

Universidade de Trás os Montes e Alto Douro

Mestrado em Biologia Clínica Laboratorial

Andreia Filipa Duarte Monteiro

“Resistência a antibióticos em *Staphylococcus aureus* isolados da cavidade oral de pacientes submetidos a tratamento médico-dentário”



Orientadora: Professora Doutora Patrícia Alexandra Curado Quintas Dinis Poeta

Co-orientadora: Mestre Vanessa Natália dos Santos Silva

Vila Real, 2020

Mestrado em Biologia Clínica Laboratorial

Andreia Filipa Duarte Monteiro

“Resistência a antibióticos em *Staphylococcus aureus* isolados da cavidade oral de pacientes submetidos a tratamento médico-dentário”

Orientadora: Professora Doutora Patrícia Alexandra Curado Quintas Dinis Poeta

Co-orientadora: Mestre Vanessa Natália dos Santos Silva

Composição do Júri:

Presidente:

1ª Vogal:

2ª Vogal:

As doutrinas apresentadas no presente trabalho são da exclusiva responsabilidade do autor. É autorizada a reprodução parcial desta tese apenas para efeitos de investigação, mediante declaração escrita do interessado, que a tal se compromete.

Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro

O autor:

Andreia Monteiro

Vila Real, 2020

Assinado por : **Patrícia Alexandra Curado Quintas
Dinis Poeta**
Num. de Identificação: BI10588169
Data: 2020.11.19 23:56:46+00'00'



A orientadora:

[Professora Doutora Patrícia Alexandra Curado Quintas Dinis Poeta]

Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro

Assinado por : **VANESSA NATÁLIA DOS SANTOS
SILVA**
Num. de Identificação: BI139582762

A co-orientadora:

[Mestre Vanessa Natália dos Santos Silva]

Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro

Agradecimentos

Com a conclusão deste ciclo, quero manifestar o meu sincero agradecimento a várias pessoas pelo carinho e apoio prestado. Assim, começo por agradecer à instituição Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro pelo acolhimento e pela disponibilização do espaço e materiais, essencial para a realização deste trabalho.

Em seguida, expresso o meu profundo agradecimento à equipa MicroArt por me ter acolhido tão bem, em especial à Professora Doutora Patrícia Poeta, orientadora deste trabalho. Agradeço-lhe por ter disponibilizado o seu laboratório e material para que a realização deste projeto fosse possível, pela orientação prestada desde o início do trabalho e, acima de tudo, pela disponibilidade e simpatia que sempre demonstrou.

Agradeço à clínica dentária Dentereal, em particular ao Doutor Eugénio, pela disponibilidade e pelo fornecimento das amostras essenciais para a realização deste estudo.

Agradeço à mestre Vanessa Natália dos Santos Silva, a minha co-orientadora, pela disponibilidade prestada, apoio, orientação e dedicação imprescindível ao longo de todo o trabalho, mas também pelo carinho e amizade que sempre demonstrou.

Ao Professor Doutor Gilberto Igrejas pela sua disponibilidade, apoio e carinho durante todo este tempo.

Às minhas colegas de trabalho, em especial, à Cláudia e Jéssica pelo apoio e amizade.

Às Técnicas do Laboratório de Microbiologia Médica do Departamento de Ciências Veterinárias pelo auxílio prestado.

À minha família que sempre me apoiou.

Por fim agradeço aos meus amigos de longa data por todo o apoio e por sempre acreditarem em mim.

Resumo

Staphylococcus aureus é uma bactéria Gram-positiva que coloniza naturalmente o ser humano em várias partes do corpo, nomeadamente na cavidade oral. Apesar desta bactéria não estar diretamente envolvida no processo de formação da cárie dentária, é reconhecida como um dos mais importantes agentes patogénicos oportunistas humanos, capaz de causar diversas doenças de diferentes graus de severidade. A patogenicidade de *S. aureus* está relacionada com a secreção de uma panóplia de proteínas e toxinas que lhe permitem evadir a resposta do sistema imunitário. Para além disso, a aquisição de mecanismos de resistência a antibióticos por parte destas bactérias levou à emergência de estirpes bacterianas resistentes, constituindo um grave problema a nível mundial. Assim sendo, o objetivo deste trabalho é caracterizar fenotipicamente *S. aureus* provenientes da cavidade oral de pacientes submetidos a tratamento médico-dentário.

Trinta e três estirpes foram isoladas de pacientes de uma clínica dentária e a sua suscetibilidade foi testada pelo método de difusão em disco Kirby-Bauer contra 14 agentes antimicrobianos e de acordo com as diretrizes do EUCAST (2018). Os agentes antimicrobianos utilizados foram penicilina, gentamicina, mupirocina, cefotoxina, ciprofloxacina, eritromicina, ácido fusídico, clindamicina, linezolida, tobramicina, canamicina, trimetoprim-sulfametoxazol, tetraciclina e cloranfenicol. Os isolados apresentaram resistência à gentamicina (CN, n=29), tobramicina (TOB, n=26), penicilina (PEN, n=16), eritromicina (ERY, n=9), ácido fusídico (FD, n=5), cefoxitina (FOX, n=2), canamicina (K, n=2), ciprofloxacina (CIP, n=1), clindamicina (DA, n=1), e tetraciclina (TET, n=1). Nenhum dos isolados apresentou resistência fenotípica aos antibióticos trimetoprim-sulfametoxazol, mupirocina, cloranfenicol e Linezolida.

Todos os isolados foram também testados contra dois antissépticos orais disponíveis comercialmente, porém, os resultados obtidos foram pouco conclusivos.

Conclui-se que trabalhos como este são de grande relevo na medida que nos permitem tomar consciência da importância do conhecimento das características de cada estirpe bacteriana em particular e dos seus padrões de suscetibilidade antimicrobiana, de modo a facilitar a escolha da melhor terapia antimicrobiana, evitando assim o uso indevido dos antibióticos, um dos principais fatores que leva à emergência das resistências.

Palavras-chave: Resistência a antibióticos, *Staphylococcus aureus*, MRSA, cavidade oral.

Abstract

Staphylococcus aureus is a Gram-positive bacterium that naturally colonizes human beings in various parts of the body, namely in the oral cavity. Although this bacterium is not directly involved in the process of dental caries formation, it is recognized as one of the most important human opportunistic pathogens, capable of causing different diseases of different degrees of severity. The pathogenicity of *S. aureus* is related to the secretion of a panoply of proteins and toxins that allow it to evade the immune system's response. In addition, the acquisition of antibiotic resistance mechanisms by these bacteria has led to the emergence of resistant bacterial strains, constituting a serious problem worldwide. Therefore, the aim of this work is to phenotypically characterize *Staphylococcus aureus* from the oral cavity of patients undergoing medical and dental treatment.

Thirty-three isolates were recovered from patients at a dental clinic and their susceptibility was tested by the Kirby-Bauer disk diffusion method against 14 antimicrobial agents and according to EUCAST guidelines (2018). The antimicrobial agents used were penicillin, gentamicin, mupirocin, cefotaxime, ciprofloxacin, erythromycin, fusidic acid, clindamycin, linezolid, tobramycin, kanamycin, trimethoprim-sulfamethoxazole, tetracycline and chloramphenicol. The isolates showed resistance to gentamicin (CN, n = 29), tobramycin (TOB, n = 26), penicillin (PEN, n = 16), erythromycin (ERY, n = 9), fusidic acid (FD, n = 5), cefotaxime (FOX, n = 2), kanamycin (K, n = 2), ciprofloxacin (CIP, n = 1), clindamycin (DA, n = 1), and tetracycline (TET, n = 1). None of the isolates showed phenotypic resistance to the antibiotics trimethoprim-sulfamethoxazole, mupirocin, chloramphenicol and Linezolid.

All the isolates were also tested against two commercially available oral antiseptics, however, the results obtained were not conclusive.

It is concluded that works like this are of great relevance in the way they allow us to become aware of the importance of knowing the characteristics of each bacterial strain in particular and its patterns of antimicrobial susceptibility, in order to facilitate the choice of the best antimicrobial therapy, avoiding thus the misuse of antibiotics, one of the main factors that leads to the emergence of resistance.

Keywords: Antibiotic resistance, *Staphylococcus aureus*, MRSA, oral cavity.

Índice

Agradecimentos	IX
Resumo	XI
Abstract.....	XII
Índice de figuras	XV
Índice de tabelas	XVI
Lista de abreviaturas e símbolos.....	XVII
I. Revisão bibliográfica	1
1. Introdução	1
2. Colonização e infecção.....	2
3. Resposta imunitária do hospedeiro	5
4. Fatores de virulência	6
a) Leucocidina de Pantón-Valentine (PVL)	7
b) Hemolisinas	8
c) Enterotoxinas	8
d) Toxinas exfoliativas	9
e) Toxinas da síndrome de choque tóxico.....	9
5. Cluster de evasão imune	11
6. Resistência a antibióticos	12
6.1 Inibidores da síntese da parede celular	13
a) Beta lactâmicos	13
b) Glicopeptídeos.....	14
6.2 Inibidores da síntese proteica	15
a) Aminoglicosídeos.....	15
b) Tetraciclínas.....	16
c) Macrólidos, lincosamidas e estreptograminas (MLS's).....	16
d) Anfenicóis	17
6.3 Inibidores da síntese de ácidos nucleicos	17
a) Quinolonas	17
6.4 Inibidores das vias metabólicas.....	17
a) Sulfonamidas	17
7. Epidemiologia de <i>Staphylococcus aureus</i> resistentes à metilina	18
8. MRSA de origem hospitalar e MRSA de origem comunitária	20
9. <i>Staphylococcus aureus</i> e a cavidade oral	21
10. Clorexidina e Cloreto de cetilpiridínio	21

II. Objetivos	22
III. Material e métodos.....	23
1. Recolha de amostras	23
2. Isolamento e identificação de <i>S. aureus</i> e MRSA	24
3. Teste de suscetibilidade aos antibióticos.....	24
4. Teste de suscetibilidade aos antissépticos.....	26
IV. Resultados e discussão	26
1. Prevalência de <i>Staphylococcus aureus</i> e MRSA	26
2. Distribuição dos isolados <i>S. aureus</i> de acordo com o Sexo.....	29
3. Caracterização fenotípica dos isolados de <i>S. aureus</i>	30
4. Susceptibilidade aos antissépticos	35
V. Conclusão.....	37
VI. Referências	39

Índice de figuras

Figura 1- Mecanismos de adesão de <i>S. aureus</i> na cavidade nasal anterior e posterior (adaptado de Krismer et al., 2017).	2
Figura 2- Mecanismo de competição entre bactérias. Lise de <i>S. aureus</i> após a libertação de peróxido de hidrogénio por <i>Streptococcus pneumoniae</i> (Adaptado de Krismer et al., 2017). ..	4
Figura 3- Mecanismos antimicrobianos no interior do fagossoma (Adaptado de Krishna e Miller, 2012).	5
Figura 4- Mecanismo de ação das toxinas formadoras de poros (Adaptado de Nawrotek et al., 2018).	8
Figura 5- Vias de transferência horizontal de genes em bactérias (Adaptado de Stewart, 2013).	13
Figura 6- Mecanismos de resistência aos antibióticos beta-lactâmicos em <i>S. aureus</i>	14
Figura 7- Incidência mundial de <i>Staphylococcus aureus</i> resistentes à meticilina (Retirado de Lee et al., 2018).	18
Figura 8- Estrutura básica do SSCmec constituído pelo complexo mec e complexo ccr (Adaptado de Hiramatsu et al., 2015).	20

Índice de tabelas

Tabela 1- Fatores de virulência de <i>Staphylococcus aureus</i> (Adaptado de Gnanamani et al., 2017).....	10
Tabela 2- Componentes do cluster de evasão imune (Adaptado de Thammavongsa et al., 2015).....	11
Tabela 3- Dados relativos à população em estudo	23
Tabela 4- Agentes antimicrobianos utilizados e respectivas concentrações.	25
Tabela 5- Nome comercial e respetiva composição química dos antissépticos orais utilizados.	26
Tabela 6- Número de isolados de <i>S. aureus</i> e respetiva prevalência.	27
Tabela 7- Prevalência (%) de <i>S.aureus</i> de acordo com o género.	29
Tabela 8- Número e percentagem de resistências por antibiótico.	30

Lista de abreviaturas e símbolos

Agr	Gene regulador acessório (“ <i>Acessory Gene Regulator</i> ”)
AME	Enzimas modificadoras de aminoglicosídeos (“ <i>Aminoglycoside Modifying Enzymes</i> ”)
BHI	“ <i>Brain-Heart Infusion</i> ”
BPA	“ <i>Baird Parker Agar</i> ”
CA-MRSA	MRSA associado à comunidade
CHIP	Proteína inibidora da quimiotaxia (“ <i>Chemotaxis Inhibitory Protein</i> ”)
CIP	Ciprofloxacina
CLSI	“ <i>Clinical & Laboratory Standards Institute</i> ”
CN	Gentamicina
CoNS	Staphylococcus Coagulase Negativos
DA	Clindamicina
Eap	Proteína de aderência extracelular (“ <i>Extracellular Adherence Protein</i> ”)
ECDC	“ <i>European Centre for Disease Prevention and Control</i> ”
ERY	Eritromicina
ESKAPE	“ <i>Enterococcus faecium, Staphylococcus aureus, Klebsiella pneumoniae, Acinetobacter baumannii, Pseudomonas aeruginosa e Enterobacter spp.</i> ”)
EUCAST	“ <i>European Committee of Antimicrobial Susceptibility Testing</i> ”
FD	Ácido Fusídico
FOX	Cefoxitina
GPCR	Recetor acoplado à proteína G (“ <i>G Protein-Coupled Receptor</i> ”)
HÁ-MRSA	MRSA associado ao ambiente hospitalar
HGT	Transferência horizontal de genes (“ <i>Horizontal Gene Transfer</i> ”)
Hla	Alfa Hemolisina/Toxina
IEC	Cluster de evasão imune (“ <i>Immune Evasion Cluster</i> ”)
IgG	Imunoglobulina G
K	Canamicina
LEADER	“ <i>Linezolid Experience and Accurate Determination of Resistance</i> ”
LNZ	Linezolida
MGE	Elemento genético movel (“ <i>Mobile Genetic Element</i> ”)
MIC	Concentração inibitória mínima (“ <i>Minimum Inhibitory Concentration</i> ”)
MRSA	<i>Staphylococcus aureus</i> resistente à metilicina

MSCRAMM	Componentes da superfície microbiana que reconhecem moléculas adesivas da matriz (“ <i>Microbial Surface Components Recognizing Adhesive Matrix Molecules</i> ”)
MSSA	<i>Staphylococcus aureus</i> suscetível à meticilina
MUP	Mupirocina
ORSAB	“ <i>Oxacilin Resistance Screening Agar Base</i> ”
PAMP’s	Padrões moleculares associados ao patógeno (“ <i>Pathogen-Associated Molecular Patterns</i> ”)
PBP’s	Proteínas de ligação à penicilina (“ <i>Penicillin binding Proteins</i> ”)
PEN	Penicilina
PFT	Toxinas formadoras de poros (“ <i>Pore Forming Toxins</i> ”)
PVL	Proteína de Pantón-Valentine
SCC	“ <i>Staphylococcal Cassette Chromosome</i> ”
SCIN	“ <i>Staphylococcal Complement Inhibitor</i> ”
SXT	Trimetoprim/sulfametoxazole
TOB	Tobramicina
TSST	Toxinas da síndrome do choque tóxico (“ <i>Toxic Shock Syndrome Toxin</i> ”)
VRE	Enterococcus resistentes à Vancomicina (“ <i>Vancomycin-resistant Enterococcus</i> ”)
VRSA	<i>Staphylococcus aureus</i> resistentes à Vancomicina (“ <i>Vancomycin-resistant Staphylococcus aureus</i> ”)

I. Revisão bibliográfica

1. Introdução

Staphylococcus aureus é uma bactéria Gram-positiva de forma esférica pertencente à família *Staphylococcaceae* (Lee *et al.*, 2018). Bioquimicamente, é uma bactéria anaeróbia facultativa, formando colônias amarelas em meios de agar nutritivo. Para além disso, caracteriza-se por ser coagulase e catalase positiva, oxidase negativa e tolerante ao sal (pode crescer em meio manintol-salt agar com 7,5% de cloreto de sódio) (Gnanamani *et al.*, 2017). Esta bactéria é abundantemente encontrada em animais, nomeadamente no Homem, colonizando a pele, trato oral, respiratório e gastrointestinal de forma assintomática (Faden, 2018). No entanto, é reconhecida como um dos mais importantes agentes patogénicos oportunistas humanos, capaz de causar diversas doenças de diferentes graus de severidade (Sim, 2019).

A patogenicidade de *S.aureus* está relacionada com a secreção de uma panóplia de proteínas e toxinas que lhe permitem evadir a resposta do sistema imunitário (Guerra *et al.*, 2017). Para além disso, a aquisição de mecanismos de resistência a antibióticos por parte destas bactérias levou à emergência de estirpes bacterianas resistentes, constituindo um grave problema a nível mundial (Bush *et al.*, 2011). Os processos de transferência horizontal de genes, nomeadamente a aquisição de genes de resistência mediada por plasmídeos constituem a rota mais comum de disseminação das resistências (Jensen e Lyon, 2009).

Os MRSA's (*Staphylococcus aureus* resistentes à meticilina) foram descritos em 1961 como um dos patógenos de maior risco associados ao desenvolvimento de resistência a antibióticos (Harkins *et al.*, 2017). Estas bactérias adquiriram um elemento genético móvel que lhes confere resistência contra a meticilina bem como à maioria dos antibióticos beta-lactâmicos (Harkins *et al.*, 2017).

Uma vez no interior do organismo, podem levar ao surgimento de infeções graves como endocardites e outras com elevado grau de mortalidade (Gnanamani *et al.*, 2017). Por esse motivo, e uma vez que põem em causa a eficácia dos antibióticos, estas bactérias constituem uma grave ameaça à saúde pública, sendo por isso motivo de grande preocupação.

2. Colonização e infecção

Cerca de 30% da população humana é naturalmente colonizada por *S. aureus* (Thammavongsa *et al.*, 2015). Estes indivíduos funcionam como um reservatório de infecção uma vez que podem transmitir a bactéria a outros sujeitos (Sim, 2019). O processo de colonização envolve o contacto entre o hospedeiro e o agente patogénico, e depende da capacidade deste último de aderir e resistir á resposta imunitária do primeiro (Gordon e Lowy, 2008). Os mecanismos de adesão utilizados por esta bactéria dependem das características específicas do epitélio (Laux *et al.*, 2018). Neste processo participam um conjunto de proteínas presentes na parede celular da bactéria que são capazes de reconhecer moléculas da matriz celular (Ryu *et al.*, 2014). Estas proteínas pertencem ao grupo dos MSCRAMMs (*microbial surface components recognizing adhesive matrix molecules*) (Laux *et al.*, 2018). Dentro deste grupo destacam-se as proteínas de ligação à fibronectina (FnbpA e FnbpB), proteínas de ligação ao fibrinogénio (ClfA e ClfB), determinante de superfície regulado por ferro A (IsdA) e ácido teicoóico (Ryu *et al.*, 2014). O ácido teicoóico liga se ao recetor SREC1 presente na superfície das células ciliadas da cavidade nasal posterior (**Figura 1**) (Krismer *et al.*, 2017).

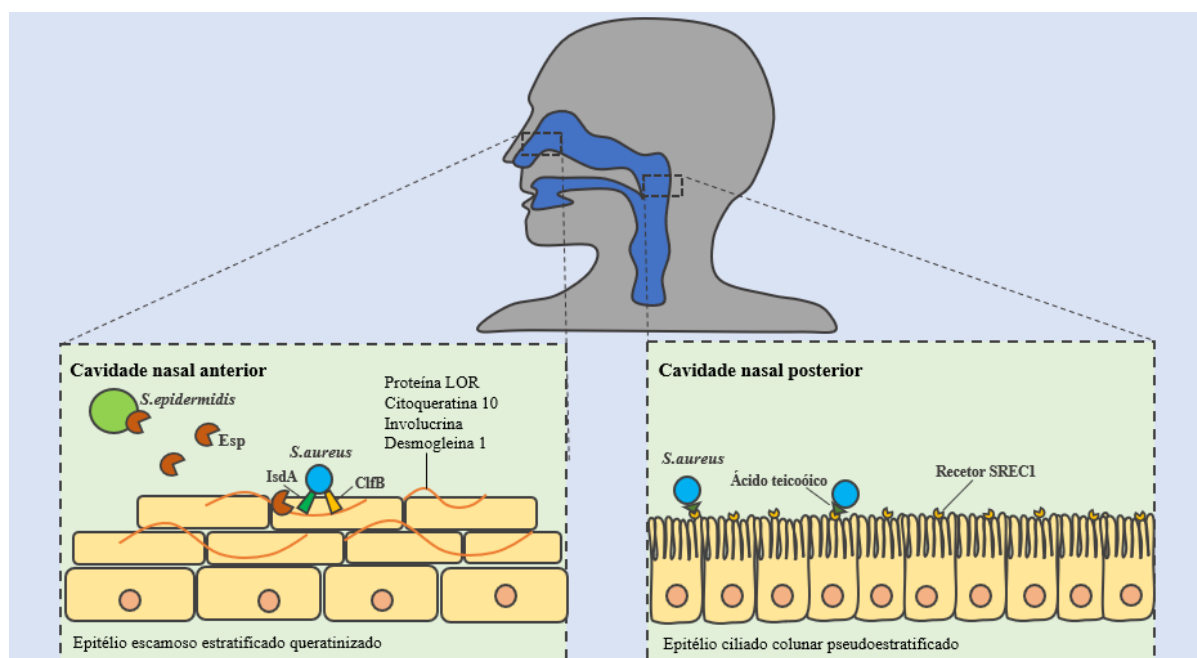


Figura 1-Mecanismos de adesão de *S. aureus* na cavidade nasal anterior e posterior (adaptado de Krismer *et al.*, 2017).

Estirpes com deficiência neste ácido são incapazes de aderir e colonizar as células da cavidade nasal (Sakr *et al.*, 2018). Na cavidade nasal anterior o fator ClfB bem como o determinante A (IsdA) interagem com proteínas presentes na matriz das células escamosas anucleadas, tais como a proteína LOR e citoqueratina 10 (**Figura 1**) (Krismer *et al.*, 2017). O papel do fator ClfB no processo de colonização já foi estudado em diversos trabalhos, que demonstraram que este tem um papel fundamental no processo de colonização. Segundo esses estudos, estirpes mutantes para o fator ClfB têm uma taxa de colonização muito diminuída quando comparadas com a estirpe selvagem (ClfB +) (Sakr *et al.*, 2018)

Após aderir à matriz celular, este agente é capaz de crescer e resistir de várias formas. Tem a capacidade de produzir colônias variantes pequenas que são menos suscetíveis à atividade bactericida dos péptidos antimicrobianos produzidos por determinadas células do estrato córneo (Ryu *et al.*, 2014). Isto acontece porque as mesmas têm a capacidade de se alojar no interior das células hospedeiras onde podem adquirir maior virulência (Gordon e Lowy, 2008). A localização intracelular destas colônias já foi descrita utilizando técnicas de imunohistoquímica em células epiteliais, endoteliais e inflamatórias, principalmente mastócitos (Sakr *et al.*, 2018). Esta localização pode explicar a dificuldade da descolonização e a ocorrência de infecções recorrentes em pacientes com rinossinusite crônica (Clement *et al.*, 2005).

Para além das características do patógeno, algumas características do hospedeiro influenciam diretamente o processo de colonização tais como o seu estado de saúde e a presença de determinadas patologias (Sakr *et al.*, 2018). Deste modo, existem alguns grupos onde o risco de infecção é maior, nomeadamente recém nascidos com baixo peso, crianças e pacientes que carreguem consigo dispositivos médicos como cateteres, intubação endotraqueal ou implantes (Thammavongsa *et al.*, 2015).

Por último, também a competição entre bactérias que co-habitam no mesmo local pode influenciar diretamente o processo de colonização (Lee *et al.*, 2018). Na cavidade nasal, onde os recursos são limitados, as bactérias competem entre si através de diferentes mecanismos para garantir a sua sobrevivência. Por exemplo, *S. lugdunensis* consegue destruir *S.aureus* através da produção e secreção de um composto antimicrobiano designado lugdunina (Lee *et al.*, 2018). Outras bactérias têm a capacidade de alterar as condições do meio externo, levando à destruição dos seus rivais. É o caso de *S. pneumoniae* que liberta peróxido de hidrogénio para o meio gerando radicais livres no DNA de *S.aureus*, o que leva à ativação de profagos contidos no seu genoma que promovem a lise da bactéria (**Figura 2**) (Krismer *et al.*, 2017).

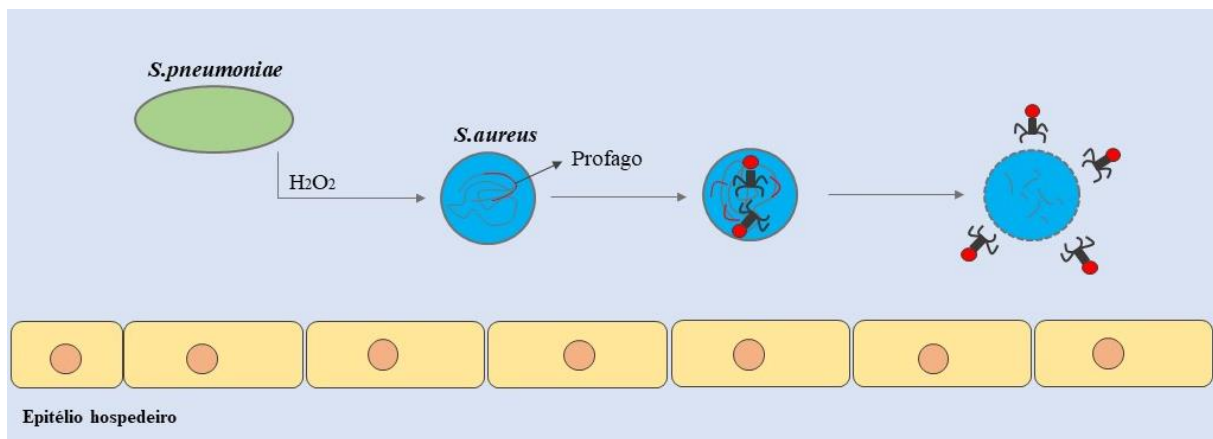


Figura 2-Mecanismo de competição entre bactérias. Lise de *S. aureus* após a liberação de peróxido de hidrogênio por *Streptococcus pneumoniae* (Adaptado de Krismer et al., 2017).

Quando ocorre uma quebra das barreiras cutâneas e mucosas, este agente ganha facilmente acesso à corrente sanguínea disseminando-se, rapidamente, para outros órgãos, o que leva ao surgimento de infecções mais graves como endocardites, pneumonia necrótica, entre outros (Gnanamani *et al.*, 2017) (Sim, 2019). Na maioria dos casos, as infecções são causadas por estirpes de *S. aureus* que os próprios indivíduos transportam de forma comensal (Lakhundi e Zhang, 2018a). No entanto, é importante referir que a taxa de mortalidade em infecções por *S. aureus* é maior em indivíduos que não sejam colonizados por este agente em comparação com indivíduos colonizados, sugerindo assim que este processo confere alguma proteção imunitária caso uma posterior infecção ocorra (Gordon e Lowy, 2008).

3. Resposta imunitária do hospedeiro

A resposta imunitária contra *Staphylococcus aureus* envolve a ativação quer do sistema imunitário inato quer do sistema imunitário adaptativo. (Karauzum *et al.*, 2017). O primeiro fornece uma resposta pró-inflamatória não específica como a fagocitose por parte de macrófagos e neutrófilos, representando a primeira linha de defesa contra agentes invasores que se caracteriza por ser uma resposta rápida contra o patógeno iniciando-se pelo reconhecimento de padrões moleculares associados ao patógeno (PAMPs) (Zecconi e Scali, 2013). Este reconhecimento é feito por recetores específicos localizados na membrana da célula hospedeira designados PRRs levando à libertação de fatores pró-inflamatórios como as citocinas e as quimiocinas (Krishna e Miller, 2012). A libertação destas moléculas gera um gradiente quimiotático que atrai os neutrófilos para o local da infeção num processo designado quimiotaxia (Guerra *et al.*, 2017). Por sua vez, os neutrófilos que extravasam os vasos sanguíneos e migram em direção ao local da infeção fagocitam o agente infeccioso (Thammavongsa *et al.*, 2015). No interior do fagossoma, os neutrófilos utilizam diversos mecanismos para destruir a bactéria. Estes incluem espécies reativas de oxigénio, péptidos antimicrobianos, proteinases e hidrolases ácidas, entre outros (**Figura 3**) (Krishna e Miller, 2012).

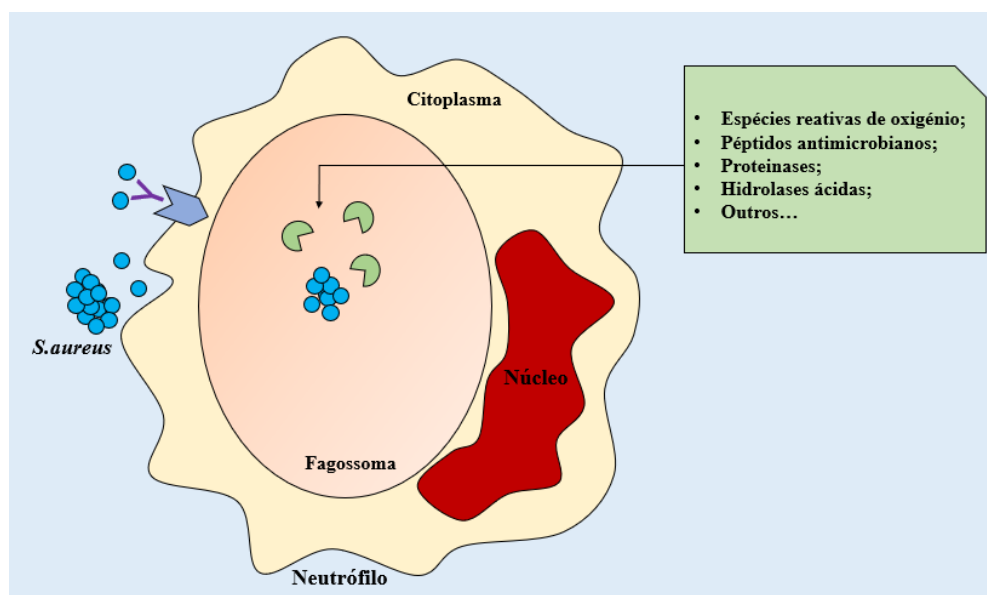


Figura 3- Mecanismos antimicrobianos no interior do fagossoma (Adaptado de Krishna e Miller, 2012).

4. Fatores de virulência

Para conseguir sobreviver de forma comensal no organismo humano, *Staphylococcus aureus* teve de se adaptar á presença das defesas do hospedeiro. Como tal, adquiriu capacidade de inibir funções básicas da resposta imunitária (Greenlee-wacker *et al.*, 2015).

A patogenicidade deste agente é um processo multifatorial que depende da expressão de diversos fatores de virulência controlada por múltiplos sistemas regulatórios em conjunto com sinais provenientes do meio externo (Lan *et al.*, 2010). Um dos mais bem estudados sistemas regulatórios em *Staphylococcus aureus* é o gene regulador acessório (*agr*). Descrito pela primeira vez em 1986, codifica um sistema *quorum-sensing* que funciona como um regulador máximo de virulência (Jenul e Horswill, 2019). Este sistema coordena o timing de transição para o modo invasivo, levando a um aumento na produção dos fatores de virulência (Bezar *et al.*, 2019). Assim sendo, a patogenicidade de *S.aureus* está relacionada com a secreção de uma panóplia de proteínas e toxinas que lhe permitem evadir a resposta do sistema imunitário. Algumas dessas proteínas têm a capacidade de se ligar a recetores específicos na membrana dos neutrófilos impedindo a quimiotaxia. Dentro desse grupo podemos destacar as proteínas inibitórias da quimiotaxia (CHIPS) que impedem que os neutrófilos respondam a estímulos químicos como proteínas do complemento (C5a) e peptídeos formilados de origem bacteriana (Guerra *et al.*, 2017). As CHIPS ligam-se aos seus recetores específicos C5aR e FPR, respetivamente, ambos pertencentes á classe dos recetores associados à proteína G (GPCRs), bloqueando-os (Postma *et al.*, 2019). Outras proteínas conseguem “sequestrar” imunoglobulinas ao ligarem-se a estas numa orientação incorreta. A proteína A, presente na superfície celular de *S.aureus*, é capaz de se ligar á porção Fc da IgG, fazendo com que esta imunoglobulina fique “presa” à superfície celular da bactéria (Rigby e Deleo, 2012). A Staphyloxantina é uma de várias enzimas que possui propriedades antioxidantes desempenhando um papel importante na defesa do patógeno contra as espécies reativas de oxigénio presentes no interior do fagossoma (Lan *et al.*, 2010). Existem ainda algumas proteínas que facilitam o processo de invasão dos tecidos como a proteína Eap (*Extracellular adherence protein*) e outras como lípases, proteases e nucleases que causam a destruição dos tecidos facilitando assim a penetração da bactéria (Gnanamani *et al.*, 2017). Para além disto, *S.aureus* é ainda capaz de produzir exo polímeros formando uma microcápsula que inibe o reconhecimento pelas células do sistema imunitário (Rigby e Deleo, 2012).

Para além dos fatores de virulência referidos anteriormente, *S. aureus* é ainda capaz de produzir e segregar diversas toxinas (Otto, 2015). Estas toxinas incluem a família das leucocidinas e hemolisinas e são geralmente designadas de PFTs (pore forming toxins) ou PFP (pore forming proteins) (Rigby e Deleo, 2012) uma vez que levam à formação de poros na membrana da célula alvo (**Figura 4**) (Joubert *et al.*, 2007). Dentro deste grupo podemos destacar a leucocidina de Panton-Valentine e a alfa- e beta-hemolisina. Para além destas, outras toxinas como as enterotoxinas, toxinas exfoliativas e toxinas da síndrome de choque tóxico podem também ser segregadas por *S. aureus*, acarretando consequências graves para o hospedeiro.

Na **tabela 1** encontram-se descritos resumidamente todos os fatores de virulência e toxinas mencionados anteriormente.

a) Leucocidina de Panton-Valentine (PVL)

A leucocidina de Panton-Valentine deve o seu nome a Philip Noel Panton e Francis Valentine que em 1932 distinguiram a PVL das hemolisinas e demonstraram uma correlação entre a presença desta molécula com a ocorrência de infeções severas na pele e tecidos moles (Nawrotek *et al.*, 2018). As leucocidinas são toxinas formadoras de poros que atacam células do sistema imunitário principalmente fagócitos (Spaan *et al.*, 2017). Estas moléculas são formadas por duas subunidades proteicas (LukS-PV e LukF-PV) que hetero-oligomerizam formando um poro octaédrico na membrana da célula alvo provocando a lise da mesma (Tromp *et al.*, 2018). Estas proteínas são codificadas por dois genes contíguos (*LukF-PV* e *LukS-PV*) transportados no interior de profagos (Nawrotek *et al.*, 2018). Ao contrário de outras leucocidinas secretadas por *Staphylococcus aureus*, as leucocidinas de Panton-Valentine não têm atividade hemolítica (Boyle-vavra e Daum, 2007). Estudos *in vitro* demonstraram que a atividade desta toxina é dependente da sua concentração. Em concentrações sublíticas estas moléculas levam à ativação da via intrínseca da apoptose enquanto que em concentrações mais elevadas promovem a necrose dos leucócitos (Nawrotek *et al.*, 2018). É importante referir que apesar de uma percentagem relativamente baixa (2-5%) de isolados de *S.aureus* transportarem consigo os genes para a PVL existe uma forte evidencia epidemiológica para a associação entre a PVL e a emergência de *Staphylococcus aureus* resistentes à meticilina (MRSA) (Hussain *et al.*, 2010).

b) Hemolisinas

A família das hemolisinas é das mais bem caracterizadas famílias de toxinas formadoras de poros em termos de estrutura (Peraro e Goot, 2015). Ao contrário das leucocidinas que apenas lisam leucócitos, as hemolisinas têm a capacidade de lisar glóbulos vermelhos (Otto, 2015). Dentro desta família a alfa hemolisina (também conhecida como alfa-toxina ou Hla) é capaz de destruir uma enorme variedade de células incluindo células epiteliais, eritrócitos, fibroblastos, monócitos, macrófagos e linfócitos, sendo considerada o maior fator de virulência em *S.aureus* (Rigby e Deleo, 2012).

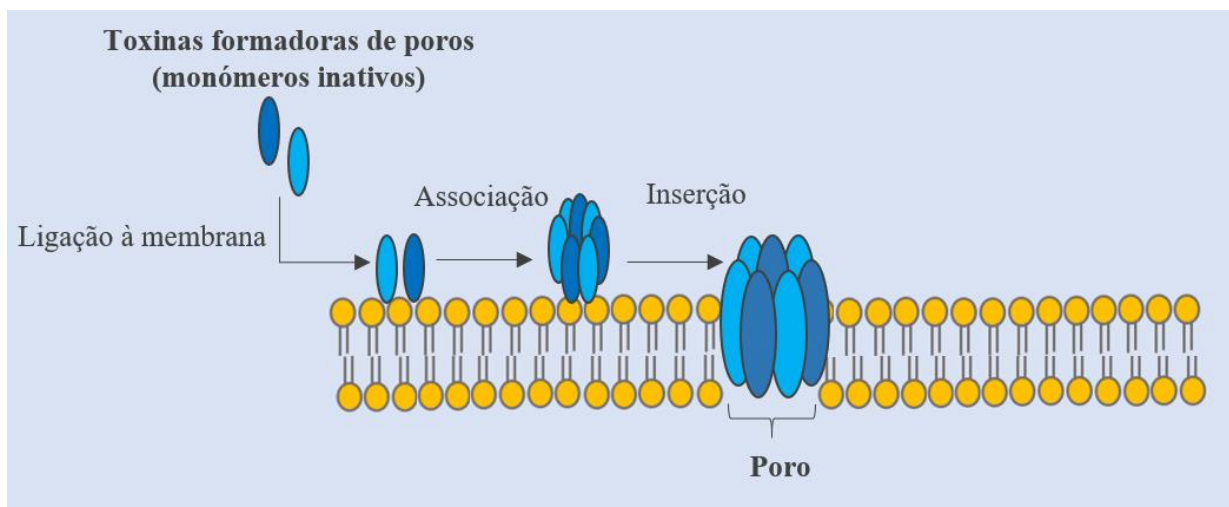


Figura 4- Mecanismo de ação das toxinas formadoras de poros (Adaptado de Nawrotek et al., 2018).

c) Enterotoxinas

As enterotoxinas interferem com a função intestinal e tipicamente causam vômitos e diarreia (Otto, 2015). As estirpes de *S.aureus* podem produzir uma vasta variedade destas toxinas que são altamente resistentes ao calor, às proteinases digestivas, agentes desnaturantes e variações de pH (Benkerroum, 2018). O mecanismo através do qual estas moléculas atuam não é bem conhecido. No entanto, o processo envolve a ativação excessiva de linfócitos T resultando na liberação massiva de citocinas que finalmente termina em morte celular por apoptose (Otto, 2015). Devido ao seu potencial de estimular excessivamente as células T, estas toxinas são classificadas como proteínas superantigénicas (SAGs) e podem, assim como as TSSTs, desencadear a síndrome de choque tóxico (Benkerroum, 2018).

d) Toxinas exfoliativas

As toxinas exfoliativas produzidas por algumas estirpes de *S.aureus* disseminam-se pelo organismo resultando em febre, eritema e destruição de proteínas essenciais à manutenção da normal estrutura da pele, podendo levar ao surgimento da síndrome da pele escaldada (Ondusko e Nolt, 2019). Esta patologia é mais frequente em crianças devido ao facto de estas possuírem baixos níveis de anticorpos neutralizantes (Yamasaki *et al.*, 2005).

e) Toxinas da síndrome de choque tóxico

As toxinas da síndrome de choque tóxico medeiam a síndrome do choque tóxico que se caracteriza por sintomas como febre, eritroderma, hipotensão e ,em casos mais extremos, falência multiorgânica (Ondusko e Nolt, 2019). Apesar destas toxinas apresentarem um grande potencial fatal apenas estão presentes num pequeno número de estirpes de *S.aureus* (Otto, 2015).

Tabela 1-Fatores de virulência de *Staphylococcus aureus* (Adaptado de Gnanamani *et al.*, 2017).

<i>Fator de virulência</i>	<i>Características</i>
Ligação aos tecidos	
Microbial Surface Components Recognizing adhesive matrix molecules (MSCRAMM)	Proteínas da superfície celular bacteriana que interagem com moléculas presentes na superfície da célula hospedeira facilitando a ligação da bactéria aos tecidos. Exemplos: proteínas de ligação à fibronectina, proteínas de ligação ao fibrinogénio determinante de superfície regulado por ferro e ácido teicoóico.
Evasão da resposta imunitária	
Microcápsula	Impede o reconhecimento e fagocitose da bactéria pelos fagócitos.
Proteína A	Liga-se à porção Fc da IgG impedindo o processo de opsonização.
Leucocidina de Pantón-Valentine	Formação de poros na membrana da célula alvo levando à lise da mesma.
Alfa-hemolisina	Primeira toxina formadora de poros identificada e melhor caracterizada até ao momento. É capaz de lisar eritrócitos.
Proteínas inibidoras da quimiotaxia (CHIPS)	Inibição da função quimiotática dos neutrófilos e monócitos.
Invasão dos tecidos	
Proteína de aderência extracelular (Eap)	Ligação à matriz da célula alvo, proteínas plasmáticas e molécula de adesão endotelial (ICAM-1).
Proteases, lípases, nucleases	Promovem a destruição dos tecidos.
Toxinas	
Leucocidinas	Lise de leucócitos
Hemolisinas	Lise de leucócitos e eritrócitos
Enterotoxinas	Provocam intoxicação alimentar.
Toxinas da síndrome do choque tóxico	Responsáveis pela síndrome do choque tóxico.
Toxinas exfoliativas	Causam a síndrome da pele escaldada.

5. Cluster de evasão imune

O cluster de evasão imune (IEC) é o elemento genético móvel mais vulgarmente encontrado em isolados de *S. aureus* humanos sendo este codificado pelo bacteriófago *Saint3* (Jung *et al.*, 2016). Atualmente, sete variantes deste elemento foram identificadas com base nas diferentes possíveis combinações de genes nele contidas. Todas as variantes carregam consigo o gene *scn* que codifica a proteína SCIN (*Staphylococcal complement inhibitor*) responsável por inibir a ativação do complemento (Verkaik *et al.*, 2010). Esta proteína interage com as C3 convertases impedindo a deposição de C3b na superfície celular da bactéria (Thammavongsa *et al.*, 2015).

Os outros genes presentes neste cluster são o *sea*, *sak* e *chp* codificando a enterotoxina A, estafilocinase e as proteínas inibidoras da quimiotaxia, respetivamente (Verkaik *et al.*, 2010). A SAK está presente em cerca de 75% dos IECs e tem como função inibir a atividade bactericida das alfa defensinas e promover a ativação do plasminogénio em plasmina na superfície da bactéria, impedindo o processo de opsonização (Jung *et al.*, 2016). As CHIPS (proteínas inibitórias da quimiotaxia) estão presentes em metade dos IECs, enquanto que as enterotoxinas apenas estão presentes em cerca de 1/3 dos mesmos (Wamel *et al.*, 2006). Apesar deste bacteriófago estar presente em grande parte dos isolados humanos, é pouco comum encontrá-lo em isolados de origem animal (Jung *et al.*, 2016).

Na **tabela 2** encontram-se descritos resumidamente os componentes do cluster de evasão imune mencionados anteriormente.

Tabela 2-Componentes do cluster de evasão imune (Adaptado de Thammavongsa *et al.*, 2015).

Nome	Gene	Genoma	Função	Alvo
SCIN	<i>scn</i>	IEC1	Inibição do complemento	C3
Estafilocinase	<i>sak</i>	IEC1	Inibição da fagocitose	C3, plasminogénio;
CHIPS	<i>chp</i>	IEC1	Inibição da quimiotaxia	FPR1 e C5aR
Enterotoxina A	<i>sea</i>	IEC1	Ativação de linfócitos	Linfócitos T

6. Resistência a antibióticos

Desde a sua implementação na prática clínica há cerca de oito décadas, os antibióticos tornaram-se a base da medicina moderna (Stokes *et al.*, 2019). No entanto, a sua eficácia tem vindo a ser ameaçada pela disseminação global de estirpes resistentes que se deve em grande parte ao uso inadequado destes nos diferentes setores: clínica, veterinária e agricultura (Bush *et al.*, 2011).

A emergência estirpes de *Staphylococcus aureus* resistentes à penicilina foi verificada em 1942 (Lakhundi e Zhang, 2018a), poucos anos após a introdução da mesma na prática clínica (Ventola, 2015). Estas estirpes produzem uma enzima beta-lactamase (penicilinase) capaz de destruir o anel beta-lactâmico da penicilina, inativando o antibiótico (Gnanamani *et al.*, 2017). Para fazer face a este problema, novos antibióticos foram desenvolvidos desde então, porém, devido à sua utilização exagerada a incidência de novas resistências aumentou, particularmente nos países em desenvolvimento, onde estes medicamentos podem ser facilmente adquiridos sem necessidade de prescrição médica (W. Wang *et al.*, 2018).

Inicialmente, quando as primeiras resistências foram reportadas, pensava-se que estas se deviam exclusivamente a mutações que ocorriam espontaneamente levando ao surgimento de organismos resistentes (Jensen e Lyon, 2009). Neste cenário, células mutantes derivadas de uma população suscetível têm a capacidade de sobreviver mesmo na presença do antibiótico, enquanto que as suscetíveis serão eliminadas (Munita *et al.*, 2016). No entanto, a descoberta de processos de transferência horizontal de genes (HGT) e de elementos de DNA extra cromossómico rapidamente colocou a teoria da resistência mutacional em segundo plano (Jensen e Lyon, 2009). Ao contrário da transferência vertical, onde os genes passam da célula mãe para as filhas durante a reprodução, a transferência horizontal de genes pode resultar da aquisição direta de DNA externo libertado por células vizinhas (transformação), transmissão de DNA célula a célula através da superfície celular (conjugação) e transferência de DNA mediada por vírus (transdução) (**Figura 5**) (Stewart, 2013).

Regra geral, o processo de conjugação utiliza elementos genéticos móveis (MGE's) como veículos de partilha de informação genética (Munita *et al.*, 2016). A transmissão de genes de resistência mediada por plasmídeos é a via mais comum de aquisição de material genético externo enquanto que, pelo contrário, a transmissão mediada por bacteriófagos é pouco comum (Reygaert, 2018).

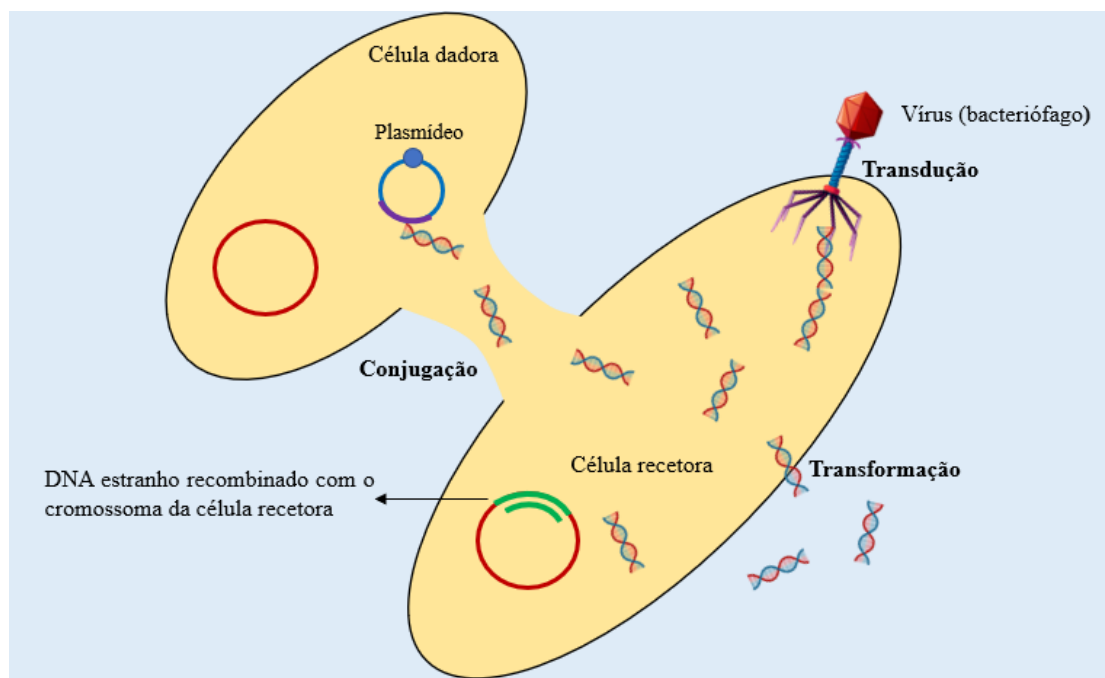


Figura 5- Vias de transferência horizontal de genes em bactérias (Adaptado de Stewart, 2013).

As moléculas antibacterianas atuam por mecanismos que alvejam funções importantes para a bactéria impedindo a sua multiplicação ou sobrevivência. Assim sendo, os antibióticos podem ser divididos em diferentes grupos de acordo com o seu mecanismo de ação (Reygaert, 2018). Contudo, alguns agentes patogénicos como *S. aureus* desenvolveram diversos mecanismos de resistência que lhes permitem sobreviver na presença desses antibióticos. Em seguida serão destacados os principais grupos de antibióticos, resumindo-se o seu mecanismo de ação bem como o mecanismo de resistência que lhe está associado.

6.1 Inibidores da síntese da parede celular

a) Beta lactâmicos

Os beta lactâmicos são uma classe de antibióticos que bloqueiam a síntese de peptidoglicano, um componente chave da parede celular das bactérias (Etebu e Arikekpar, 2017). As últimas fases da síntese do peptidoglicano são catalisadas por um grupo de proteínas designadas proteínas de ligação à penicilina (PBPs) (Loskill *et al.*, 2014). Estas proteínas são alvo de ação dos antibióticos beta lactâmicos, que se ligam á enzima bloqueando o seu local ativo. *Staphylococcus aureus* desenvolveu resistência à ação destes antibióticos através de dois mecanismos principais (**Figura 6**) (Scheffers e Pinho, 2005). Em primeiro lugar, são capazes

de sintetizar enzimas que hidrolisam e destroem os beta lactâmicos. Estas enzimas são designadas beta lactamases e são codificadas pelo gene *blaZ* (Fuda *et al.*, 2005). O segundo mecanismo de resistência está relacionado com a produção de uma proteína de ligação á penicilina modificada (PBP2a) (Harkins *et al.*, 2017). Esta proteína possui baixa afinidade pelos beta lactâmicos uma vez que, em comparação com as restantes PBPs, apresenta um local ativo menos acessível e por esse motivo a síntese de peptidoglicano não é afetada (Lakhundi e Zhang, 2018b).

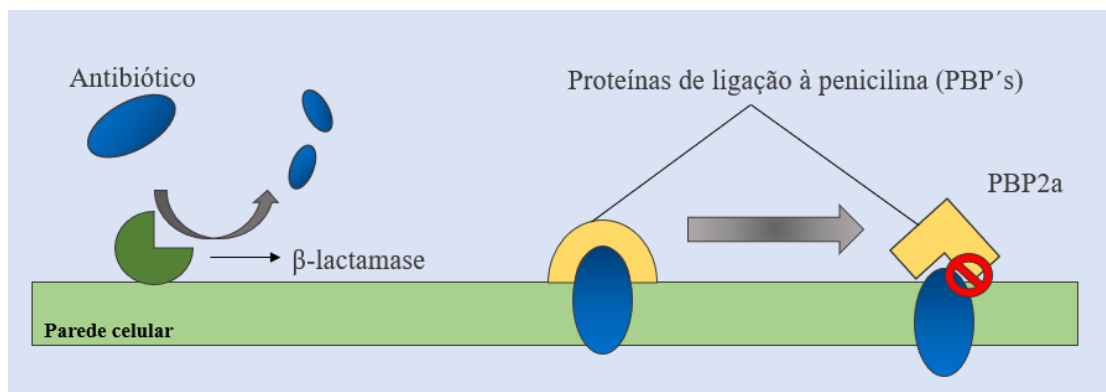


Figura 6- Mecanismos de resistência aos antibióticos beta-lactâmicos em *S. aureus*.

b) Glicopeptídeos

Ao contrário dos beta lactâmicos que se ligam diretamente às PBPs, os glicopeptídeos como a vancomicina e a teicoplanina ligam se ao seu substrato, o peptidoglicano, impedindo os processos de transglicosilação e transpeptidação (Yim *et al.*, 2014). O mecanismo de resistência a estes antibióticos passa pela aquisição do gene *VanA* que codifica proteínas capazes de reprogramar a síntese da parede celular. Apesar da resistência á vancomicina ser bastante frequente em membros do genro *Enterococcus*, é pouco frequente encontrar *Staphylococcus aureus* resistentes à vancomicina (VRSA) (Binda *et al.*, 2014).

6.2 Inibidores da síntese proteica

a) Aminoglicosídeos

Os aminoglicosídeos são uma das classes de antibióticos mais importantes no tratamento de infecções por *Staphylococcus* (Dokht *et al.*, 2017). Estes antibióticos são geralmente administrados em conjunto com os beta lactâmicos devido ao seu efeito sinérgico (Yadegar *et al.*, 2009). O seu mecanismo de ação baseia-se na sua ligação à subunidade ribossomal 30S, interrompendo o processo de tradução (Mahdiyoun *et al.*, 2016). Consequentemente, ocorre a biossíntese de uma proteína não funcional que interage com a membrana celular, alterando a sua permeabilidade (Azucena e Mobashery, 2001). Atualmente, foram identificados três mecanismos de resistência a estes antibióticos: alteração do local de ligação ao antibiótico na subunidade ribossomal 30S, redução da permeabilidade ao antibiótico e inativação do antibiótico por enzimas (Mahdiyoun *et al.*, 2016). Este último é sem duvida o mecanismo de resistência mais utilizado por *Staphylococcus* através da segregação de enzimas modificadoras de aminoglicosídeos (AME's) (Yadegar *et al.*, 2009). As AME's são classificadas em três classes de acordo com a reação que catalisam em: acetiltransferases (AAC's), fosfotransferases (APH's) e nucleotidiltransferases (ANT's) (Ardic *et al.*, 2006). Estas enzimas utilizam moléculas dadoras de grupos acil, fosfato e adenosina monofosfato para modificar a molécula alvo, o antibiótico, deixando este de ser funcional (Ramirez e Tolmasky, 2010). Destas enzimas a AAC(6')/APH(2''), ANT(4)-I, e APH(3')-III, codificadas pelos genes *aac(6')-Ie/aph(2'')*, *ant(4')-Ia*, and *aph(3')-IIIa* respetivamente, são de particular importância uma vez que são as AME's mais comuns em *Staphylococcus* e também porque modificam aminoglicosídeos de elevada importância clínica (Yadegar *et al.*, 2009). Estas enzimas podem estar codificadas em plasmídeos, no cromossoma bacteriano ou ainda em elementos transponíveis (Ida *et al.*, 2001).

b) Tetraciclina

As tetraciclina, descobertas em 1940, são uma família de antibióticos que inibem a síntese proteica pois impedem a ligação do tRNA ao ribossoma (Chopra e Roberts, 2001). Mais especificamente, as tetraciclina ligam-se ao rRNA 16S impedindo a ligação do tRNA ao complexo mRNA-ribossoma interrompendo o processo de tradução (Chukwudi, 2016). A resistência às tetraciclina está relacionada com a aquisição de genes presentes em elementos genéticos móveis como plasmídeos e transposões que podem ser facilmente conjugados entre bactérias (Roberts, 2005). Os dois principais mecanismos de resistência a estes antibióticos em espécies de *Staphylococcus* são o efluxo ativo do antibiótico e a proteção ribossomal (Trzcinski *et al.*, 2000). O primeiro mecanismo é mediado pelos genes tetK e tetL que codificam proteínas de efluxo que exportam o antibiótico para fora da célula, reduzindo a sua concentração intracelular e assim protegendo o ribossoma (Chopra e Roberts, 2001). O segundo mecanismo por sua vez é mediado pelos genes tetM e tetO que codificam proteínas citoplasmáticas responsáveis pela proteção dos ribossomas à ação das tetraciclina (Chopra e Roberts, 2001).

c) Macrólidos, lincosamidas e estreptograminas (MLS's)

Os antibióticos deste grupo são quimicamente distintos porém, o seu mecanismo de ação é bastante similar: todos eles se ligam à subunidade ribossomal 50S, próximo do centro peptidil transferase (Reyes *et al.*, 2007) que catalisa a formação de ligações peptídicas durante o processo de elongação das proteínas (Tenson e Lovmar, 2003). A ligação do antibiótico neste local inibe a síntese proteica, limitando o crescimento da bactéria (Gaynor e Mankin, 2003). O principal mecanismo de resistência a este grupo de antibióticos é a produção de enzimas metilases (codificadas pelo gene *erm*) que catalisam uma reação de metilação no RNA ribossomal, alterando a sua conformação e consequentemente impedindo a ligação do antibiótico (Reyes *et al.*, 2007). Para além deste mecanismo, a presença de bombas de efluxo (codificadas pelos genes *mrsA* ou *mrsB*) bem como de enzimas que inativam estes antibióticos (EreA e EreB) já foram documentadas em *Staphylococcus aureus* (Schmitz *et al.*, 2000).

d) Anfenicóis

O cloranfenicol foi o primeiro agente deste grupo a ser descoberto em 1947, após ser isolado de uma bactéria (*Streptomyces venezuelae*) (Schwarz *et al.*, 2016). Devido aos seus efeitos colaterais e suspeita de carcinogênese a sua utilização foi banida de vários países. No entanto, alguns análogos sintéticos deste foram desenvolvidos e são usados atualmente, nomeadamente o tianfenicol e florfenicol (Reis *et al.*, 2020). Estes antibióticos interferem com o terminal aminoacil do aa-tRNA, inibindo a peptidiltransferase (Foster, 2017). A resistência a este grupo de antibióticos frequentemente ocorre através de modificação enzimática por acetilação ou fosforilação (Reis *et al.*, 2020).

6.3 Inibidores da síntese de ácidos nucleicos

a) Quinolonas

As quinolonas atuam através da inibição de duas enzimas essenciais à replicação do DNA bacteriano, a DNA girase e a topoisomerase IV (Blondeau *et al.*, 2004). O mecanismo de resistência a estes antibióticos em *S.aureus* passa por alterações no local de ligação a estas enzimas (subunidade GyrA da girase e subunidade GrlA na topoisomerase) bem como pela expressão de bombas de efluxo pelo gene *NorA* que expulsam o antibiótico para o meio extracelular (Gnanamani *et al.*, 2017).

6.4 Inibidores das vias metabólicas

a) Sulfonamidas

As sulfonamidas são um grupo de antibióticos sintéticos que atuam como inibidores competitivos da enzima dihidropteroato sintetase (DHPS) impedindo a síntese de ácido fólico (Reis *et al.*, 2020). Esta enzima é essencial para os procariotas que, ao contrário dos mamíferos, sintetizam ácido fólico *de novo* (Foster, 2017). O principal mecanismo de resistência em *Staphylococcus* está relacionado com mutações no gene *folP* que produz uma DHPS alterada, à qual o antibiótico é incapaz de se ligar (Sköld, 2000).

7. Epidemiologia de *Staphylococcus aureus* resistentes à metilina

Os MRSA (*Staphylococcus aureus* resistentes à metilina) foram identificados como um dos patógenos de maior risco associados ao desenvolvimento de resistência a antibióticos (Harkins *et al.*, 2017). Estas bactérias foram inicialmente descritas em 1961 na Inglaterra, pouco tempo depois da metilina ser introduzida na prática clínica (Lee *et al.*, 2018). No entanto, a sequenciação do genoma de alguns isolados sugere que estas bactérias terão surgido na década 40, devido ao excessivo uso da penicilina (Lee *et al.*, 2018). De facto, apenas dois anos após a introdução da penicilina cerca de 80% dos isolados de *S. aureus* apresentavam resistência a este antibiótico (Lakhundi e Zhang, 2018b). Durante os dez anos após o seu surgimento, verificou-se um aumento dos surtos de infeções provocadas por MRSA em diferentes países do mundo, especialmente nos países Europeus (Gnanamani *et al.*, 2017). Na **figura 7** é possível observar o cenário atual da incidência (em %) de MRSA a nível mundial.

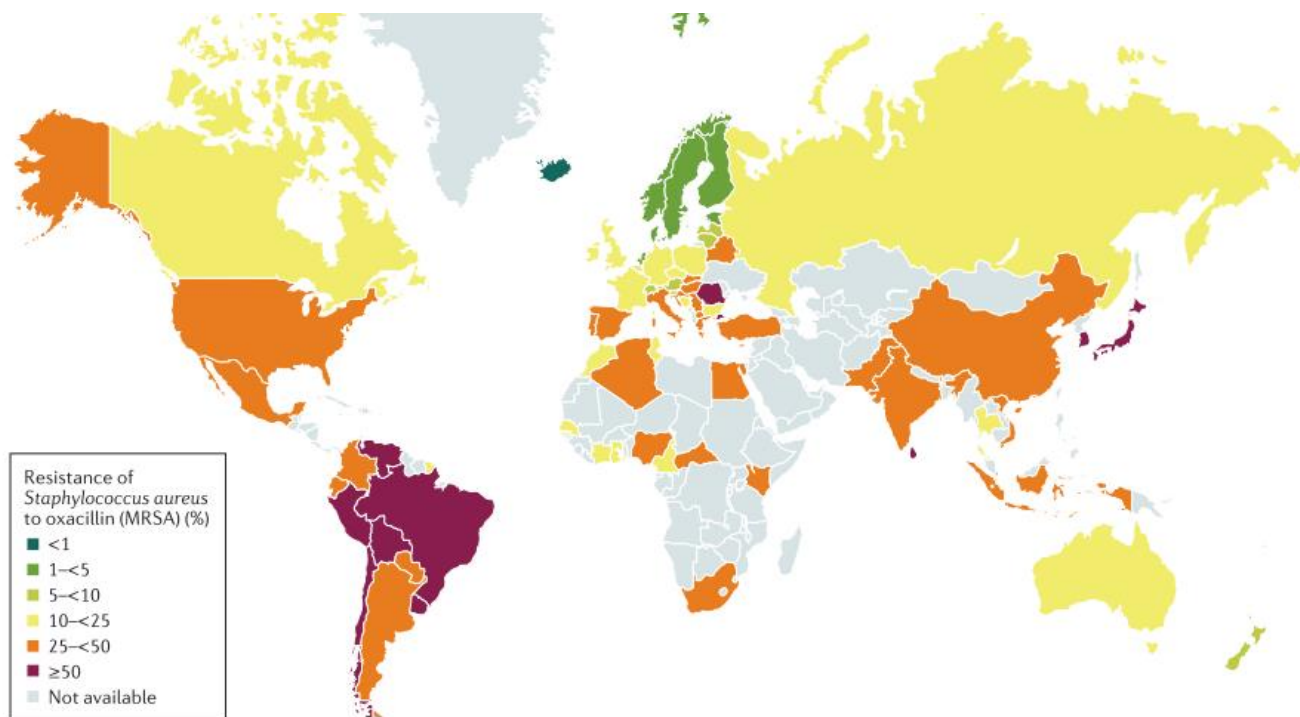


Figura 7- Incidência mundial de *Staphylococcus aureus* resistentes à metilina (Retirado de Lee et al., 2018).

Inicialmente, as infecções por MRSA estavam confinadas apenas a ambientes hospitalares, sugerindo que este agente emergiu nesse ambiente (Kateete *et al.*, 2019). Porém, em 1990 emergiram as primeiras estirpes de origem comunitária causando infecções graves em pacientes sem nenhum contacto prévio com ambiente hospitalar (Choo, 2017). Deste modo, os MRSA passaram a ser classificados de acordo com a sua origem em hospitalares (HA-MRSA) ou comunitários (CA-MRSA) (Alfouzan *et al.*, 2019). Os primeiros estão associados a infecções nosocomiais graves como endocardites (Kateete *et al.*, 2019) enquanto que os segundos são geralmente a causa mais comum de infecções da pele e tecidos moles (Choo, 2017).

O mecanismo de resistência aos beta lactâmicos nos MRSA apenas foi descoberto alguns anos depois, em 1981 (Gnanamani *et al.*, 2017). Verificou-se então que a resistência está relacionada com a aquisição e inserção de um elemento genético móvel designado *staphylococcal cassette chromosome mec* (SCCmec) (Harkins *et al.*, 2017).

O *staphylococcal cassette chromosome mec* (SCCmec) é um elemento genético móvel constituído por dois componentes essenciais, o complexo de genes *ccr* e o complexo de genes *mec* (Chongtrakool *et al.*, 2006). O complexo *mec* é composto pelo gene *mecA* (ou *mecC*) e pelos seus genes reguladores (*mecR1* e *mecI*) que controlam a sua expressão, enquanto que o complexo *ccr* codifica recombinases local específicas que medeiam a integração do elemento bem como a sua excisão precisa do interior do cromossoma (**Figura 8**) (Hiramatsu *et al.*, 2015). Os genes *mecA* ou *mecC* são os responsáveis pela produção da proteína de ligação á penicilina modificada (PBP2a) conferindo resistência à meticilina bem como à maioria dos antibióticos beta-lactâmicos. (Harkins *et al.*, 2017).

A elevada diversidade no tamanho e organização destas estruturas levou à classificação da cassette estafilococal em 13 tipos (I-XIII) (Alfouzan *et al.*, 2019). O typing desta estrutura é uma ferramenta importantíssima no estudo dos MRSA's, permitindo a sua classificação epidemiológica em diferentes grupos, no entanto, com o passar dos anos, a distinção entre estes tem se tornado cada vez mais confusa (Lee *et al.*, 2018).

Atualmente, a hipótese que melhor permite explicar a origem evolucionária dos MRSA sugere que estes surgiram pela transferência horizontal desse elemento em estirpes precursoras suscetíveis à meticilina (MSSA) (Gnanamani *et al.*, 2017).

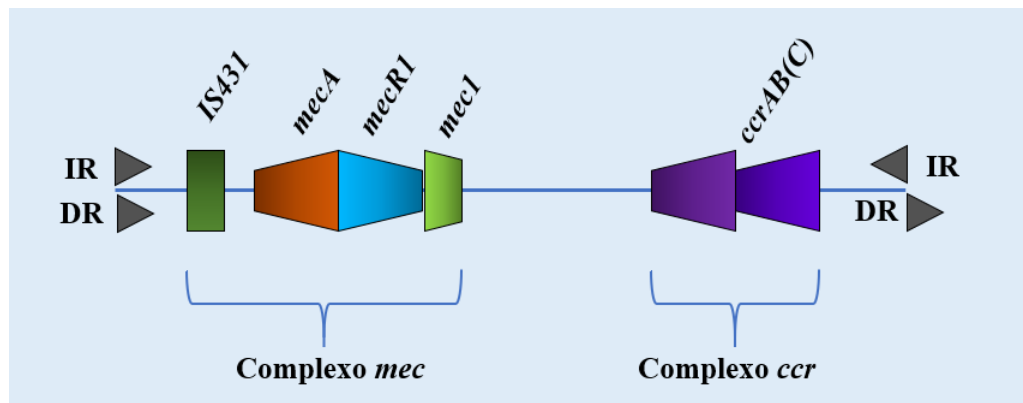


Figura 8- Estrutura básica do SCCmec constituído pelo complexo mec e complexo ccr (Adaptado de Hiramatsu et al., 2015).

8. MRSA de origem hospitalar e MRSA de origem comunitária

Como já foi referido anteriormente, os MRSA podem ser classificados de acordo com a sua origem em hospitalares (HA-MRSA) ou comunitários (CA-MRSA) (Alfouzan *et al.*, 2019).

Os MRSA de origem hospitalar (HA-MRSA) definem-se como isolados de *S. aureus* obtidos de pacientes com dois ou mais dias de hospitalização ou que apresentem fatores de risco (histórico de hospitalização recente, cirurgia, diálise, residência de longa data em estabelecimentos de cuidados de saúde, presença de um cateter de permanência ou dispositivo médico percutâneo) (Gnanamani *et al.*, 2017). Este agente apresenta resistência contra antibióticos não beta lactâmicos especialmente aminoglicosídeos, macrólidos, lincosamidas e fluoroquinolonas estando associado a infeções nosocomiais graves como endocardites (Kateete *et al.*, 2019). O fenótipo de multirresistência é conferido por determinantes de resistência presentes nos SCCmec de maior tamanho, nomeadamente do tipo I,II e III (Alfouzan *et al.*, 2019).

Os MRSA de origem comunitária (CA-MRSA) são isolados de *S. aureus* obtidos de pacientes até dois dias após a hospitalização e sem os fatores de risco acima mencionados (Gnanamani *et al.*, 2017). Genotipicamente as estirpes CA-MRSA são mais recentes e mais virulentas e tipicamente carregam consigo o SCCmec tipo IV ou V (Kateete *et al.*, 2019). Apesar de serem suscetíveis aos antibióticos não beta lactâmicos, estas estirpes geralmente possuem o gene para a leucocidina de Panton-Valentine, associada a uma maior virulência (Peng *et al.*, 2018). As infeções mais comuns provocadas por MRSA de origem comunitária são infeções da pele e tecidos moles apesar de poderem ocorrer infeções mais invasivas do trato respiratório bem como choque séptico (Choo, 2017).

9. *Staphylococcus aureus* e a cavidade oral

Apesar de não estarem diretamente envolvidos no processo de formação da cárie dentária, os membros do género *Staphylococcus* estão associados a diversas condições patológicas orais tais como como parotite supurativa, queilite angular, estomatite de dentadura e infeções dentoalveolares agudas (Koukos *et al.*, 2015).

Pessoas portadoras de dispositivos orais tais como aparelhos ortodônticos e próteses dentárias são mais suscetíveis ao desenvolvimento de doenças orais como cáries uma vez que estes dispositivos facilitam a acumulação de placa bacteriana devido à maior dificuldade na higienização (Cuesta *et al.*, 2010).

Como já é do conhecimento científico, a cavidade oral serve como porta de entrada para alguns microrganismos oportunistas. Algumas doenças orais podem facilmente levar ao desenvolvimento de infeções sistémicas graves e septicemias (Smith *et al.*, 2001).

Deste modo, uma vez que *S. aureus* é reconhecido como um dos mais importantes agentes patogénicos oportunistas torna-se particularmente importante avaliar a sua presença em pessoas que estão mais suscetíveis ao desenvolvimento dessas patologias, como portadores de aparelhos ortodônticos e próteses dentárias.

Por último, uma vez que a acumulação de placa bacteriana é o principal fator que contribui para o surgimento e progressão das doenças orais (Cuesta *et al.*, 2010), uma medida preventiva muito importante é a higienização oral adequada com recurso, muitas vezes, à utilização de antissépticos orais.

10. Clorexidina e Cloreto de cetilpiridínio

Descrita em 1954 como “o novo agente antibacteriano de elevada potência”, a clorexidina passou a ser muito utilizada na prática clínica e, na década de 70, foi introduzida na medicina dentária (Cieplik *et al.*, 2019). Capaz de inibir totalmente a formação da placa bacteriana e evitar o desenvolvimento de gengivites quando aplicada duas vezes ao dia a uma concentração de 0.2%, rapidamente se tornou no composto ativo mais frequentemente encontrado nos produtos de higiene oral (Cieplik *et al.*, 2019). O seu mecanismo de ação é semelhante ao cloreto de cetilpiridínio e baseia-se na disrupção da membrana celular causando inibição do crescimento e morte das bactérias. Apesar de possuírem um mecanismo de ação semelhante, a substantividade do cloreto de cetilpiridínio é inferior à da clorexidina e, por esse motivo, a sua eficácia parece ser inferior (Alves *et al.*, 2011). Para além disso, a clorexidina é ainda capaz de

inibir algumas enzimas proteolíticas e glicosídicas de elevada importância para o metabolismo bacteriano (Mcbain *et al.*, 2003).

O seu uso descontrolado nos primeiros anos levou, à semelhança do que acontece com os antibióticos, à emergência de estirpes resistentes. Atualmente, a resistência a este composto químico ocorre frequentemente em muitas bactérias, nomeadamente em *Staphylococcus aureus*. O mecanismo de resistência neste género está relacionado com a presença do gene *qac* (“quaternary ammonium compound”) que codifica proteínas de efluxo Qac que reconhecem o agente biocida e o “exportam” para fora da célula (Cieplik *et al.*, 2019).

A emergência de estirpes resistentes a este e outros agentes antissépticos não tem recebido grande atenção por parte da comunidade científica. No entanto, é preciso alertar para o facto da resistência a estes compostos estar diretamente relacionada com resistência a antibióticos uma vez que, nestes casos, a permeabilidade celular se encontra diminuída (Alves *et al.*, 2011).

II. Objetivos

O principal objetivo deste trabalho é isolar, identificar e caracterizar o perfil de resistência aos antibióticos de *S. aureus* sensíveis e resistentes à meticilina (MSSA e MRSA, respetivamente) provenientes de amostras de saliva recolhidas de pacientes submetidos a diferentes tratamentos médico-dentários. Para além disso, pretende-se ainda estudar a suscetibilidade dos isolados *S. aureus* à ação de dois antissépticos orais disponíveis comercialmente.

Objetivos específicos:

1. Isolar *Staphylococcus aureus* suscetíveis à meticilina e *Staphylococcus aureus* resistentes à meticilina através de meios de cultura específicos;
2. Identificar estirpes de *S. aureus* através de métodos bioquímicos;
3. Testar a suscetibilidade dos isolados de *S. aureus* frente a 14 agentes antimicrobianos (PEN, 10 µg; FOX,30 µg ; CIP,5 µg; K,30 µg; CN,10 µg; TOB,10 µg; ERY,15 µg; DA,2 µg; TET,30 µg; LNZ,30 µg; FD,10 µg; SXT,25 µg; MUP,5 µg; CHL,30 µg)
4. Testar a suscetibilidade dos isolados de *S. aureus* frente a dois agentes antissépticos (Cloroxidina e Cloreto de cetilpiridínio).

III. Material e métodos

1. Recolha de amostras

A recolha das amostras biológicas foi realizada durante a prática clínica com recurso a uma zaragatoa bucal em pacientes submetidos a diferentes tratamentos médico-dentários. As amostras foram recolhidas semanalmente durante um período de 4 meses (de outubro de 2019 a janeiro de 2020) no âmbito de um protocolo de cooperação científica com uma clínica dentária localizada no centro da cidade de Vila Real.

No total, foram recolhidas 127 amostras: 105 de pacientes com aparelho ortodôntico, 21 de pacientes com próteses e 1 de paciente com periodontite.

Os dados relativos à população em estudo encontram-se na **Tabela 3**. Relativamente ao sexo dos pacientes, 75 eram do sexo feminino e 52 do sexo masculino. A média de idades para indivíduos portadores de aparelho ortodôntico foi de 18 anos e para pacientes portadores de prótese foi de 67 anos. O único paciente com periodontite deste estudo tinha 38 anos de idade.

Tabela 3- Dados relativos à população em estudo

<i>Condição oral</i>	<i>Nº amostras</i>	<i>Média idades</i>	<i>Sexo (número de indivíduos)</i>	
			Feminino	Masculino
<i>Aparelho ortodôntico</i>	105	18	62	43
<i>Prótese</i>	21	67	12	9
<i>Periodontite</i>	1	38	1	
<i>Total</i>	127		75	52

2. Isolamento e identificação de *S. aureus* e MRSA

As amostras recolhidas foram inoculadas em meio líquido BHI (Brain Heart Infusion) suplementado com 6,5 % de NaCl e incubadas a 37° C durante 24h. Em seguida, o inóculo foi semeado em BPA (Baird Parker Agar), um meio diferencial e seletivo para o isolamento de *S. aureus*. Simultaneamente, foi semeado em ORSAB (Oxacillin Resistance Screening Agar Base), um meio suplementado com 2 mg/ml de oxacilina que permite identificar colónias de MRSA. As placas foram colocadas na estufa a 37° C durante 24h. As colónias foram posteriormente identificadas através de métodos bioquímicos: teste da DNase e catalase.

DNase: O teste da DNase é utilizado para verificar a capacidade de um microrganismo produzir desoxirribonuclease, uma enzima capaz de degradar DNA. Este teste é realizado em meio DNase agar. Primeiramente, o meio é inoculado com uma a duas colónias de microrganismo e incubado a 37°C durante 24h. Em seguida, coloca-se ácido clorídrico (1N) até cobrir a superfície do meio. Após alguns minutos, a formação de um halo transparente ao redor das colónias é indicador de resultado positivo. Este teste é útil para diferenciar *S. aureus* de outros *Staphylococcus* que não produzem a enzima em questão.

Catalase: O teste da catalase é utilizado para verificar a capacidade de um microrganismo produzir catalase, uma enzima responsável por neutralizar espécies reativas de oxigénio como o peróxido de hidrogénio. Para realizar este teste, coloca-se uma gota de peróxido de hidrogénio numa superfície limpa como uma placa de Petri. Em seguida, coloca-se uma a duas colónias de microrganismo sobre a gota de peróxido de hidrogénio. A rápida formação de bolhas de gás é indicador de um resultado positivo.

3. Teste de suscetibilidade aos antibióticos

A caracterização fenotípica de resistência aos antibióticos foi determinada pelo método de difusão em disco de Kirby-Bauer, descrito em 1966, sendo um método semi-quantitativo baseado na difusão. Este método consiste em distribuir diversos discos, que contêm diferentes antibióticos, sobre zonas distintas de uma placa de meio de cultura, Mueller-Hinton agar, inoculado com a estirpe bacteriana que se pretende estudar. Essas estirpes foram previamente suspensas em soro fisiológico (0,9%) até atingirem uma turvação equivalente a 0,5 na escala de McFarland. A avaliação da susceptibilidade foi realizada recorrendo às normas EUCAST (European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing) (2018) com exceção do

antibiótico canamicina que seguiu as normas CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute) (2017). O antibiótico difunde-se na periferia de cada disco influenciando o crescimento das bactérias formando o halo de inibição do crescimento. Colocaram-se as placas na estufa durante 24 horas a 37°C. De seguida, observou-se a zona de inibição para cada antibiótico e registou-se o seu diâmetro em milímetros. Foram utilizados 14 agentes antimicrobianos: mupirocina, tetraciclina, trimetoprim-sulfametoxazole, ácido fusídico, eritromicina, clindamicina, gentamicina, tobramicina, penicilina G, cefoxitina, cloranfenicol, ciprofloxacina, canamicina e linezolida (**Tabela 4**). Foram utilizados controlos positivos e negativos da coleção de estirpes da Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro.

Tabela 4- Agentes antimicrobianos utilizados e respetivas concentrações.

	<i>Antimicrobiano</i>	<i>Quantidade por disco</i>
<i>Penicilinas</i>	Benzilpenicilina/Penicilina G (PEN)	10 µg
<i>Cefalosporinas (2ª geração)</i>	Cefoxitina (FOX)	30 µg
<i>Fluoroquinolonas</i>	Ciprofloxacina (CIP)	5 µg
	Canamicina (K)	30 µg
<i>Aminoglicosídeos</i>	Gentamicina (CN)	10 µg
	Tobramicina (TOB)	10 µg
<i>Macrolídeos</i>	Eritromicina (ERY)	15 µg
<i>Lincosamidas</i>	Clindamicina (DA)	2 µg
<i>Tetraciclinas</i>	Tetraciclina (TET)	30 µg
<i>Oxazolidinonas</i>	Linezolida (LNZ)	30 µg
<i>Fusídanos</i>	Ácido fusídico (FD)	10 µg
<i>Sulfonamidas</i>	Trimetoprim-sulfametoxazol (SXT)	25 µg
<i>Outros agentes</i>	Mupirocina (MUP)	5 µg
	Cloranfenicol (CHL)	30 µg

4. Teste de suscetibilidade aos antissépticos

A caracterização fenotípica de resistência à clorexidina e cloreto de cetilpiridínio foi determinada, à semelhança do teste de suscetibilidade aos antibióticos, pelo método de difusão em disco de Kirby-Bauer. Para tal, foram utilizados dois produtos de higiene oral disponíveis comercialmente: GUM Paroex® e EluPerio®. A composição química de cada um deles encontra-se descrita na **Tabela 5**. As estirpes foram previamente suspensas em soro fisiológico (0,9%) com uma turvação equivalente a 0,5 na escala de McFarland. Em seguida pipetou-se 20 µl dos respetivos produtos comerciais para discos brancos que foram posteriormente distribuídos numa placa de Mueller-Hinton agar, semeada com a estirpe bacteriana em estudo. As placas foram colocadas na estufa durante 24 horas a 37°C. De seguida, observou-se a zona de inibição para cada produto e registou-se o seu diâmetro em milímetros.

Tabela 5- Nome comercial e respetiva composição química dos produtos utilizados.

<i>Produto</i>	<i>Composição Química (Composto ativo)</i>
<i>GUM Paroex®</i>	Digluconato de Clorohexidina (0.12%) + Cloreto de Cetilpiridínio
<i>EluPerio®</i>	Gluconato de Clorohexidina (0.12%)

IV. Resultados e discussão

1. Prevalência de *Staphylococcus aureus* e MRSA

Para facilitar a discussão dos resultados foram definidos dois principais grupos de estudo: grupo **aparelhos ortodônticos (AO)** e grupo **próteses dentárias (PD)**. Para além disso foi ainda considerado o grupo **Total** que engloba os dados relativos a ambos os grupos mais a amostra de periodontite.

Os resultados obtidos correspondentes à prevalência de *S. aureus* encontram-se na **Tabela 6**. Das 127 amostras analisadas neste estudo foram obtidos 33 (26%) isolados de *S. aureus* dos quais apenas um era resistente à meticilina (MRSA) (0.8%). A prevalência de *S. aureus* obtida neste estudo foi superior à apresentada por McCormack *et al.*, 2015 (18%) num estudo semelhante realizado na Grécia. No entanto, o valor obtido neste estudo vai de encontro com o

descrito pelo **Centro Europeu de Prevenção e Controlo das Doenças** que refere que aproximadamente 30% da população humana é naturalmente colonizada por esta bactéria (European Centre for Disease Prevention and Control (ECDC), 2012).

Das 105 amostras do grupo **AO** foram identificados 26 isolados *S.aureus* positivos, correspondendo a uma prevalência de 25% neste grupo. No grupo **PD**, das 21 amostras analisadas foi possível identificar 6 isolados *S.aureus* positivos, o que corresponde a uma prevalência de 29%. Um dos isolados do grupo **PD** corresponde a um MRSA, o único identificado neste trabalho.

Por último, na única amostra de periodontite não se identificou a presença de *S. aureus*. No entanto, este valor não pode ser considerado representativo, pois uma única amostra não é significativa. Em vários estudos já realizados em pacientes com periodontite, a prevalência de *S. aureus* tem uma grande variância (5.6-75%) pelo que a relação entre as doenças periodontais e a presença de *S.aureus* ainda não é bem compreendida (Koukos *et al.*, 2015). Para uma melhor compreensão deste tema seria necessário um maior número de amostras.

Tabela 6- Número de isolados de *S. aureus* e respetiva prevalência.

<i>Condição oral</i>	<i>Nº isolados de S.aureus (Prevalência %)</i>
<i>Aparelho ortodôntico</i>	27 (26%)
<i>Prótese</i>	6 (29%)
<i>Periodontite</i>	0
<i>Total</i>	33 (26%)

Curiosamente, ao contrário do que seria de esperar, a prevalência de *S. aureus* nos dois grupos em estudo (**AO** e **PD**) está dentro do valor considerado normal para indivíduos saudáveis (30%). No grupo **PD** verificou-se uma prevalência de *S. aureus* ligeiramente superior comparativamente ao grupo **AO**. Este ligeiro aumento pode ser explicado pelo facto de que este grupo comporta uma população maioritariamente idosa o que, por si só, e segundo vários autores, constitui um fator de risco que contribui para a incidência desta bactéria na cavidade oral. Segundo Kang *et al.*, 2011, pessoas idosas tem uma maior suscetibilidade a serem infetadas por esta bactéria provavelmente devido a presença de doenças crónicas nomeadamente *diabetes mellitus* e doenças neuronais. O mesmo autor também concluiu que este grupo populacional tem uma elevada taxa de mortalidade aquando da infeção por *S. aureus*,

sendo a bacteremia e pneumonia o tipo de infecções mais recorrentes nestas pessoas. Também o Centro Europeu de Prevenção e Controlo das Doenças identificou uma maior prevalência desta bactéria em pessoas com idade superior a 65 anos (64%). Por este motivo e dado o alto risco de mortalidade associado à infecção por *S. aureus* em pessoas idosas, é necessário ter particular atenção de modo a prevenir a transmissão deste agente entre este grupo populacional.

Um estudo realizado nos Estados Unidos revelou que 21% dos estudantes de uma escola de medicina dentária eram colonizados por MRSA's (Roberts *et al.*, 2011). O mesmo estudo analisou a presença de MRSA em superfícies e concluiu que 8,4% destas eram MRSA positivas. Deste modo, uma vez que estes meios podem ser considerados como uma perigosa fonte de contaminação, destaca-se a elevada importância do cumprimento dos protocolos de segurança microbiológica nas instalações clínicas em particular nas clínicas dentárias.

Como já foi referido anteriormente, embora não esteja diretamente envolvido no processo de formação da cárie, *S.aureus* é um importante agente patogénico oportunista. Pessoas portadoras de aparelho ortodôntico e prótese dentária estão mais suscetíveis ao desenvolvimento de doenças orais como cáries dentárias que podem ser uma porta de entrada para agentes oportunistas como *S.aureus* levando, por vezes, ao desenvolvimento de infecções mais graves. Por esse motivo, os resultados de prevalência obtidos são bastante positivos.

É importante salientar que a comparação entre estudos de prevalência é, muitas vezes, um grande desafio devido às diferentes abordagens que são realizadas pelos autores. Estas diferenças devem-se em grande parte aos diferentes métodos utilizados bem como ao tipo de amostragem que é realizado. Neste trabalho a amostragem foi feita num só local, a cavidade oral, e o método de identificação utilizado foram os meios de cultura tradicionais. Muitos dos estudos semelhantes utilizam métodos de identificação diferentes, com maior sensibilidade, o que por si só é suficiente para fazer variar os resultados. Deste modo, deve ter-se sempre em conta o tipo de metodologia utilizado neste tipo de trabalhos aquando da comparação dos resultados obtidos.

2. Distribuição dos isolados *S. aureus* de acordo com o Sexo

Neste trabalho foram analisadas amostras biológicas de 127 pacientes: 75 do sexo feminino e 52 do sexo masculino.

Para o grupo **AO**, das 62 mulheres participantes, 14 eram portadoras de *S.aureus* na cavidade oral, correspondendo a uma prevalência de aproximadamente 23%. Dos 43 homens testados, 13 foram identificados como positivos para a bactéria em estudo, ou seja 30%.

No grupo **PD**, 3 das 12 mulheres e 3 dos 9 homens participantes neste estudo foram também identificados como portadores de *S.aureus* na cavidade oral, correspondendo a uma prevalência de 25% e 33%, respectivamente.

No **Total**, das 75 mulheres testadas, 17 eram portadoras de *S.aureus*. De modo semelhante, dos 52 homens, 17 eram também portadores. Deste modo, a prevalência de *S.aureus* para o sexo feminino foi de aproximadamente 23% enquanto que para o sexo masculino esse valor foi de 30%.

Assim sendo, a prevalência de *S.aureus* neste trabalho foi superior no sexo masculino (30%) relativamente ao sexo feminino (23%). Esta tendência verificou-se em ambos os grupos de estudo (**Tabela 7**).

Tabela 7- Prevalência (%) de *S.aureus* de acordo com o sexo.

	<i>Feminino</i>	<i>Masculino</i>
<i>Grupo AO</i>	23%	30%
<i>Grupo PD</i>	25%	33%
<i>Total</i>	23%	30%

3. Caracterização fenotípica dos isolados de *S. aureus*

O teste de suscetibilidade aos antibióticos foi realizado nos 33 isolados *S. aureus* positivos. O número e respectiva percentagem de isolados resistentes a esses mesmos antibióticos encontra-se na **Tabela 8**. De uma forma geral, e segundo as normas EUCAST, os 33 isolados de *S. aureus* apresentam resistência, por ordem decrescente, à gentamicina (CN, n=29), tobramicina (TOB, n=26), penicilina (PEN, n=16), eritromicina (ERY, n=9), ácido fusídico (FD, n=5), cefoxitina (FOX, n=2), canamicina (K, n=2), ciprofloxacina (CIP, n=1), clindamicina (DA, n=1), e tetraciclina (TET, n=1).

Tabela 8- Número e percentagem de resistências por antibiótico.

Nome do Antibiótico	Resistências Nº(%)
Gentamicina (CN)	29 (87.9)
Tobramicina (TOB)	26 (78.8)
Benzilpenicilina/Penicilina G (PEN)	16 (48.5)
Eritromicina (ERY)	9 (27.2)
Ácido fusídico (FD)	5 (15.2)
Cefoxitina (FOX)	2 (6.0)
Canamicina (K)	2 (6.0)
Ciprofloxacina (CIP)	1 (3.0)
Clindamicina (DA)	1 (3.0)
Tetraciclina (TET)	1 (3.0)
Trimetoprim-sulfametoxazol (SXT)	0 (0.0)
Mupirocina (MUP)	0 (0.0)
Linezolida (LNZ)	0 (0.0)
Cloranfenicol (CHL)	0 (0.0)

No grupo **AO** vinte e três isolados (85,2%) apresentaram resistência à gentamicina, dezanove (70,4%) à tobramicina, onze (40,7%) à penicilina, nove (33,3%) à eritromicina, três (11,1%) ao ácido fusídico, dois (7,4%) à canamicina e um (3,7%) à cefoxitina.

No grupo **PD**, todos os isolados (100%) apresentaram resistência à gentamicina e tobramicina, cinco (83,3%) à penicilina, dois (33,3%) ao ácido fusídico e um (16,6%) á cefoxitina, ciprofloxacina, clindamicina e tetraciclina (**Gráfico 1**).

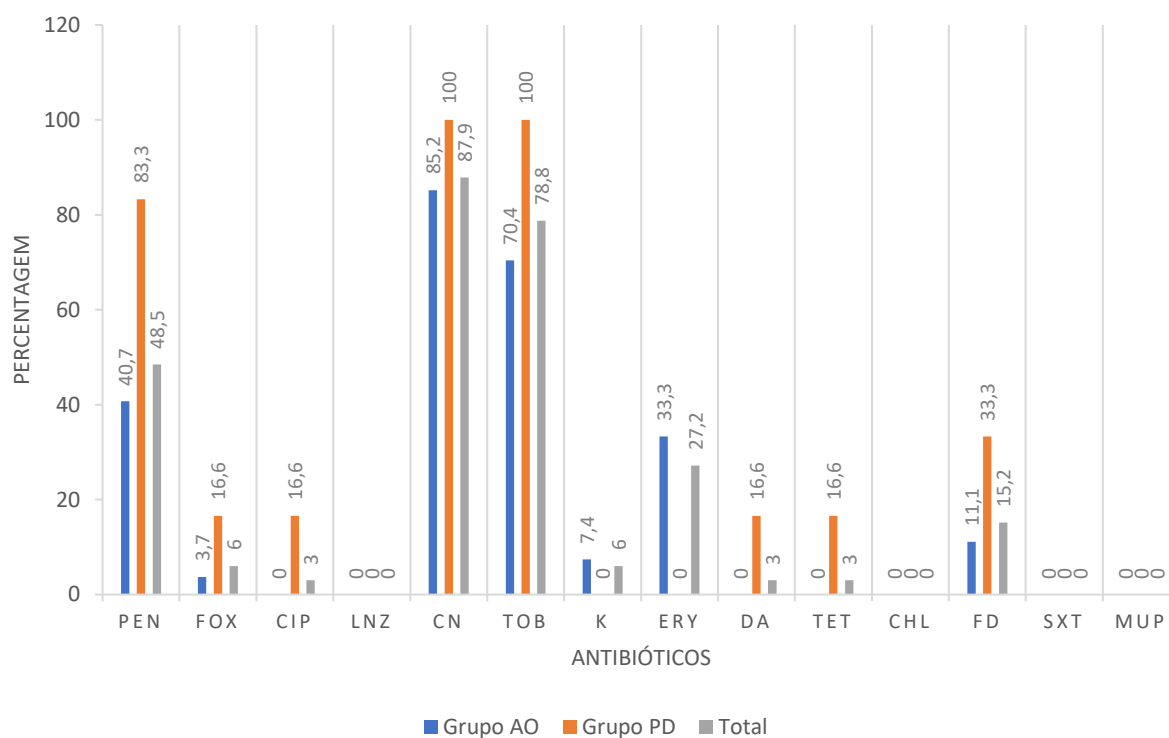


Gráfico 1- Percentagens de resistência aos diferentes antibióticos nos dois grupos e total.

Comparando as resistências nos dois grupos verificamos que a resistência à penicilina é muito mais frequente no grupo **PD** (83,8%) comparativamente ao grupo **AO** (40,7%). Também a resistência ao ácido fusídico foi três vezes superior nesse grupo. Pelo contrário, a resistência à eritromicina que ocorre em um terço dos isolados do grupo **AO** não se verificou em nenhum isolado do grupo **PD**. Para ambos os grupos a percentagem resistência aos aminoglicosídeos gentamicina e tobramicina foi bastante elevada (>70%).

Em nenhum dos grupos houve resistência ao trimetoprim-sulfametoxazol, mupirocina, cloranfenicol e linezolida. Para além disso, dos 33 isolados de *S. aureus*, apenas o isolado MRSA apresentou resistência a mais do que três classes de antibióticos, tendo sido considerado como **multirresistente**. Esse isolado apresentou resistência fenotípica a **oito** antibióticos testados nomeadamente penicilina, cefoxitina, ciprofloxacina, gentamicina, tobramicina, clindamicina, tetraciclina e ácido fusídico.

Neste trabalho 88% dos isolados de *S. aureus* apresentaram resistência a, pelo menos, um antibiótico da classe dos **aminoglicosídeos**. Esta é uma característica bastante comum das bactérias do género *Staphylococcus* (González-domínguez et al., 2015). Os isolados apresentaram resistência à **gentamicina**, isoladamente ou em combinação com a **tobramicina**. Em contraste com estes dois aminoglicosídeos, a resistência à canamicina apenas foi verificada em dois isolados (6%). A percentagem de isolados resistentes a gentamicina obtida neste trabalho é muito superior à obtida por Vitale *et al.*, 2019 que relatou 21,4% de resistência a este antibiótico. A elevada percentagem de resistência aos aminoglicosídeos obtida neste trabalho é de relevante importância uma vez que, esta continua a ser uma das classes de antibióticos mais utilizadas no tratamento de infeções por *Staphylococcus* spp., muitas vezes, em combinação com outros antibióticos beta-lactâmicos resultando num efeito sinérgico (Dokht et al., 2017). A resistência aos aminoglicosídeos ocorre, na maioria das vezes, pela produção e segregação de enzimas modificadoras de aminoglicosídeos (AME's). No entanto, para afirmar com clareza que este é o método de resistência aqui implicado seriam necessários estudos moleculares complementares.

A segunda classe de antibióticos que contou com maior número de resistências foram os **beta-lactâmicos**, representados neste trabalho pela **penicilina**. Aproximadamente 49% dos isolados apresentaram resistência a este antibiótico, provavelmente através dos mecanismos de resistência aos beta-lactâmicos já elucidados neste trabalho. Segundo o **Centro Europeu de Prevenção e Controlo das Doenças**, Portugal tem um consumo estimado de 18,6 doses diárias definidas (DDD's) de antibióticos por 1000 habitantes por dia. De acordo com esta organização, as penicilinas são os antibióticos mais frequentemente prescritos em todo mundo, nomeadamente em Portugal, correspondendo a 85% dos beta-lactâmicos prescritos (9,2 de 10,8 DDD's) (European Centre for Disease Prevention and Control (ECDC), 2019). Esta tendência no consumo dos beta-lactâmicos pode estar na base da emergência de *S. aureus* resistentes a antibióticos desta classe. Apesar de praticamente metade dos isolados deste trabalho apresentarem resistência fenotípica à penicilina, o valor obtido (49%) é bastante inferior comparativamente ao estudo de Vitale *et al.*, 2019 que obteve 87,5% de resistência a este antibiótico.

Também a eritromicina, pertencente ao grupo dos macrólidos, apresentou um número significativo de resistências, correspondendo a 27% dos isolados. Curiosamente, nenhum dos isolados do grupo **PD** apresentou resistência a este antibiótico. No entanto, o número de isolados neste grupo é bastante pequeno pelo que seria necessária uma amostra maior para tirar

conclusões mais específicas. A resistência à eritromicina obtida neste trabalho foi bastante superior à obtida no estudo de Chakolwa *et al.*, 2019 que obteve cerca de 10% de resistência a este antibiótico em amostras biológicas de trabalhadores hospitalares. Porém, o resultado obtido neste trabalho foi muito próximo ao de Flamm *et al.*, 2016 com 27,4% de resistência.

Como já foi referido anteriormente, nenhum dos isolados apresentou resistência aos antibióticos trimetoprim-sulfametoxazol, mupirocina, cloranfenicol e Linezolida. A alta suscetibilidade dos isolados a estes antibióticos pode estar relacionada com diferentes fatores.

No caso do **trimetoprim-sulfametoxazol** essa suscetibilidade deve-se, muito provavelmente, ao facto de este ser um antibiótico muito pouco utilizado nos países Europeus nomeadamente em Portugal (European Centre for Disease Prevention and Control (ECDC), 2019). De acordo com vários estudos, *S.aureus* tem se mantido altamente suscetível a este antibiótico nos últimos anos com taxas de resistência inferiores a 3% (Kaka *et al.*, 2006) . No entanto, um estudo recente demonstrou que de 2005 a 2017 a resistência ao trimetoprim-sulfametoxazol aumentou significativamente para estirpes de MRSA (de 2 para 13%), embora se tenha mantido relativamente constante para isolados MSSA (de 5 para 7%).

Relativamente à **mupirocina** esta é utilizada principalmente em fórmula tópica para o tratamento de infeções por MRSA. Esta característica seletiva na sua utilização faz com que a ocorrência de resistência a este antibiótico seja mais frequente em estirpes MRSA quando comparado com estirpes MSSA (Rudresh *et al.*, 2015). De facto, Dadashi *et al.*, 2020 demonstraram que a prevalência de resistência à mupirocina é superior em MRSA (13,8%) quando comparada com MSSA (7,6%). Segundo os mesmos autores a resistência a este antibiótico varia de acordo com a região geográfica com valores mais baixos na Europa e Asia (6,6 e 7,3%, respetivamente) em contraste com valores mais elevados nos países Americanos (10,5%). Para além disso Sanju *et al.*, 2015 reportaram uma maior incidência da resistência à mupirocina em CoNS (14,3%) em comparação com MRSA e MSSA (2,2 e 2,9%, respetivamente).

A **Linezolida** é o primeiro antibiótico pertencente à classe das oxazolidinonas, altamente eficaz no tratamento de infeções por bactérias Gram positivas como *S. aureus*. O facto de este ser um antibiótico relativamente recente (introduzida no início dos anos 2000) pode estar na base da elevada suscetibilidade ao mesmo (Watkins *et al.*, 2012). Para além disso, este antibiótico possui um mecanismo de ação particular envolvendo a inibição da síntese proteica numa fase muito precoce, o que impede que exista resistência cruzada com outros antibióticos já existentes (Bialvaei *et al.*, 2016). De acordo com o programa **LEADER**

(Linezolid Experience and Accurate Determination of Resistance) com dados relativos ao ano de 2014 nos Estados Unidos, *S. aureus* apresentou uma elevada taxa de suscetibilidade à Linezolida com 100% dos isolados MSSA reportados suscetíveis e 99,9% para isolados de MRSA (Flamm *et al.*, 2016). De acordo com o mesmo estudo, a resistência à Linezolida ocorre em apenas 0.10% dos isolados de *S.aureus*, um dado que se tem mantido relativamente constante desde 2007.

Por último, a elevada suscetibilidade ao **cloranfenicol** está, muito provavelmente, relacionada com o seu desuso nos últimos anos. Este antibiótico deixou de ser utilizado rotineiramente na prática clínica devido aos seus perigosos efeitos colaterais nomeadamente o desenvolvimento de aplasia medular (Nitzan *et al.*, 2015). Deste modo, tem-se verificado um aumento significativo da suscetibilidade a este antibiótico em vários países. Um estudo realizado na Índia reportou taxas de suscetibilidade ao cloranfenicol superiores a 90% em isolados de *Salmonella typhi* e *paratyphi* (Garg *et al.*, 2013). Em Nitzan *et al.*, 2015 foi verificada uma suscetibilidade de 100% para VRE's e de 73 a 100% para *Staphylococcus aureus*. Para além disso, uma revisão literária de 113 estudos acerca da atividade do cloranfenicol contra patógenos ESKAPE ((*Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Enterobacter spp.*) revelou altas taxas de suscetibilidade entre bactérias Gram positivas nomeadamente *S. aureus*. Os autores concluíram que a atividade do cloranfenicol contra MRSA é satisfatória tendo uma taxa de suscetibilidade superior a 70% na maioria dos estudos analisados, particularmente nos países desenvolvidos, revelando que existe pouca pressão seletiva associada a este antibiótico nesses países. Pelo contrário, nos países em desenvolvimento a resistência ao cloranfenicol é bastante frequente com valores próximos de 100% em alguns países Africanos, o que pode estar relacionado com o alto consumo deste antibiótico devido ao seu baixo custo (Bella *et al.*, 2014).

Resumidamente, tanto os aminoglicosídeos como os beta-lactâmicos são duas classes de antibióticos com um elevado consumo mundial (European Centre for Disease Prevention and Control (ECDC), 2019). Assim sendo, os resultados obtidos neste trabalho são bastante expectáveis uma vez que, estas duas classes foram aquelas que contaram com maior número de resistências. Deste modo, é possível fazer uma ligação entre o consumo exagerado de determinados antibióticos e a emergência de estirpes resistentes aos mesmos, destacando-se assim a importância de moderar o consumo destes antimicrobianos bem como sensibilizar a população para a toma adequada dos mesmos. Para além disso, é também crucial investir em

bons métodos de diagnóstico para que a prescrição destes medicamentos nos hospitais seja a mais correta com fim a abrandar a emergência de novas estirpes resistentes.

4. Suscetibilidade aos antissépticos

O teste de suscetibilidade à clorexidina e cloreto de cetilpiridínio foi realizado nos 33 isolados *S.aureus* positivos. Em ambos os grupos (Clorexidina e Clorexidina + Cloreto de cetilpiridínio), para todos os isolados, houve a formação de um halo de inibição com, em média, 10 milímetros de diâmetro.

As bactérias podem ser classificadas como insuscetíveis, fenotipicamente tolerantes, tolerantes ou resistentes a um antisséptico (Horner *et al.*, 2012). Para as bactérias do género *Staphylococcus* a resistência à clorexidina é geralmente definida como uma MIC ≥ 4 mg/L (Alam *et al.*, 2003)(Wang *et al.*, 2008). No entanto, existe uma grande discórdia entre os autores quanto a esta definição uma vez que muitos não consideram o método da **concentração inibitória mínima** (MIC) adequado para medir a suscetibilidade. Isto porque, quando se trata de agentes biocidas é mais importante avaliar a sua ação bactericida do que bacteriostática (Hardy *et al.*, 2018). Para além disso, *in vitro*, as bactérias são testadas contra concentrações de biocida muito mais baixas do que aquelas que se utilizam na prática. Deste modo, a sobrevivência de uma bactéria a uma concentração de 4-32 mg/L não necessariamente garante a sobrevivência dessa bactéria a uma concentração muito mais elevada como ocorre na prática (40000 mg/L numa solução aquosa de clorexidina a 4%) (Platt e Bucknall, 1988). Por este motivo, a realização do **Time Kill** assay e a determinação da **concentração bactericida mínima** (MBC) parecem ser mais apropriados (Walker e Lowes, 1985). Assim sendo, dadas estas diferenças, muitos autores preferem utilizar o termo “**suscetibilidade reduzida**” em vez de “resistência” quando se trata de agentes biocidas.

Neste trabalho, o método utilizado para avaliar a suscetibilidade foi o método de difusão em disco. Alguns autores referem que este não é o mais adequado para testar a suscetibilidade da clorexidina uma vez que esta possui uma baixa taxa de difusão em agar sólido (Suller e Russell, 1999). Deste modo, o método utilizado neste trabalho pode ter condicionado os resultados uma vez que, se a clorexidina não se difundir naturalmente através do agar sólido haverá sempre crescimento bacteriano. Para além disso, o facto de não existirem valores de *breakpoint* definidos para estes casos torna difícil standardizar e interpretar o significado dos

resultados obtidos. Para uma melhor avaliação deveriam ter sido utilizados métodos mais adequados como os que já foram referidos.

Como já foi abordado neste trabalho, a resistência à clorexidina está associada à presença do gene *qac* (Cieplik *et al.*, 2019). No entanto, a presença deste gene não significa necessariamente que o isolado irá expressar resistência fenotípica ao agente. De modo semelhante, a resistência ao agente biocida pode ser expressa sem a presença do gene (Horner *et al.*, 2012).

Atualmente, sabe-se que à semelhança do que acontece com os antibióticos, o aumento do uso da clorexidina pode estar relacionado com a emergência da baixa suscetibilidade a este agente biocida que se reflete pelo aumento dos valores de concentração inibitória mínima (MIC) e concentração bactericida mínima (MBC) em estudos *in vitro* (Hardy *et al.*, 2018).

Comparando os valores da MIC com os valores de concentração utilizados na prática é pouco provável que a eficácia clínica dos agentes biocidas seja afetada, uma vez que são utilizados a concentrações muitíssimo mais elevadas. No entanto, é necessária uma maior atenção por parte da comunidade científica para este assunto pois a emergência de isolados com valores de MIC cada vez mais elevados sugere que existe alguma pressão seletiva (Hardy *et al.*, 2018). Para acrescentar, o aumento do uso dos antissépticos na prática clínica não foi acompanhado de uma maior vigilância na sua utilização o que pode trazer consequências mais graves no futuro.

V. Conclusão

A prevalência de *Staphylococcus aureus* entre os grupos definidos neste estudo vai de encontro com o valor esperado para indivíduos saudáveis. A princípio, esta conclusão vai em sentido contrário ao que seria de esperar, uma vez que, os grupos de estudo definidos neste trabalho aportam dispositivos que facilitam a acumulação de placa bacteriana. Os resultados obtidos neste estudo sugerem que não existe qualquer relação entre a utilização de dispositivos orais e a presença de *S. aureus* bem como de MRSA na cavidade oral. No entanto, outros estudos neste campo, com uma amostra de maior dimensão, seriam importantes para uma melhor compreensão do assunto. Para além disso, é ainda possível inferir que os protocolos de higiene e segurança microbiológica são corretamente implementados na instalação clínica em causa, impedindo assim que esta bactéria se dissemine entre os pacientes.

Neste trabalho também foi possível verificar que os isolados apresentaram resistência a várias classes de antibióticos, em particular aos beta-lactâmicos e aminoglicosídeos. A resistência a estas duas classes de antibióticos é motivo de particular preocupação uma vez que, estes antibióticos são frequentemente utilizados na prática clínica. Em contrapartida, nenhum dos isolados apresentou resistência ao trimetoprim-sulfametoxazol, mupirocina, cloranfenicol e linezolida, o que torna estes antimicrobianos uma boa escolha para o tratamento de infeções por estas estirpes bacterianas.

Por último, neste estudo também foi possível avaliar o poder antimicrobiano da clorexidina, individualmente e em combinação com o cloreto de cetilpiridínio. A formação de um halo de inibição, ainda que pequeno, permite- concluir que existe algum grau de inibição do crescimento bacteriano. No entanto, devido à ausência de valores de *breakpoint* definidos para avaliar a suscetibilidade aos agentes biocidas não é possível chegar à conclusão se as bactérias são resistentes ou suscetíveis ao composto em questão. Para além disso, existe um grande desentendimento entre os autores sobre qual o método mais apropriado, sendo que alguns não consideram o método de difusão em disco uma boa escolha.

Este trabalho, assim como outros neste campo, são de grande relevo na medida que nos permitem tomar consciência da importância do conhecimento das características de cada estirpe bacteriana em particular e dos seus padrões de suscetibilidade antimicrobiana, de modo a facilitar a escolha da melhor terapia antimicrobiana, evitando assim o uso indevido dos antibióticos, um dos principais fatores que leva à emergência das resistências.

É ainda importante salientar que este é um estudo pioneiro neste campo e, por isso, a falta de informação disponível foi um fator que condicionou a discussão dos resultados. Para uma melhor compreensão deste tema, futuros e mais detalhados estudos serão necessários.

VI. Referências

- Alam, M. M., Kobayashi, N., Uehara, N., e Watanabe, N. (2003) Analysis on distribution and genomic diversity of high-level antiseptic resistance genes *qacA* and *qacB* in human clinical isolates of *Staphylococcus aureus*. *Microbial drug resistance (Larchmont, N.Y.)*, 9(2), 109–121.
- Alfouzan, W., Udo, E. E., Modhaffer, A., e Alosaimi, A. (2019) Molecular Characterization of Methicillin- Resistant *Staphylococcus aureus* in a Tertiary Care hospital in Kuwait. *Nature*, 1–8.
- Alves, D., Costa, A. L., Almeida, R. F., Carvalho, J. F. C., e Felino, A. (2011) Cloreto de cetilpiridínio - revisão da literatura. *Revista Portuguesa de Estomatologia, Medicina Dentária e Cirurgia Maxilofacial*, 53(3), 181–189.
- Ardic, N. A., Sareyyupoglu, B., e Ozyurt, M. (2006) Investigation of aminoglycoside modifying enzyme genes in methicillin-resistant staphylococci. *Microbiological Research*, 161, 49–54.
- Azucena, E., e Mobashery, S. (2001) Aminoglycoside-modifying enzymes : mechanisms of catalytic processes and inhibition. *Drug Resistance Updates* (p. 106–117).
- Bella, S. Di, Civljak, R., Giannella, M., e Petrosillo, N. (2014) Could chloramphenicol be used against ESKAPE pathogens ? A review of in vitro data in the literature from the 21st century., (January).
- Benkerroum, N. (2018) Staphylococcal enterotoxins and enterotoxin-like toxins with special reference to dairy products : An overview. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 1–28.
- Bezar, I. F., Mashruwala, A. A., Boyd, J. M., e Stock, A. M. (2019) Drug-like Fragments Inhibit agr-Mediated Virulence Expression in *Staphylococcus aureus*. *Scientific Reports*, 1–14.
- Bialvaei, A. Z., Rahbar, M., Yousefi, M., Asgharzadeh, M., e Kafil, H. S. (2016) Linezolid: a promising option in the treatment of Gram-positives., (December), 354–364.
- Binda, E., Marinelli, F., e Marcone, G. L. (2014) Old and New Glycopeptide Antibiotics: Action and Resistance. S. Vakulenko (Ed), *Antibiotics* (3^o ed, p. 572–594).
- Blondeau, J. M., Ccm, R. S. M., e Aam, S. M. (2004) Fluoroquinolones : Mechanism of Action , Classification , and Development of Resistance. *Survey of ophthalmology* (Vol. 49, p. S73–S78).
- Boyle-vavra, S., e Daum, R. S. (2007) Community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* : the role of Panton – Valentine leukocidin. *Laboratory Investigation*, 3–9.
- Bush, K., Courvalin, P., Dantas, G., Davies, J., Eisenstein, B., Huovinen, P., Jacoby, G. A., Kishony, R., Kreiswirth, B. N., Kutter, E., Lerner, S. A., Levy, S., Lewis, K., Lomovskaya, O., Miller, J. H., Mobashery, S., Piddock, L. J. V, Projan, S., Thomas, C. M., Tomasz, A., Tulkens, P. M., Walsh, T. R., Watson, J. D., Witkowski, J., Witte, W., Wright, G., Yeh, P., e Zgurskaya, H. I.

- (2011) Tackling antibiotic resistance. *Nature Reviews Microbiology*, 9(12), 894–896.
- Chakolwa, G., Tillika, M., Kwenda, G., Mulundu, G., Mwansa, J., Mudenda, B., Simulundu, E., e Lukwesa, C. (2019) Carriage rate and antimicrobial resistance profiles of *Staphylococcus aureus* among healthcare workers at a large tertiary referral hospital in Lusaka , Zambia. *Scientific African*, 5.
- Chongtrakool, P., Ito, T., Ma, X. X., Kondo, Y., Trakulsomboon, S., Tiensasitorn, C., Jamklang, M., Chavalit, T., Song, J., e Hiramatsu, K. (2006) Staphylococcal Cassette Chromosome mec (SCC mec) Typing of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Strains Isolated in 11 Asian Countries : a Proposal for a New Nomenclature for SCC mec Elements. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 50(3), 1001–1012.
- Choo, E. J. (2017) Community-Associated Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* in Nosocomial Infections. *Infection & Chemotherapy*, 49(2), 158–159.
- Chopra, I., e Roberts, M. (2001) Tetracycline Antibiotics : Mode of Action , Applications , Molecular Biology , and Epidemiology of Bacterial Resistance. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 65(2), 232–260.
- Chukwudi, C. U. (2016) rRNA Binding Sites and the Molecular Mechanism of Action of the Tetracyclines. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 60(8), 4433–4441.
- Cieplik, F., Jakubovics, N. S., Buchalla, W., Maisch, T., Hellwig, E., Al-ahmad, A., e Devine, D. A. (2019) Resistance Toward Chlorhexidine in Oral Bacteria – Is There Cause for Concern ?, 10(March).
- Clement, S., Vaudaux, P., Francois, P., Schrenzel, J., Huggler, E., Kampf, S., Chaponnier, C., Lew, D., e Lacroix, J. (2005) Evidence of an Intracellular Reservoir in the Nasal Mucosa of Patients with Recurrent *Staphylococcus aureus* Rhinosinusitis. *The Journal of Infectious Diseases*, 1023–1028.
- Cuesta, A. I., Jewtuchowicz, V., Brusca, M. I., Nastri, M. L., e Rosa, A. C. (2010) Prevalence of *Staphylococcus* spp and *Candida* spp in the oral cavity and periodontal pockets of periodontal disease patients. *Acta odontologica latinoamericana* (Vol. 23, p. 20–26).
- Dadashi, M., Hajikhani, B., Darban-Sarokhalil, D., Belkum, A. van, e Goudarzi, M. (2020) Journal of Global Antimicrobial Resistance Mupirocin resistance in *Staphylococcus aureus* : A systematic review and meta-analysis. *Integrative Medicine Research*, 20, 238–247.
- Dokht, A., Jenabi, A., e Abbasi, E. (2017) Distribution of genes encoding resistance to aminoglycoside modifying enzymes in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) strains. *Kaohsiung Journal of Medical Sciences*, 33(12), 587–593.

- Etebu, E., e Ariekpar, I. (2017) Antibiotics : Classification and mechanisms of action with emphasis on molecular perspectives. *International Journal of Applied Microbiology and Biotechnology Research*, 90–101.
- European Centre for Disease Prevention and Control (ECDC). (2012) *Antimicrobial resistance surveillance in Europe, 2012 Annual report of the European Antimicrobial Resistance Surveillance Network (EARS-Net)*.
- European Centre for Disease Prevention and Control (ECDC). (2019) Antimicrobial consumption in the EU / EEA Annual epidemiological report for 2018 Key facts., (November), 1–24.
- Faden, A. (2018) Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) screening of hospital dental clinic surfaces. *Saudi Journal of Biological Sciences*, 4–7.
- Flamm, R. K., Mendes, R. E., Hogan, P. A., Streit, J. M., Ross, J. E., e Jones, R. N. (2016) Linezolid Surveillance Results for the United States (LEADER Surveillance Program 2014), 60(4), 2273–2280.
- Foster, T. J. (2017) Antibiotic resistance in *Staphylococcus aureus* . Current status and future prospects. *FEMS Microbiology Reviews*, (February), 430–449.
- Fuda, C. C. S., Fisher, J. F., e Mobashery, S. (2005) β -Lactam resistance in *Staphylococcus aureus*: the adaptive resistance of a plastic genome. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 62, 2617–2633.
- Garg, N., Tewari, R., Gupta, V., Kapil, A., Kumar, S., e Rishi, P. (2013) Current antibiogram and clonal relatedness among drug-resistant *Salmonella enterica* serovar Typhi in Northern India. *Microbial drug resistance (Larchmont, N.Y.)*, 19(3), 204–211.
- Gaynor, M., e Mankin, A. S. (2003) Macrolide Antibiotics : Binding Site , Mechanism of Action , Resistance. *Current Topics in Medicinal Chemistry*, 949–960.
- Gnanamani, A., Hariharan, P., e Paul-Satyaseela, M. (2017) *Staphylococcus aureus* : Overview of Bacteriology , Clinical Diseases , Epidemiology , Antibiotic Resistance and Therapeutic Approach. *Frontiers in Staphylococcus aureus* (p. 11–12).
- Gordon, R. J., e Lowy, F. D. (2008) Pathogenesis of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Infection. *Clinical Infectious Diseases*, 10032.
- Greenlee-wacker, M., Deleo, F. R., e Nauseef, W. M. (2015) How methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* evade neutrophil killing. *Current Opinion in Microbiology*, 22(1), 30–35.
- Guerra, F. E., Borgogna, T. R., Patel, D. M., e Sward, E. W. (2017) Epic Immune Battles of History : Neutrophils vs . *Staphylococcus aureus*. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*,

7(June), 1–19.

- Hardy, K., Sunnucks, K., Gil, H., Shabir, S., Trampari, E., Hawkey, P., e Webber, M. (2018) Increased Usage of Antiseptics Is Associated with Reduced Susceptibility in Clinical Isolates of *Staphylococcus aureus*., 1–10.
- Harkins, C. P., Pichon, B., Doumith, M., Parkhill, J., Westh, H., Tomasz, A., Lencastre, H. De, Bentley, S. D., Kearns, A. M., e Holden, M. T. G. (2017) Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* emerged long before the introduction of methicillin into clinical practice., 1–11.
- Hiramatsu, K., Katayama, Y., Matsuo, M., Sasaki, T., Morimoto, Y., Sekiguchi, A., e Baba, T. (2015) Multi-drug-resistant *Staphylococcus aureus* and future chemotherapy. *Journal of Infection and Chemotherapy*, 20(10), 593–601.
- Horner, C., Mawer, D., e Wilcox, M. (2012) Reduced susceptibility to chlorhexidine in staphylococci : is it increasing and does it matter ?, (July), 2547–2559.
- Hussain, M., Grundmeier, M., Bru, M., Lo, B., Varga, G., Roth, J., Kahl, B. C., Proctor, R. A., e Peters, G. (2010) *Staphylococcus aureus* Pantón-Valentine Leukocidin Is a Very Potent Cytotoxic Factor for Human Neutrophils. *PLoS Pathogens*, 6(1).
- Ida, T., Okamoto, R., Shimauchi, C., Okubo, T., Kuga, A., e Inoue, M. (2001) Identification of Aminoglycoside-Modifying Enzymes by Susceptibility Testing : Epidemiology of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* in Japan. *Journal of Clinical Microbiology*, 39(9), 3115–3121.
- Jensen, S. O., e Lyon, B. R. (2009) Genetics of antimicrobial resistance in *Staphylococcus aureus*. *Future Microbiology*, 565–582.
- Jenul, C., e Horswill, A. R. (2019) Regulation of *Staphylococcus aureus* virulence. *Microbiology Spectrum*, 6(1), 3–31.
- Joubert, O., Tranier, S., Werner, S., Colin, D. A., Serra, M. D., Keller, D., Monteil, H., Mourey, L., e Pr, G. (2007) Distinction between Pore Assembly by Staphylococcal α -Toxin versus Leukotoxins. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*, 2007.
- Jung, P., Abdelbary, M. M. H., Kraushaar, B., Fetsch, A., Geisel, J., Herrmann, M., Witte, W., Cuny, C., e Bischoff, M. (2016) Impact of bacteriophage Saint 3 carriage on the immune evasion capacity and hemolytic potential of *Staphylococcus aureus* CC398. *Veterinary Microbiology*, (2015).
- Kaka, A. S., Rueda, A. M., Iii, S. A. S., Hulten, K., Hamill, R. J., e Musher, D. M. (2006) Bactericidal activity of orally available agents against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*., (July), 680–683.

- Kang, C., Song, J., Soo, K., Ryeon, D., e Ran, K. (2011) International Journal of Infectious Diseases Clinical features and outcome of *Staphylococcus aureus* infection in elderly versus younger adult patients. *International Journal of Infectious Diseases*, 15(1), e58–e62.
- Karauzum, H., Datta, S. K., Unit, B. P., e Diseases, I. (2017) Adaptive immunity against *Staphylococcus aureus*. *Current Topics in Microbiology and Immunology*, 1–19.
- Kateete, D. P., Bwanga, F., Seni, J., Mayanja, R., Kigozi, E., Mujuni, B., Ashaba, F. K., Baluku, H., Najjuka, C. F., Källander, K., Rutebemberwa, E., Asiimwe, B. B., e Joloba, M. L. (2019) CA-MRSA and HA-MRSA coexist in community and hospital settings in Uganda. *Antimicrobial Resistance and Infection Control*, 1, 1–9.
- Koukos, G., Sakellari, D., Arsenakis, M., Tsalikis, L., Slini, T., e Konstantinidis, A. (2015) Prevalence of *Staphylococcus aureus* and methicillin resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) in the oral cavity. *Archives of Oral Biology*, 60(9), 1410–1415.
- Krishna, S., e Miller, L. S. (2012) Innate and adaptive immune responses against *Staphylococcus aureus* skin infections. *Seminars in Immunopathology*, 34, 261–280.
- Krismer, B., Weidenmaier, C., Zipperer, A., e Peschel, A. (2017) The commensal lifestyle of *Staphylococcus aureus* and its interactions with the nasal microbiota. *Nature Publishing Group*, 15(11), 675–687.
- Lakhundi, S., e Zhang, K. (2018a) Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*: Molecular Characterization, Evolution, and Epidemiology. *Clinical Microbiology Reviews*, 31(4), 1–103.
- Lan, L., Cheng, A., Dunman, P. M., Missiakas, D., e He, C. (2010) Golden Pigment Production and Virulence Gene Expression Are Affected by Metabolisms in *Staphylococcus aureus*. *Journal of Bacteriology*, 192(12), 3068–3077.
- Laux, C., Peschel, A., e Krismer, B. (2018) *Staphylococcus aureus* Colonization of the Human Nose and Interaction with Other Microbiome Members., 1–10.
- Lee, A. S., Lencastre, H. De, Garau, J., Kluytmans, J., Malhotra-kumar, S., Peschel, A., e Harbarth, S. (2018) Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Nature Publishing Group*, 4(May), 1–23.
- Loskill, P., Pereira, P. M., Jung, P., Bischoff, M., Herrmann, M., Pinho, M. G., e Jacobs, K. (2014) Article Reduction of the Peptidoglycan Crosslinking Causes a Decrease in Stiffness of the *Staphylococcus aureus* Cell Envelope. *Biophysical Journal*, 107(5), 1082–1089.
- Mahdiyoun, S. M., Kazemian, H., Ahanjan, M., Houri, H., e Goudarzi, M. (2016) Frequency of Aminoglycoside-Resistance Genes in Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) Isolates from Hospitalized Patients. *Jundishapur Journal of Microbiology*, 9(8), 1–7.

- Mcbain, A. J., Bartolo, R. G., Catrenich, C. E., Charbonneau, D., Ledder, R. G., e Gilbert, P. (2003) Effects of a Chlorhexidine Gluconate-Containing Mouthwash on the Vitality and Antimicrobial Susceptibility of In Vitro Oral Bacterial Ecosystems., *69*(8), 4770–4776.
- McCormack, M. G., Smith, A. J., Akram, A. N., Jackson, M., Robertson, D., e Edwards, G. (2015) *Staphylococcus aureus* and the oral cavity: An overlooked source of carriage and infection? *American Journal of Infection Control*, *43*(1), 35–37.
- Munita, J. M., Arias, C. A., Unit, A. R., e Santiago, A. De. (2016) Mechanisms of Antibiotic Resistance. *Microbiology Spectrum*, *4*(2), 1–37.
- Nawrotek, P., Karakulska, J., e Fijałkowski, K. (2018) The Staphylococcal PantonValentine Leukocidin (PVL). *Pet-to-Man Travelling Staphylococci: A World in Progress* (p. 117–125). Elsevier Inc.
- Nitzan, O., Kennes, Y., Colodner, R., Mph, W. S., Edelstein, H., Raz, R., e Chazan, B. (2015) Chloramphenicol Use and Susceptibility Patterns in Israel : A National Survey., *17*(January).
- Ondusko, D. S., e Nolt, D. (2019) *Staphylococcus aureus*. *Pediatrics in Review*, *39*(6), 287–296.
- Otto, M. (2015) *Staphylococcus aureus* toxins. *Current Opinion in Microbiology*, 32–37.
- Peng, H., Liu, D., Ma, Y., e Gao, W. (2018) Comparison of community- and healthcare-associated methicillin- resistant *Staphylococcus aureus* isolates at a Chinese tertiary hospital, 2012–2017. *Scientific Reports*, 1–8.
- Peraro, M. D., e Goot, F. G. Van Der. (2015) Pore-forming toxins : ancient , but never really out of fashion. *Nature Publishing Group*.
- Platt, J. H., e Bucknall, R. A. (1988, maio) MIC tests are not suitable for assessing antiseptic handwashes. *The Journal of hospital infection*. England.
- Postma, B., Poppelier, M. J., Galen, J. C. Van, Prossnitz, R., Strijp, J. A. G. Van, Haas, C. J. C. De, e Kessel, K. P. M. Van. (2019) Chemotaxis Inhibitory Protein of *Staphylococcus aureus* Binds Specifically to the C5a and Formylated Peptide Receptor. *The Journal of Immunology*.
- Ramirez, M. S., e Tolmasky, M. E. (2010) Aminoglycoside modifying enzymes. *Drug Resistance Updates*, *13*(6), 151–171.
- Reis, A. C., Kolvenbach, B. A., Nunes, O. C., e Corvini, P. F. X. (2020) Biodegradation of antibiotics : The new resistance determinants – part I. *New Biotechnology*, *54*, 34–51.
- Reyes, J., Hidalgo, M., Di, L., Rinco, S., Moreno, J., Vanegas, N., e Castan, E. (2007) Characterization of macrolide resistance in Gram-positive cocci from Colombian hospitals : a

- countrywide surveillance. *International Journal of Infectious Diseases*.
- Reygaert, W. C. (2018) An overview of the antimicrobial resistance mechanisms of bacteria. *AIMS Microbiology*, 4(April), 482–501.
- Rigby, K. M., e Deleo, F. R. (2012) Neutrophils in innate host defense against *Staphylococcus aureus* infections. *Seminars in Immunopathology*, 34, 237–259.
- Roberts, M. C. (2005) Update on acquired tetracycline resistance genes. *FEMS Microbiology Letters*, 245, 195–203.
- Roberts, M. C., Soge, O. O., Horst, J. A., Ly, K. A., e Milgrom, P. (2011) Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* from dental school clinic surfaces and students. *American journal of infection control*, 39(8), 628–632.
- Rudresh, M. S., Ravi, G. S., Motagi, A., Alex, A. M., Sandhya, P., e Navaneeth, B. V. (2015) Prevalence of Mupirocin Resistance Among Staphylococci, its Clinical Significance and Relationship to Clinical Use.
- Ryu, S., Song, P. I., Seo, C. H., Cheong, H., e Park, Y. (2014) Colonization and Infection of the Skin by *S. aureus* : Immune System Evasion and the Response to Cationic Antimicrobial Peptides., 8753–8772.
- Sakr, A., Brégeon, F., Mège, J., Rolain, J., e Gobert, A. P. (2018) *Staphylococcus aureus* Nasal Colonization : An Update on Mechanisms , Epidemiology , Risk Factors , and Subsequent Infections., 9(October), 1–15.
- Sanju, A. J., Kopula, S. S., e Palraj, K. K. (2015) Screening for Mupirocin Resistance in *Staphylococcus*., 9(10), 9–10.
- Scheffers, D., e Pinho, M. G. (2005) Bacterial Cell Wall Synthesis : New Insights from Localization Studies. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 69(4), 585–607.
- Schmitz, F., Sadurski, R., Kray, A., Boos, M., Geisel, R., Köhrer, K., Verhoef, J., e Fluit, A. C. (2000) Prevalence of macrolide-resistance genes in *Staphylococcus aureus* and *Enterococcus faecium* isolates from 24 European university hospitals. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 891–894.
- Schwarz, S., Shen, J., Kadlec, K., Wang, Y., Michael, G. B., Feßler, A. T., e Vester, B. (2016) Lincosamides, Streptogramins, Phenicols, and Pleuromutilins : Mode of Action and Mechanisms of Resistance. *Cold Spring Harbor Prspectives in Medicine*, 1–29.
- Sim, C. (2019) Diversity of *Staphylococcus aureus* clones in wild mammals in Aragon , Spain , with detection of MRSA ST130- *mecC* in wild rabbits.

- Sköld, O. (2000) Sulfonamide resistance : mechanisms and trends. *Drug Resistance Updates*, 155–160.
- Smith, A. J., Jackson, M. S., e Bagg, J. (2001) The ecology of *Staphylococcus* species in the oral cavity. *Journal of Medical Microbiology*, 50, 940–946.
- Spaan, A. N., Strijp, J. A. G. Van, e Torres, V. J. (2017) Leukocidins: staphylococcal bi-component pore-forming toxins find their receptors. *Nature Reviews Microbiology*.
- Stewart, F. J. (2013) Where the genes flow. *Nature geoscience*, 6(9), 688–690.
- Stokes, J. M., Lopatkin, A. J., Lobritz, M. A., e Collins, J. J. (2019) Perspective Bacterial Metabolism and Antibiotic Efficacy. *Cell Metabolism*, 30(2), 251–259.
- Suller, M. T., e Russell, A. D. (1999) Antibiotic and biocide resistance in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and vancomycin-resistant enterococcus. *The Journal of hospital infection*, 43(4), 281–291.
- Tenson, T., e Lovmar, M. (2003) The Mechanism of Action of Macrolides , Lincosamides and Streptogramin B Reveals the Nascent Peptide Exit Path in the Ribosome. *Journal of Molecular Biology*, 283(6), 1005–1014.
- Thammavongsa, V., Kim, H. K., Missiakas, D., e Schneewind, O. (2015) Staphylococcal manipulation of host. *Nature Publishing Group*, 13(9), 529–543.
- Tromp, A. T., Gent, M. Van, Abrial, P., Martin, A., Jansen, J. P., Haas, C. J. C. De, Kessel, K. P. M. Van, Bardoel, B. W., Kruse, E., Bourdonnay, E., Boettcher, M., Mcmanus, M. T., Day, C. J., Jennings, M. P., Lina, G., Vandenesch, F., Strijp, J. A. G. Van, Lebbink, R. J., Haas, P. A., Henry, T., e Spaan, A. N. (2018) Human CD45 is an F-component-specific receptor for the staphylococcal toxin Pantón–Valentine leukocidin. *Nature Microbiology*.
- Trzcinski, K., Cooper, B. S., Hryniewicz, W., e Dowson, C. G. (2000) Expression of resistance to tetracyclines in strains of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 763–770.
- Ventola, C. L. (2015) The Antibiotic Resistance Crisis Part 1 : Causes and Threats. *Pharmacy and Therapeutics*, 40(4), 277–283.
- Verkaik, N. J., Benard, M., Boelens, H. A., Vogel, C. P. De, Nouwen, J. L., Verbrugh, H. A., Melles, D. C., Belkum, A. Van, Wamel, W. J. B. Van, e Diseases, I. (2010) Immune evasion cluster-positive bacteriophages are highly prevalent among human *Staphylococcus aureus* strains , but they are not essential in the first stages of nasal colonization. *Clinical Microbiology Infections*, 17(13), 343–348.

- Vitale, M., Galluzzo, P., Giuseppina, P., Carlino, E., Spezia, O., e Alduina, R. (2019) Comparison of Antibiotic Resistance Profile and Biofilm Production of *Staphylococcus aureus* Isolates Derived from Human Specimens and Animal-Derived Samples.
- Walker, E. M., e Lowes, J. A. (1985) An investigation into in vitro methods for the detection of chlorhexidine resistance., 389–397.
- Wamel, W. J. B. Van, Rooijakkers, S. H. M., Ruyken, M., Kessel, K. P. M. Van, e Strijp, J. A. G. Van. (2006) The Innate Immune Modulators Staphylococcal Complement Inhibitor and Chemotaxis Inhibitory Protein of *Staphylococcus aureus* Are Located on beta-Hemolysin-Converting Bacteriophages. *Journal of Bacteriology*, 188(4), 1310–1315.
- Wang, J.-T., Sheng, W.-H., Wang, J.-L., Chen, D., Chen, M.-L., Chen, Y.-C., e Chang, S.-C. (2008) Longitudinal analysis of chlorhexidine susceptibilities of nosocomial methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates at a teaching hospital in Taiwan. *The Journal of antimicrobial chemotherapy*, 62(3), 514–517.
- Wang, W., Arshad, M. I., Khurshid, M., Rasool, M. H., Nisar, M. A., Aslam, M. A., e Qamar, M. U. (2018) Antibiotic resistance : a rundown of a global crisis. *Infection and Drug Resistance*, 1645–1658.
- Watkins, R. R., Lemonovich, T. L., e Jr, T. M. F. (2012) An evidence-based review of linezolid for the treatment of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA): place in therapy., 131–143.
- Yadegar, A., Sattari, M., Mozafari, N. A., e Goudarzi, G. R. (2009) Prevalence of the Genes Encoding Aminoglycoside-Modifying Enzymes and Methicillin Resistance Among Clinical Isolates of *Staphylococcus aureus* in Tehran, Iran. *Microbial Drug Resistance*, 15(2), 109–113.
- Yamasaki, O., Yamaguchi, T., Sugai, M., Chapuis-cellier, C., Etienne, J., e Lina, G. (2005) Clinical Manifestations of Staphylococcal Scalded-Skin Syndrome Depend on Serotypes of Exfoliative Toxins. *Journal of Clinical Microbiology*, 43(4), 1890–1893.
- Yim, G., Thaker, M. N., Koteva, K., e Wright, G. (2014) Glycopeptide antibiotic biosynthesis. *The journal of antibiotics*, 31–41.
- Zecconi, A., e Scali, F. (2013) *Staphylococcus aureus* virulence factors in evasion from innate immune defenses in human and animal diseases. *Immunology Letters*, 150(1–2), 12–22.