-1920.
- Sharkey, L.K.R., Edwards, T.A. e O'Neill, A.J. (2016). ABC-F proteins mediate antibiotic resistance through ribosomal protection. *MBio.* 7, e01975.
- Shopsin, B., Gomez, M., Montgomery, S.O., Smith, D.H., Waddington, M., Dodge, D.E., Bost, D.A., Riehman, M., Naidich, S. e Kreiswirth, B.N. (1999). Evaluation of protein A gene polymorphic region DNA sequencing for typing of *Staphylococcus aureus* strains. *J. Clin. Microbiol.* 37, 3556-3563.
- Sieradzki, K., Roberts, R.B., Haber, S.W. e Tomasz, A. (1999). The development of vancomycin resistance in a patient with methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infection. *N. Engl. J. Med.* 340, 517-523.

- Silverman, J.A., Mortin, L.I., VanPraagh, A.D.G., Li, T. e Alder, J. (2005). Inhibition of daptomycin by pulmonary surfactant: in vitro modeling and clinical impact. *J. Infect. Dis.* 191, 2149-2152.
- SIMPRO Publicações e Teleprocessamento Ltda (2018). Disponível em <https://www.simpro.com.br/PortalPages/VisualizadorNoticia.aspx?idNoticia=354>. Acessado em 28/10/2018.
- Simor, A.E., Stuart, T.L., Louie, L., Watt, C., Ofner-Agostini, M., Gravel, D., Mulvey, M., Loeb, M., McGeer, A., Bryce, E., Matlow, A. e The Canadian Nosocomial Infection Surveillance Program (2007). Mupirocin-resistant, methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains in Canadian hospitals. *Antimicrob. Agents Chemother.* 51, 3880-3886.
- Singh, R., Ray, P., Das, A. e Sharma, M. (2010). Penetration of antibiotics through *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis* biofilms. *J. Antimicrob. Chemother.* 65, 1955-1958.
- Smith, T.L., Pearson, M.L., Wilcox, K.R., Cruz, C., Lancaster, M.V., Robinson-Dunn, B., Tenover, F.C., Zervos, M.J., Band, J.D., White, E. e Jarvis, W.R. (1999). Emergence of vancomycin resistance in *Staphylococcus aureus*. *N. Engl. J. Med.* 340, 493-501.
- Souza, R. R., Coelho, L. R., Botelho, A. M. N., Ribeiro, A., Rito, P. N., Vieira, V. V., Teixeira, L. A., Ferreira-Carvalho, B. T. e Figueiredo, A. M. S. (2009). Biofilm formation and prevalence of lukF-pv, seb, sec and tst genes among hospital- and community-acquired isolates of some international methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* lineages. *Clin. Microbiol. Infect.* 15, 203-207.
- Stefani, S., Bongiorno, D., Mongelli, G. e Campanile, F. (2010). Linezolid resistance in *Staphylococci*. *Pharmaceuticals* 3, 1988-2006.
- Stefani, S., Campanile, F., Santagati, M., Mezzatesta, M.L., Cafiso, V. e Pacini, G. (2015). Insights and clinical perspectives of daptomycin resistance in *Staphylococcus aureus*: a review of the available evidence. *Int. J. Antimicrob. Agents* 46, 278-89.
- Stepanovic, S., Vukovic, D., Hola, V., Di Bonaventura, G., Djukic, S., Cirkovic, I. e Ruzicka, F. (2007). Quantification of biofilm in microtiter plates: overview of testing conditions and practical recommendations for assessment of biofilm production by *Staphylococci*. *APMIS* 115, 891-899.
- Teixeira, L. A., Resende, C. A., Ormonde, L. R., Rosenbaum, R., Figueiredo A. M., de Lencastre, H. e Tomasz A. (1995). Geographic spread of epidemic multiresistant *Staphylococcus aureus* clone in Brazil. *J. Clin. Microbiol.* 33, 2400-2404.
- Teixeira, L. A., Lourenço, M. C. e Figueiredo, A. M. (1996). Emergence of a methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clone related to the Brazilian epidemic clone III::B.A causing invasive disease among AIDS patients in a Brazilian hospital. *Microb. Drug Resist.* 2, 393-399.
- Tenover, F.C., Arbeit, R.D., Goering, R.V., Mickelsen, P.A., Murray, B.E., Persing, D.H. e Swaminathan, B. (1995). Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by pulsed-field gel electrophoresis: criteria for bacterial strain typing. *J. Clin. Microbiol.* 33, 2233-2239.
- Tenover, F.C., Weigel, L.M., Appelbaum, P.C., McDougal, L.K., Chaitram, J., McAllister, S., Clark, N., Killgore, G., O'Hara, C.M., Jevitt, L., Patel, J.B. e Bozdogan, B. (2004). Vancomycin-resistant *Staphylococcus aureus* isolate from a patient in Pennsylvania. *Antimicrob. Agents Chemother.* 48, 275-280.
- Tenover, F.C., Vaughn, R.R., McDougal, L.K., Fosheim, G.E. e McGowan, J.E. (2007). Multiple-locus variable-number tandem-repeat assay analysis of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* Strains. *J. Clin. Microbiol.* 45, 2215-2219.
- Tenover, F.C., McAllister, S., Fosheim, G., McDougal, L.K., Carey, R.B., Limbago, B., Lonsway, D., Patel, J.B., Kuehnert, M.J. e Gorwitz, R. (2008). Characterization of *Staphylococcus aureus* isolates from nasal cultures collected from individuals in the United States in 2001 to 2004. *J. Clin. Microbiol.* 46, 2837-2841.
- Tong, S.Y., Davis, J.S., Eichenberger, E., Holland, T.L. e Fowler Jr, V.G. (2015). *Staphylococcus aureus* infections: epidemiology, pathophysiology, clinical manifestations, and management. *Clin. Microbiol. Rev.* 28, 603-661.
- Tsiodras, S., Gold, H.S., Sakoulas, G., Eliopoulos, G.M., Wennersten, C., Venkataraman, L., Moellering Jr, R.C. e Ferraro, M.J. (2001). Linezolid resistance in a clinical isolate of *Staphylococcus aureus*. *Lancet* 358, 207-208.
- van Hoek, A.H.A.M., Mevius, D., Guerra, B., Mullany, P., Roberts, A.P. e Aarts, H.J.M. (2011). Acquired antibiotic resistance genes: an overview. *Front. Microbiol.* 2, 1-27.

- Vanhommerig, E., Moons, P., Pirici, D., Lammens, C., Hernalsteens, J.P., De Greve, H., Kumar-Singh, S., Goossens, H., e Malhotra-Kumar, S. (2014). Comparison of biofilm formation between major clonal lineages of methicillin resistant *Staphylococcus aureus*. PLoS One. 9, e104561.
- Vivoni, A.M., Diep, B.A., Magalhães, A.C.G., Santos, K.R.N., Riley, L.W., Sensabaugh, G.F. e Moreira, B.M. (2006). Clonal composition of *Staphylococcus aureus* isolates at a Brazilian university hospital: identification of international circulating lineages. J. Clin. Microbiol. 44, 1686-1691.
- Wang, R., Braughton, K.R., Kretschmer, D., Bach, T.H., Queck, S.Y., Li, M., Kennedy, A.D., Dorward, D.W., Klebanoff, S.J., Peschel, A., DeLeo, F.R. e Otto, M. (2007). Identification of novel cytolytic peptides as key virulence determinants for community-associated MRSA. Nat. Med. 13, 1510–1514.
- Wright, A.J. (1999). The Penicillins. Mayo Clin. Proc. 74, 290-307.
- Wu, Z., Li, F., Liu, D., Xue, H. e Zhao, X. (2015). Novel type XII staphylococcal cassette chromosome *mec* harboring a new cassette chromosome recombinase, CcrC2. Antimicrob. Agents Chemother. 59, 7597–7601.
- Yang, B., Lei, Z., Zhao, Y., Ahmed, S., Wang, C., Zhang, S., Fu, S., Cao, J. e Qiu, Y. (2018). Combination Susceptibility Testing of Common Antimicrobials in Vitro and the Effects of Sub-MIC of Antimicrobials on *Staphylococcus aureus* Biofilm Formation. Front Microbiol. 8, eCollection 2017.
- Yilmaz, E.S. e Aslantas, O. (2017). Antimicrobial resistance and underlying mechanisms in *Staphylococcus aureus* isolates. Asian Pac. J. Trop. Med. 10, 1059-1064.
- Zapotoczna, M., O'Neill, E. e O'Gara, J.P. (2016). Untangling the diverse and redundant mechanisms of *Staphylococcus aureus* biofilm formation. PLoS Pathog. 12, e1005671.

ANEXO

Tabela 12: Descrição das características gerais e resultados encontrados para as 63 amostras de *Staphylococcus aureus* incluídas no estudo.

Amostra	Clonalidade	Data de Coleta	Sítio de Isolamento	Perfil de susceptibilidade por disco-difusão									Perfil de susceptibilidade por microdiluição em caldo					
				CIP	CLI	CLO	E	GEN	P	RIF	SXT	TET	DAP	LIN		VAN		OXA
													CMI	CMI	CMEB	CMI	CMEB	CMI
649a	USA100/ST5	08/09/2004	sangue	R	R	S	R	S	R	S	S	S	1	1	ND	0,5	ND	128
557a	USA100/ST5	10/09/2004	ND	R	R	S	R	S	R	S	S	S	1	1	ND	1	ND	128
655a	USA100/ST5	27/10/2004	sangue	R	R	R	R	S	R	S	S	S	1	1	ND	0,5	ND	128
659a	USA100/ST5	10/11/2004	Secreção traqueal	R	R	S	R	S	R	S	S	S	1	1	ND	0,5	ND	128
555a	USA100/ST5	19/11/2004	urina	R	R	S	R	S	R	S	S	S	1	1	ND	1	ND	128
663a	USA100/ST5	01/12/2004	sangue	R	R	S	R	S	R	S	S	S	1	1	ND	0,5	ND	128
554a	USA100/ST5	02/12/2004	escara	R	R	S	R	S	R	S	S	S	1	1	ND	1	ND	256
670a	USA100/ST5	11/01/2005	secreção óssea	R	R	S	R	R	R	S	S	S	1	1	ND	1	ND	128
913a	USA100/ST5	14/02/2005	ND	R	R	R	R	S	R	S	S	S	1	1	ND	1	ND	128
881a	USA100/ST5	24/06/2005	ND	R	R	R	R	R	R	S	S	S	1	1	ND	1	ND	128
618a	USA100/ST5	15/12/2005	narina	R	R	S	R	S	R	S	S	S	1	1	ND	2	ND	64
572a	USA100/ST5	24/01/2006	narina	R	R	S	R	S	R	S	S	S	1	1	ND	2	ND	64
758a	USA100/ST5	30/05/2006	narina	R	R	S	R	S	R	S	S	S	1	1	ND	2	ND	64
1087a	USA100/ST5	20/01/2008	ND	R	R	S	R	S	R	S	S	S	2	1	ND	0,5	ND	128
1258a	USA100/ST5	16/09/2008	sangue	R	R	S	R	S	R	S	S	S	1	1	ND	1	ND	128
1263a	USA100/ST5	22/09/2008	sangue	R	R	S	R	S	R	S	S	S	1	1	ND	1	ND	32
1266a	USA100/ST5	24/09/2008	sangue	R	R	S	R	S	R	S	S	S	1	1	ND	0,5	ND	256
1223a	USA100/ST5	10/01/2008	sangue	R	R	S	R	S	R	S	S	S	1	1	ND	0,5	ND	128
1224a	USA100/ST5	12/01/2008	sangue	R	R	S	R	S	R	S	S	S	1	1	ND	1	ND	64
1255a	USA100/ST5	02/09/2008	sangue	R	R	S	R	S	R	S	S	S	1	1	ND	0,5	ND	64
1265a	USA100/ST5	23/09/2008	sangue	R	R	S	R	S	R	S	S	S	1	1	ND	0,5	ND	256
1260a	USA100/ST5	17/09/2008	sangue	R	R	S	R	S	R	S	S	S	1	1	ND	1	ND	32
1275a	USA100/ST5	02/12/2008	sangue	R	R	S	R	S	R	S	S	S	2	1	ND	1	ND	32
1240a	USA100/ST5	27/05/2008	sangue	R	R	S	R	S	R	S	S	S	1	1	ND	0,5	ND	128

Amostra	Clonalidade	Data de Coleta	Sítio de Isolamento	Perfil de susceptibilidade por disco-difusão									Perfil de susceptibilidade por microdiluição em caldo					
				CIP	CLI	CLO	E	GEN	P	RIF	SXT	TET	DAP	LIN		VAN		OXA
													CMI	CMI	CMEB	CMI	CMEB	CMI
1276a	USA100/ST5	12/02/2008	sangue	R	R	S	R	S	R	S	S	S	1	1	ND	0,5	ND	>256
1238a	USA100/ST5	26/05/2008	sangue	R	R	S	R	S	R	S	S	S	1	1	ND	0,5	ND	64
1284a	USA100/ST5	01/02/2009	sangue	R	R	S	R	S	R	S	S	S	1	0,5	ND	1	ND	256
1285a	USA100/ST5	16/02/2009	sangue	R	R	S	R	S	R	S	S	S	1	0,5	ND	0,5	ND	64
1289a	USA100/ST5	13/03/2009	sangue	R	R	S	R	S	R	S	S	S	1	1	ND	0,5	ND	128
1290a	USA100/ST5	14/03/2009	sangue	R	R	R	R	S	R	S	S	S	2	1	ND	0,5	ND	128
1301a	USA100/ST5	25/05/2009	sangue	R	R	R	R	S	R	S	S	S	2	1	>128	1	>128	256
1309a	USA100/ST5	15/06/2009	sangue	R	R	R	R	S	R	R	S	S	1	1	ND	0,5	ND	>256
1288a	USA100/ST5	12/03/2009	sangue	R	R	S	R	S	R	S	S	S	1	1	ND	0,5	ND	>256
1291a	USA100/ST5	31/03/2009	sangue	R	R	S	R	S	R	S	S	S	1	1	ND	0,5	ND	64
1305a	USA100/ST5	04/06/2009	sangue	R	R	R	R	S	R	R	S	S	1	1	ND	0,5	ND	>256
1308a	USA100/ST5	15/06/2009	sangue	R	R	R	R	S	R	R	S	S	1	1	ND	0,5	ND	>256
1579a	USA100/ST5	23/02/2011	sangue	R	R	S	R	S	R	S	S	S	1	2	ND	4	ND	128
1582a	USA100/ST5	18/03/2011	sangue	R	R	S	R	S	R	S	S	S	2	2	ND	4	ND	≥256
1587a	USA100/ST5	05/04/2011	sangue	R	R	S	R	S	R	S	S	S	1	2	ND	2	ND	128
1591a	USA100/ST5	04/05/2011	sangue	R	R	R	R	S	R	S	S	S	1	1	ND	1	ND	64
1592a	USA100/ST5	11/05/2011	sangue	R	R	R	R	S	R	S	S	S	2	2	ND	2	ND	≥256
1594a	USA100/ST5	02/06/2011	sangue	R	R	S	R	S	R	S	S	S	2	1	ND	2	ND	128
1601a	USA100/ST5	18/07/2011	sangue	R	R	R	R	S	R	S	S	S	2	1	ND	2	ND	128
1606a	USA100/ST5	24/08/2011	sangue	R	R	R	R	S	R	S	S	S	1	1	ND	2	ND	≥256
1615a	USA100/ST5	01/01/2012	sangue	R	R	S	R	S	R	S	S	S	2	1	ND	1	ND	128
1616a	USA100/ST5	08/01/2012	sangue	R	R	S	R	S	R	S	S	S	4	1	ND	4	ND	≥256
1621a	USA100/ST5	30/01/2012	sangue	R	R	R	R	S	R	I	S	S	4	2	ND	1	ND	128
1626a	USA100/ST5	13/03/2012	sangue	R	R	S	R	R	R	S	S	S	2	2	ND	2	ND	16
1628a	USA100/ST5	21/03/2012	sangue	R	R	R	R	S	R	S	S	S	2	2	ND	1	ND	≥256
1653a	USA100/ST5	17/09/2012	sangue	R	R	S	R	R	R	S	S	S	1	2	ND	0,5	ND	64
1655a	USA100/ST5	29/10/2012	sangue	R	R	S	R	R	R	S	S	S	1	2	ND	0,5	ND	32
1664a	USA100/ST5	01/12/2012	sangue	R	R	R	R	S	R	S	S	S	2	1	ND	1	ND	≥256
1856a	USA100/ST5	17/09/2013	sangue	R	R	S	R	R	R	S	S	S	1	0,5	ND	2	ND	≥256

Amostra	Clonalidade	Data de Coleta	Sítio de Isolamento	Perfil de susceptibilidade por disco-difusão									Perfil de susceptibilidade por microdiluição em caldo					
				CIP	CLI	CLO	E	GEN	P	RIF	SXT	TET	DAP	LIN		VAN		OXA
													CMI	CMI	CMEB	CMI	CMEB	CMI
1661a	USA100/ST5	27/10/2012	sangue	R	R	S	R	S	R	S	S	S	1	1	ND	1	ND	128
1658a	USA100/ST5	16/10/2012	sangue	R	R	R	R	S	R	S	S	S	1	2	ND	2	ND	≥256
1758a	USA100/ST5	04/09/2014	sangue	R	R	S	R	S	R	S	S	S	0,5	2	ND	2	ND	256
1776a	USA100/ST5	14/11/2014	sangue	R	R	S	R	S	R	S	S	S	1	1	ND	1	ND	≥256
1742a	USA100/ST5	10/05/2014	sangue	R	R	S	R	S	R	S	S	S	1	2	ND	1	ND	≥256
1728a	USA100/ST5	09/01/2014	sangue	R	R	S	R	S	R	S	S	S	1	1	ND	1	ND	256
1770a	USA100/ST5	24/10/2014	sangue	R	R	S	R	S	R	S	S	S	1	1	ND	2	ND	≥256
1810a	USA100/ST5	09/02/2015	sangue	R	R	S	R	S	R	S	S	S	0,5	1	ND	2	ND	64
1844a	USA100/ST5	13/05/2015	sangue	R	R	S	R	S	R	S	S	S	1	2	ND	1	ND	256
1840a	USA100/ST5	01/05/2015	sangue	R	R	S	R	S	R	S	S	S	2	1	ND	1	ND	≥256

CIP: Ciprofloxacina; CLI: Clindamicina; CLO: Cloranfenicol; E: Eritromicina; GEN: Gentamicina; P: Penicilina; RIF: Rifampicina; SXT: Sulfametoxazol-trimetoprim; TET: Tetraciclina; DAP: Daptomicina; LIN: Linezolida; VAN: Vancomicina; OXA: Oxacilina; CMI: Concentração mínima inibitória; CMEB: Concentração mínima de erradicação do biofilme; R: resistente; S: Sensível; I: Resistência intermediária; ND: Não determinado.