



Universidade do Estado do Rio de Janeiro

Centro Biomédico

Faculdade de Ciências Médicas

Karolina Romão Ramos

Atividade da exposição de antimicrobianos utilizados no tratamento de exacerbações pulmonares causadas por *Staphylococcus aureus* resistente à meticilina em estágios planctônicos e em biofilme recuperados de pacientes com fibrose cística

Rio de Janeiro

2024

Karolina Romão Ramos

Atividade da exposição de antimicrobianos utilizados no tratamento de exacerbações pulmonares causadas por *Staphylococcus aureus* resistente à meticilina em estágios planctônicos e em biofilme recuperados de pacientes com fibrose cística

Dissertação apresentada, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre, ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia, da Universidade do Estado do Rio de Janeiro. Área de concentração: Microbiologia Médica Humana.

Orientador: Prof. Dr. Robson de Souza Leão

Coorientadora: Prof.^a Dra. Elizabeth de Andrade Marques

Rio de Janeiro

2024

CATALOGAÇÃO NA FONTE
UERJ/REDE SIRIUS/BIBLIOTECA CB-A

R175 Ramos, Karolina Romão.
Atividade da exposição de antimicrobianos utilizados no tratamento de exacerbações pulmonares causadas por *Staphylococcus aureus* resistentes à metilina em estágios planctônicos e em biofilme recuperados de pacientes com fibrose cística / Karolina Romão Ramos – 2024.
58 f.

Orientador: Prof. Dr. Robson de Souza Leão
Coorientadora: Prof.^a Dra. Elizabeth de Andrade Marques

Dissertação (Mestrado) – Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Faculdade de Ciências Médicas. Pós-graduação em Microbiologia.

1. Fibrose cística - Teses. 2. *Staphylococcus aureus* resistente à metilina. 3. Vancomicina. 4. Biofilme – Teses. I. Leão, Robson de Souza. II. Universidade do Estado do Rio de Janeiro. Faculdade de Ciências Médicas. IV. Título.

CDU 616.24

Bibliotecária: Ana Rachel Fonseca de Oliveira
CRB7/6382

Autorizo, apenas para fins acadêmicos e científicos, a reprodução total ou parcial desta dissertação, desde que citada a fonte.

Assinatura

Data

Karolina Romão Ramos

Atividade da exposição de antimicrobianos utilizados no tratamento de exacerbações pulmonares causadas por *Staphylococcus aureus* resistente à metilina em estágios planctônicos e em biofilme recuperados de pacientes com fibrose cística

Dissertação apresentada, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre, ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia, da Universidade do Estado do Rio de Janeiro. Área de concentração: Microbiologia Médica Humana.

Aprovada em 23 de agosto de 2024.

Orientador: Prof. Dr. Robson de Souza Leão

Faculdade de Ciências Médicas – UERJ

Coorientadora: Prof.^a Dra. Elizabeth de Andrade Marques

Faculdade de Ciências Médicas – UERJ

Banca Examinadora:

Prof.^a Dra. Flávia Márcia Castro e Silva

Faculdade de Ciências Médicas – UERJ

Prof.^a Dra. Carolina Relvas Chaves

Instituto Federal do Rio de Janeiro

Prof. Francisco Odencio Rodrigues de Oliveira Junior

Universidade Estácio de Sá

Rio de Janeiro

2024

AGRADECIMENTOS

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001

Crê em ti mesmo, age e verá os resultados. Quando te esforças, a vida também se esforça para te ajudar.

Chico Xavier

RESUMO

RAMOS, Karolina Romão. **Atividade da exposição de antimicrobianos utilizados no tratamento de exacerbações pulmonares causadas por *Staphylococcus aureus* resistente à meticilina em estágios planctônicos e em biofilme recuperados de pacientes com fibrose cística.** 2024. 58f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia) – Faculdade de Ciências Médicas, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2024.

A presença de *Staphylococcus aureus* resistentes à meticilina (MRSA) recuperados de secreções respiratórias de pacientes com Fibrose Cística (FC), vem aumentando significativamente na última década. Sendo um assunto de preocupação global, o estudo da resistência bacteriana é de extrema importância para a comunidade médico/científica pois a diminuição da susceptibilidade de cepas aos antimicrobianos tem como consequência ao aumento da mortalidade em hospitais, ao prolongamento e alto custos de tratamentos para diversas infecções. O objetivo principal deste trabalho foi avaliar a influência do crescimento em biofilme e em estados planctônicos, determinando a susceptibilidade a antimicrobianos em cepas recuperadas de infecções pulmonares crônicas de pacientes com Fibrose Cística. Neste trabalho buscamos avaliar a capacidade de três antimicrobianos usados para o tratamento de FC (Ciprofloxacino, Vancomicina e Trimetoprim-sulfametoxazol) em penetrar no biofilme presente no muco espesso característico do pulmão com FC, comparando sua ação em bactérias em estado planctônico e definir quais são as concentrações eficazes nestas duas condições. Somado a isso, validamos que bactérias crescendo em biofilmes são mais resistentes a agentes antimicrobianos do que aquelas crescendo em estado planctônico. A conclusão deste estudo reforça a crescente preocupação com a resistência antimicrobiana em MRSA, especialmente em pacientes com FC. Nossos resultados demonstraram que bactérias em biofilmes exibem uma resistência significativamente maior em comparação com bactérias em estado planctônico, evidenciando a necessidade de estratégias terapêuticas mais eficazes que considerem a penetração dos antimicrobianos em biofilmes. Esses achados demonstram a importância de continuar a investigação sobre métodos inovadores para combater a resistência bacteriana em ambientes clínicos complexos.

Palavras-chave: MRSA; biofilme; fibrose cística; vancomicina; resistência bacteriana.

ABSTRACT

RAMOS, Karolina Romão. **Activity of exposure of antimicrobials used in the treatment of pulmonary exacerbations caused by methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in planktonic and biofilm stages recovered from patients with cystic fibrosis.** 2024. 58f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia) – Faculdade de Ciências Médicas, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2024.

The presence of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) recovered from respiratory secretions of patients with Cystic Fibrosis (CF) has increased significantly in the last decade. Being a subject of global concern, the study of bacterial resistance is of extreme importance for the medical/scientific community as the decrease in the susceptibility of strains to antimicrobials results in increased mortality in hospitals, prolonged and high costs of treatments for several infections. The main objective of this work was to evaluate the influence of growth in biofilm and planktonic states, determining the susceptibility to antimicrobials in strains recovered from chronic pulmonary infections of patients with Cystic Fibrosis. In this work we sought to evaluate the capacity of three antimicrobials used for the treatment of CF (Ciprofloxacin, Vancomycin and Trimethoprim-sulfamethoxazole) in penetrating the biofilm present in the thick mucus characteristic of CF lungs, comparing their action on bacteria in a planktonic state and defining which concentrations are effective in these two conditions. Added to this, we validated that bacteria growing in biofilms are more resistant to antimicrobial agents than those growing in a planktonic state. The conclusion of this study reinforces the growing concern about antimicrobial resistance in MRSA, especially in patients with CF. Our results demonstrated that bacteria in biofilms exhibit significantly greater resistance compared to bacteria in a planktonic state, highlighting the need for more effective therapeutic strategies that consider the penetration of antimicrobials into biofilms. These findings demonstrate the importance of continuing research into innovative methods to combat bacterial resistance in complex clinical settings.

Keywords: MRSA; biofilm; cystic fibrosis; vancomycin; bacterial resistance.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Quadro 1 -	Caracterização das amostras de MRSA incluídas no estudo.....	24
Figura 1 –	Crescimento do Biofilme.....	29
Gráfico 1 -	Perfil de susceptibilidade aos antimicrobianos em <i>Staphylococcus aureus</i> resistente à metilina (MRSA) isolados de secreções respiratórias de indivíduos com fibrose cística.....	35

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 –	Concentração Inibitória Mínima para ciprofloxacina em <i>Staphylococcus aureus</i> resistente à meticilina (MRSA) isolados de secreções respiratórias de indivíduos com fibrose cística.....	32
Tabela 2 –	Concentração Inibitória Mínima para vancomicina em <i>Staphylococcus aureus</i> resistente à meticilina (MRSA) isolados de secreções respiratórias de indivíduos com fibrose cística.....	32
Tabela 3 –	Concentração Inibitória Mínima para sulfametoxazol-trimetoprima em <i>Staphylococcus aureus</i> resistente à meticilina (MRSA) isolados de secreções respiratórias de indivíduos com fibrose cística.....	33
Tabela 4 –	CIM ₅₀ e CIM ₉₀ para ciprofloxacina, vancomicina e sulfametoxazol-trimetoprima em <i>Staphylococcus aureus</i> resistente à meticilina (MRSA) isolados de secreções respiratórias de indivíduos com fibrose cística.....	34
Tabela 5 -	Perfis de resistência aos antimicrobianos em amostras de <i>Staphylococcus aureus</i> resistente à meticilina (MRSA) isolados de secreções respiratórias de indivíduos com fibrose cística.....	37
Tabela 6 –	Resultados da concentração inibitória mínima e concentração bactericida mínima para o antimicrobiano ciprofloxacina, vancomicina, sulfametoxazol-trimetoprima de amostras de MRSA recuperadas de paciente com FC.....	38
Tabela 7 –	Capacidade de formação de biofilme em cepas de <i>Staphylococcus aureus</i> resistente a meticilina.....	39
Tabela 8 –	Resultados da concentração inibitória mínima e concentração inibitória mínima em formação de biofilme para o antimicrobiano ciprofloxacina, vancomicina, sulfametoxazol-trimetoprima de amostras de MRSA recuperadas de paciente com FC	42

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ABNT	Associação Brasileira de Normas Técnicas
ADAM10	<i>ADAM Metallopeptidase Domain 10</i>
AM	Ágar Muller-Hinton
AS	Água sangue
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
ATP	Trifosfato de adenosina
BIC	Concentração inibitória mínima em biofilme
BrCast	Comitê Brasileiro de Teste de Sensibilidade aos Antimicrobianos
CAMHB	Caldo Mueller-Hinton ajustado
CA-MRSA	<i>Staphylococcus aureus</i> resistente à meticilina adquiridos na comunidade
CBM	Concentração bactericida mínima
CFTR	Proteína Reguladora da Condutância Transmembrana da Fibrose Cística
CIM	Concentração inibitória mínima
CIP	Ciprofloxacina
DNA	Ácido desoxirribonucléico
DNase	Desoxirribonuclease
DO	Desnidade óptica
FC	Fibrose cística
FCM	Faculdade de Ciências Médicas
FDA	Food and Drug Administration
FIOCRUZ	Fundação Oswaldo Cruz
FOX	Cefoxitina
HA-MRSA	<i>Staphylococcus aureus</i> resistente à meticilina associado ao ambiente hospitalar
HUPE	Hospital Universitário Pedro Ernesto
IFF	Instituto Nacional de Saúde da Mulher, da Crianças e do Adolescente Fernandes Figueira
LABACT	Laboratório de Bacteriologia Clínica
LabMiFC	Laboratório de Microbiologia da Fibrose Cística
MRSA	<i>Staphylococcus aureus</i> resistente à meticilina
MSCRAMM	<i>Microbial Surface Components Recognizing Adhesive Matrix Molecules</i>

MSSA	<i>Staphylococcus aureus</i> sensível à meticilina
PB	Pares de bases
PBP	Proteínas ligadoras de penicilina
PPC	Policlínica Piquet Carneiro
REBRAFC	Registro Brasileiro de Fibrose Cística
SCCmec	<i>Cromossomo estafilocócico mec</i>
SPA	<i>Staphylococcus</i> protein A
SUT	Sulfametoxazol-trimetoprima
TSA	Teste de sensibilidade a antimicrobianos
UERJ	Faculdade de Ciências Médicas da Universidade do Estado do Rio de Janeiro
UFC	Unidades formadores de colônias
VAN	Vancomicina
VRSA	<i>Staphylococcus aureus</i> sensível à vancomicina

LISTA DE SÍMBOLOS

%	Porcentagem
±	Mais ou menos
×	Multiplicação
≤	Menor ou igual a
≥	Maior ou igual a
α	Alfa
β	Beta
°C	Grau Celsius
H ₂ O	Molécula da água
H ₂ O ₂	Peróxido de hidrogênio
HCL	Ácido clorídrico
mg	Microlitro
mL	Mililitro
NAOH	Hidróxido de Sódio
rpm	Rotações por minuto
μL	Miligrama
μg/mL	Micrograma por mililitro

SUMÁRIO

	INTRODUÇÃO	13
1	OBJETIVO GERAL	22
1.1	Objetivo específico	22
2	METODOLOGIA	23
2.1	Delineamento do estudo	23
2.2	Espécimes clínicos e origem das amostras	23
2.3	Identificação bacteriana	24
2.4	Teste de Sensibilidade a Antimicrobianos	26
2.5	Determinação da concentração inibitória mínima	26
2.6	Concentração Bactericida Mínima	28
2.7	Concentração Inibitória em Biofilme	28
2.8	Análise estatística	30
3	RESULTADOS	31
3.1	Confirmação da identificação bacteriana e do fenótipo MRSA	31
3.2	Avaliação da susceptibilidade aos antimicrobianos	31
3.2.1	<u>Concentração Inibitória Mínima</u>	31
3.2.2	<u>Determinação da MIC₅₀ e o MIC₉₀</u>	33
3.2.3	<u>Determinação do perfil de resistência aos antimicrobianos</u>	34
3.3	Concentração Bactericida Mínima	37
3.4	Concentração Inibitória Mínima em formação de Biofilme	38
4	DISCUSSÃO	44
	CONCLUSÕES	53
	REFERÊNCIAS	54

INTRODUÇÃO

A Fibrose Cística

A fibrose cística (FC) é uma doença genética grave, congênita e autossômica recessiva que afeta predominantemente o trato respiratório e diversos órgãos exócrinos, incluindo o pâncreas, o sistema hepatobiliar e as glândulas exócrinas. Além disso, a FC influencia o funcionamento do sistema digestório e reprodutivo. Esta patologia está associada a mutações no gene que codifica a Proteína Reguladora da Condutância Transmembrana da Fibrose Cística (CFTR), localizada no cromossomo 7. Essas mutações comprometem a função do canal iônico em glândulas apicais, resultando em alterações no transporte de íons e na regulação do fluxo de cloro, sódio e água através da membrana celular. Como consequência dessas disfunções, ocorre a produção de muco viscoso, o qual pode danificar os ductos de secreção e se disseminar para outros órgãos (Angyal, 2021).

O aumento da viscosidade do muco produzido dificulta sua eliminação, afetando principalmente os pulmões e o pâncreas. Com o aumento dessa viscosidade nos pulmões, ocorre o bloqueio das vias aéreas, aumentando o risco de proliferação de microrganismos. Isso pode levar a uma infecção crônica, lesões pulmonares graves e, em casos extremos, resultar em óbito (Cocorullo, 2023).

São conhecidas cerca de 2.100 mutações que estão relacionadas ao gene CFTR, distribuídas em seis classes distintas que conferem variações celulares, dependendo da expressão da proteína. De uma forma abrangente, as mutações de classes I, II e III, estão relacionadas a uma expressão fenotípica clássica da FC, consideradas mutações graves. As mutações IV, V e VI, são relacionadas as mutações leves, gerando expressões fenotípicas brandas da FC (Scotet, 2020). A frequência e distribuição das mutações no CFTR variam de acordo com a origem étnica dos pacientes com FC. A população brasileira é bastante heterogênea, apresentando uma alta taxa de miscigenação (Bareil, 2020).

A classificação funcional dessas mutações, permitiu o direcionamento para um tratamento mais adequado de acordo com o diagnóstico e a correlação entre genótipo/fenótipo de cada mutação. De uma forma geral, as mutações de classe I podem ser definidas sendo aquelas que possuem uma síntese proteica defeituosa e à ausência de CFTR funcional na superfície celular. A classe II, resulta na degradação da proteína, causando seu bloqueio e

impossibilitando sua ancoragem no epitélio devido à perda da fenilalanina na posição 508, impedindo o deslocamento dessa proteína para a membrana apical (Bareil, 2020).

Associada a mutação G551, a variante mais estudada da classe III, a proteína CFTR está presente na membrana apical da célula, porém ela não é funcional, interferindo na interação com o ATP intracelular, o que prejudica a regulação adequada da abertura do canal de cloro. Em contrapartida, a mutação da classe IV, modificam a translocação do cloro pelo poro da proteína, permitindo que seja transportada normalmente para a membrana celular e responda a estímulos, mas gerando um fluxo reduzido de íons de cloro (Scotet, 2020).

A mutação da classe V, inclui variações nas regiões promotoras que reduzem a transcrição do gene, alterando nucleotídeos que promovem *splicing* alternativo de transcritos do CFTR e substituem aminoácidos, causando a maturação de uma proteína ineficiente. Já as mutações da classe VI, produz proteína CFTR funcional, porém a mesma é degradada precocemente devido à instabilidade na superfície celular, (Deletang, 2022; Scotet, 2020).

De acordo com o Registro Brasileiro de Fibrose Cística (REBRAFC), aproximadamente 3.000 pessoas vivem com FC no Brasil, e a incidência é de 1 para 10.000 nascidos vivos, exceto na região Sul do país, onde essa estimativa é reduzida para 1 para 2.500 indivíduos. No ano de 2020, foi conduzido um estudo intitulado "Tendências de mortalidade relacionada à fibrose cística no Brasil no período de 1999 a 2017: um estudo de causas múltiplas de morte", que indicou a ocorrência de 2.854 óbitos associados à FC, sendo que 77% dessas mortes estavam ligadas a complicações do sistema respiratório. Foi observada uma tendência contínua de aumento nas taxas de mortalidade, com uma variação percentual anual significativa de 6,84% entre os homens e 7,50% entre as mulheres (Santo, 2020).

Adicionalmente, verificou-se um aumento na mediana da idade ao óbito, passando de 7,5 anos em 1999 para 56,5 anos em 2017. Embora tenha ocorrido um aumento na expectativa de vida das pessoas com FC, há um aumento significativo e contínuo nas taxas de mortalidade relacionadas à doença (Santo, 2020).

A Microbiologia da Fibrose Cística

A FC é uma doença ainda sem cura. Contudo, por meio de um diagnóstico precoce e da adesão a um tratamento multiprofissional, os pacientes podem alcançar a vida adulta mantendo uma boa qualidade de vida (Rauber, 2022). Por outro lado, com o aumento da expectativa de vida desses pacientes, há uma propensão a uma maior colonização por diversos patógenos, causando infecções, especialmente no trato respiratório. As espécies mais

comumente encontradas nos pulmões de indivíduos com FC incluem *Haemophilus influenzae*, *Pseudomonas aeruginosa*, espécies do complexo *Burkholderia cepacia*, complexo *Mycobacterium abscessus* e *Staphylococcus aureus* (Gavillet, 2022; Cocorullo, 2023).

Ao longo das décadas, a composição dos microrganismos prevalentes em pacientes com FC tem passado por mudanças significativas, influenciadas por diversos fatores, como o desenvolvimento de terapias antimicrobianas mais eficazes e alterações nas práticas de saúde. Inicialmente, *S. aureus* emergiu como uma das bactérias mais frequentemente encontradas, seguida por *H. influenzae* e *P. aeruginosa*. No entanto, com o passar do tempo, observou-se um aumento na prevalência de cepas mais resistentes de *P. aeruginosa*, especialmente as variantes mucoides, e o surgimento de outras bactérias gram-negativas notáveis, como as espécies do complexo *Burkholderia cepacia* (Gavillet, 2022).

A FC, por sua natureza crônica, expõe os pacientes a infecções respiratórias persistentes, tornando-os mais suscetíveis a cepas bacterianas resistentes, como o *S. aureus* resistentes a meticilina (MRSA). O ambiente pulmonar específico desses pacientes, caracterizado pela produção de muco espesso, oferece condições ideais para a colonização e propagação de microrganismos, incluindo aqueles capazes de formar biofilme. Esse aumento na prevalência de cepas MRSA em pacientes com FC não apenas torna o tratamento dessas infecções mais complicado, mas também pode resultar em consequências mais graves, incluindo deterioração da função pulmonar e maior risco de crises agudas (Cheung, 2021).

Staphylococcus aureus

Pertencentes ao grupo dos cocos gram-positivos, os *S. aureus* apresentam-se de forma esférica, com aproximadamente 0,5 a 1,5µm de diâmetro. São imóveis, não esporulados e geralmente não possuem cápsula. Sua apresentação mais tradicional é em forma de "cachos de uva", mas também podem ser encontrados em pares ou em cadeias curtas. Descrito pela primeira vez em 1880 pelo cirurgião escocês Alexandre Ogston, o *S. aureus* é um dos microrganismos mais comuns em infecções piogênicas em todo o mundo, sendo o principal agente causador de doenças de pele, pneumonia e outras infecções do trato respiratório, local cirúrgico, prótese articular, infecções cardiovasculares, bem como bacteremia (Tong, 2015).

Reconhecido por sua alta capacidade de causar infecções e desenvolver biofilme, o gênero *S. aureus* possui múltiplos fatores de virulência, sendo a exotoxina α -hemolisina um dos principais. Proteínas ancoradas na superfície, como as da família MSCRAMM (*Microbial*

Surface Components Recognizing Adhesive Matrix Molecules), são fundamentais para a adesão tecidual e a sobrevivência bacteriana na corrente sanguínea, contribuindo para a patogênese das infecções estafilocócicas. Após a invasão sistêmica, esse patógeno utiliza uma variedade de mecanismos para evadir as defesas do hospedeiro, demonstrando uma alta capacidade de destruir células do sistema imunológico (Pickens, 2022).

Além disso, outros fatores de virulência, como, α -toxinas e determinantes de resistência a antimicrobianos, frequentemente são codificados no genoma acessório do *S. aureus*, que inclui elementos genéticos móveis como plasmídeos, transposons e ilhas de patogenicidade. Esses elementos desempenham um papel importante na disseminação da resistência aos antimicrobianos e na virulência bacteriana. A capacidade desse microrganismo de se adaptar representa um desafio significativo no tratamento de infecções hospitalares e comunitárias, ressaltando a importância contínua de pesquisas e desenvolvimento de estratégias terapêuticas eficazes contra esse patógeno versátil (Novick, 2019; Cheung, 2021).

Uma abordagem para o controle e monitoramento da circulação dessas cepas é a utilização do método de tipagem spa, que se baseia no sequenciamento da região polimórfica X do gene da proteína A (spa), presente em todas as cepas de *S. aureus*. A região X é constituída por um número variável de repetições de 24 pb em regiões bem conservadas. Este método de tipagem, baseado na sequência de nucleotídeos da região X do polimorfismo da proteína A, apresenta algumas vantagens técnicas, como rapidez, alta capacidade de identificar cepas de *S. aureus*, possibilitando o uso dessa técnica em estudos epidemiológicos locais e globais, auxiliando na pesquisa científica e na rotina hospitalar. Tais estudos são facilitados pelo estabelecimento de uma nomenclatura padronizada de tipos de spa e de bancos de dados compartilhados na Internet (Abdulah, 2022).

Staphylococcus aureus resistente à meticilina

Na década de 1960, a meticilina foi introduzida no mercado, e apenas um ano após sua introdução, pesquisadores do Reino Unido relataram o primeiro caso de MRSA. Essas infecções estão associadas ao aumento da mortalidade, morbidade e internação hospitalar (Moran, 2006; Siddiqui, 2023). Desde então, cepas de MRSA tornaram-se uma grande preocupação na comunidade médico-científica, pois sua resistência múltipla representa um grande desafio para o tratamento, e a prevenção de sua disseminação é uma preocupação para a saúde pública (Wilcox, 2019).

Produzindo uma variedade de mecanismos de virulência, incluindo toxinas e fatores de evasão imunológica, cepas de MRSA possuem uma importância clínica devido a sua alta capacidade infecciosa e ótima adaptação em diversas condições ambientais, permitindo uma boa colonização do hospedeiro (Lakhundi, 2018).

A alta capacidade de disseminação dessas cepas, que eram inicialmente encontradas apenas em ambientes hospitalares (HA-MRSA), mudou a partir da década de 1980, com o surgimento de cepas provenientes da comunidade (CA-MRSA) com alto potencial de virulência de uma forma até então desconhecida (Wilcox, 2019).

Historicamente, as diferenças significativas em sua epidemiologia, padrões de resistência, fatores de risco e manifestações clínicas, o CA-MRSA era tipicamente associado a infecções de pele e tecidos moles em indivíduos saudáveis que não tinham histórico recente de hospitalização ou procedimentos invasivos. Por outro lado, o HA-MRSA estava relacionado a infecções mais graves, como bacteremia, pneumonia associada à ventilação mecânica e infecções do trato urinário, sendo predominante em ambientes hospitalares e de cuidados de saúde prolongados. As diferenças nos padrões de resistência, fatores de virulência e epidemiologia entre o CA-MRSA e o HA-MRSA têm implicações significativas no manejo clínico, na seleção de antibióticos e nas estratégias de controle de infecção em diferentes contextos de saúde (Turner, 2019).

A resistência à meticilina ocorre, principalmente, devido à produção da proteína ligante de penicilina modificada (PBP-2a), codificada pelos genes *mecA* ou *mecC*, presentes em uma ilha genética móvel denominada cassetes de *cromossomo estafilocócico mec* (*SCCmec*). Essa proteína impede a ligação de antibióticos beta-lactâmicos às proteínas da parede celular bacteriana. Isso resulta em cepas de MRSA que são resistentes não apenas à meticilina, mas também a todos os antibióticos beta-lactâmicos (Idrees, 2023; Youssef, 2022).

A tipagem molecular do *SCCmec* é uma ferramenta importante para caracterizar cepas de MRSA quanto a sua origem e ao seu padrão de resistência a antimicrobianos, pois permite a definição genética das características específicas de cada isolado, a partir do complexo de genes *mec* e *ccr* (Youssef, 2022). Cada arranjo dessa ilha genética móvel (*SCCmec*) possui uma composição genética específica, resultante de diferentes rearranjos e inserções de genes de resistência. Com base na composição dos complexos *mec* e *ccr*, as cepas de MRSA podem ser classificadas, de acordo com os *SCCmec*, em 13 tipos, do I a XIII (McClure, 2020).

Em um estudo dirigido por Zhong em 2023, foi caracterizado os tipos de *SCCmec* de cepas de CA-MRSA, além de outros fatores de virulência e resistência antimicrobiana, com a intenção de analisar as características clínicas dessas cepas. O estudo relacionou os tipos

SCCmec I, II e III como sendo caracterizados pela presença de genes de resistência além do gene *mecA*, e comumente encontrados em cepas de MRSA associadas ao ambiente hospitalar (HA-MRSA). Por outro lado, os tipos *SCCmec* IV e V foram caracterizados pela presença exclusiva do gene *mecA* e estão associados a cepas adquiridas na comunidade (CA-MRSA) (Youssef, 2022; Zhong, 2023). Esses achados, destacam a alta capacidade de cepas MRSA de adquirir e disseminar genes de resistência através da evolução e troca genética, contribuindo para a variabilidade genética e desafiando o controle de infecções causadas por este patógeno (Youssef, 2022).

Classificar precisamente uma cepa de MRSA como sendo CA-MRSA ou HA-MRSA é desafiador, pois as características epidemiológicas e microbiológicas de ambas sofrem constantes mutações, além disso as cepas de CA-MRSA vêm demonstrando uma crescente capacidade de adaptação no ambiente hospitalar, causando assim, mudanças nos padrões de resistências a antimicrobianos e formando cepas híbridas, que contribuem para a complexidade dessa classificação. Portanto, é essencial adotar abordagens integradas que considerem não apenas os critérios epidemiológicos, mas também as características genéticas e de virulência das cepas de MRSA, a fim de realizar uma classificação precisa e informar estratégias eficazes de controle e prevenção da disseminação da bactéria (Asghar, 2014).

Formação de biofilme em *Staphylococcus aureus*

O biofilme é uma comunidade microbiana complexa e estruturada, formada por microrganismos aderidos a uma superfície biológica ou abiótica, imersos em uma matriz extracelular de polímeros produzidos pelos próprios microrganismos. Essa matriz, composta principalmente de polissacarídeos, proteínas, ácidos nucleicos e lipídios, fornece suporte estrutural e proteção as bactérias presentes dentro do biofilme (Ruhai, 2021).

Uma das características marcantes dessa estrutura é sua capacidade de resistência aos agentes antimicrobianos e ao sistema imunológico do hospedeiro, justamente, devido à presença da matriz extracelular, que atua como uma barreira física e reduz a eficácia dos tratamentos antimicrobianos e a ação do sistema imunológico. Além disso, os microrganismos dentro do biofilme exibem comportamentos metabólicos e fenotípicos distintos em comparação com suas células planctônicas, o que pode afetar a resposta do hospedeiro e a eficácia dos tratamentos (Rather, 2021).

A formação do biofilme é um processo dinâmico que envolve várias etapas, incluindo a adesão inicial dos microrganismos à superfície, a formação de micro colônias, o

desenvolvimento de estrutura tridimensional e a dispersão de células para formar novos biofilmes. A adesão *in vivo* ocorre nas proteínas da matriz humana através de proteínas ancoradas na parede celular e outras proteínas de superfície, muitas das quais pertencem à família MSCRAMM (Foster, 2020; Rather, 2021).

A presença de microrganismos em diferentes estágios de crescimento metabólico dentro do biofilme resulta em uma população heterogênea, onde subpopulações de células dormentes são menos suscetíveis aos tratamentos convencionais. Ademais, a capacidade dos microrganismos dentro do biofilme de trocar genes de resistência entre si, juntamente com a adaptação contínua à presença de antimicrobianos, contribui para o desenvolvimento de resistência bacteriana. Essa interação complexa entre biofilme e resistência bacteriana torna essas comunidades microbianas uma preocupação significativa na saúde humana, requerendo abordagens terapêuticas mais direcionadas e estratégias de prevenções eficazes (Guo, 2022).

Sabendo que cepas MRSA possuem uma alta capacidade de desenvolver biofilmes em superfícies teciduais e/ou artificiais, e considerando que bactérias crescendo em biofilmes são mais resistentes a agentes antimicrobianos do que bactérias crescendo em estado planctônico, surge um grande desafio para definir uma abordagem anti-infecciosa capaz de atender à necessidade de combater esse tipo de infecções (Jalalifar, 2022).

Staphylococcus aureus na fibrose cística

Indivíduos com FC são frequentemente colonizados por MRSA, e estudos globais, incluindo dados publicados por nosso grupo, indicaram que a colonização pulmonar crônica por MRSA resulta em deterioração com declínio acelerado da função pulmonar em comparação com pacientes colonizados por cepas de *S. aureus* sensíveis à meticilina (MSSA) (Athanzio, 2023; Rodrigues, 2019).

A vancomicina permanece como o antimicrobiano principal para combater infecções por MRSA, embora tenham ocorrido cepas altamente resistentes à vancomicina (VRSA), que, no entanto, não se espalharam provavelmente devido ao forte custo de aptidão imposto pelos genes de resistência à vancomicina (McGuinness, 2017).

O uso de antimicrobianos anti-MRSA (vancomicina, linezolida, daptomicina, ceftarolina, telavancina, tigeciclina, ceftobiprole e tedizolida) revelou que alguns centros de atendimento credenciados pela Fundação Americana de Fibrose Cística optam por doses superiores às aprovadas pela Food and Drug Administration (FDA) dos Estados Unidos

(Esposito, 2019). Essa decisão é respaldada pela complexidade em atingir o sítio alvo, uma vez que diversos fatores, incluindo as características do ambiente pulmonar e a notável capacidade do *S. aureus* de formar biofilme, contribuem para essa dificuldade (Rather, 2021). Embora as concentrações de antimicrobianos anti-MRSA em situações planctônicas sejam amplamente documentadas na literatura (Rodrigues, 2019), a escassez de dados que avaliem essas drogas em contextos de biofilme é evidente e requer uma investigação mais aprofundada.

Além dos antibióticos tradicionais como vancomicina, teicoplanina e linezolida, podem ser consideradas combinações de antibióticos ou terapias alternativas para abordar infecções resistentes ou recorrentes. Uma opção é a combinação de antimicrobianos, que pode aumentar a eficácia do tratamento e reduzir o desenvolvimento de resistência bacteriana. Por exemplo, a combinação de vancomicina com rifampicina ou gentamicina pode ser utilizada em casos graves de infecção por MRSA, especialmente em infecções que envolvem dispositivos médicos ou tecidos profundos (Aktas, 2021).

No entanto, são necessários mais estudos para avaliar as propriedades dos antimicrobianos anti-MRSA em condições específicas de pacientes com FC, como o uso de ciprofloxacina e sulfametoxazol-trimetoprima, além de avaliar a capacidade desses antimicrobianos em penetrarem no muco espesso e no biofilme característico dos pulmões e atingirem concentrações eficazes, pois essas informações ainda não estão totalmente claras (Smith, 2020).

Adicionalmente, terapias alternativas, como a terapia com inaladores podem ser utilizadas para administrar antibióticos diretamente nos pulmões, visando tratar infecções pulmonares crônicas associadas à FC. Antibióticos como tobramicina inalatória ou aztreonam inalatório são comumente usados nessa abordagem (Elborn, 2020).

Há também o desenvolvimento de estratégias anti-virulência, que visam um determinante de virulência específico do patógeno para ser neutralizado, porém essa abordagem desenvolvida em *S. aureus* enfrenta o problema considerável de que esse microrganismo apresenta fatores múltiplos de virulência, o que dificulta o emprego dessa terapia (Clatworthy, 2007).

Vale ressaltar que a escolha da combinação de antibióticos ou terapias alternativas deve ser individualizada e orientada por um médico especialista, levando em consideração a gravidade da infecção, o perfil de resistência local, a resposta do paciente ao tratamento e outras condições médicas (Liu, 2017).

Devido a sua importância clínica, há necessidade de contínuas pesquisas para entender, bem como desenvolver novas estratégias terapêuticas ao combate de infecções desenvolvidas por MRSA em paciente com FC.

JUSTIFICATIVA

Na FC, o *S. aureus* é o patógeno oportunista mais comumente encontrado na população em geral. A persistência desse microrganismo nos pulmões de indivíduos com FC, apesar das diversas estratégias de erradicação, é facilitada por várias características tanto do hospedeiro quanto do patógeno. Entre estas, a capacidade de formar biofilme é uma estratégia altamente protetora para sobreviver em condições ambientais adversas, uma característica comum compartilhada pelos principais agentes patogênicos identificados na FC.

Comparativamente às bactérias em forma planctônica, os biofilmes bacterianos podem sobreviver a níveis extremamente altos de antimicrobianos. A resistência do biofilme aos antibióticos provavelmente é multifatorial, resultando de um complexo processo fisiológico.

Determinar a eficácia dos principais antimicrobianos utilizados na prática clínica com ação anti-MRSA, especialmente quando presente em biofilmes, é crucial para garantir o tratamento apropriado, prevenir o desenvolvimento de resistência bacteriana, melhorar a saúde pública e reduzir complicações em pacientes com infecções pulmonares causadas por esse microrganismo.

1 OBJETIVO GERAL

Avaliar a influência do crescimento em biofilme na susceptibilidade a antimicrobianos em *Staphylococcus aureus* resistente à metilina (MRSA) recuperadas de secreções respiratórias de indivíduos com Fibrose Cística.

1.1 Objetivos específicos

Determinar a concentração inibitória mínima (CIM) de MRSA em estágio planctônico para os antimicrobianos ciprofloxacina, vancomicina e sulfametoxazol- trimetoprima;

Determinação da concentração bactericida mínima (CBM) para os antimicrobianos ciprofloxacina, vancomicina e sulfametoxazol- trimetoprima;

Avaliar a susceptibilidade a antimicrobianos para os antimicrobianos ciprofloxacina, vancomicina e sulfametoxazol- trimetoprima nas amostras de MRSA sob condição de formação de biofilmes (BIC).

2 METODOLOGIA

2.1 Delineamento do estudo

Estudo retrospectivo visando à determinação da concentração inibitória mínima a alguns antimicrobianos de uso clínico, seu potencial sob condições planctônicas e sob formação de biofilme de *Staphylococcus aureus* resistentes à meticilina (MRSA) recuperadas de secreções respiratórias de indivíduos com fibrose cística (FC) acompanhados em dois centros para o tratamento da doença na cidade do Rio de Janeiro.

2.2 Espécimes clínicos e origem das amostras

Neste estudo foram avaliadas 26 amostras de MRSA, provenientes de secreções respiratórias de indivíduos com FC atendidos no Instituto Nacional de Saúde da Mulher, da Criança e do Adolescente Fernandes Figueira (IFF/Fiocruz) e na Policlínica Piquet Carneiro (PPC/UERJ), sendo 15 amostras coletado devia *swab* de orofaringe e 11 amostras de escarro, entre o período de 2008 e 2022.

Das 26 amostras, 16 foram oriundas de trabalho anteriormente conduzido pelo nosso grupo (Rodrigues et al., 2019), e as demais (n=10) recuperadas da Coleção de Bactérias do Laboratório de Microbiologia da Fibrose Cística (LABMiFC) da Disciplina de Microbiologia e Imunologia da Faculdade de Ciências Médicas da UERJ (Quadro 1).

Quadro 1 - Caracterização das amostras de MRSA incluídas no estudo

Paciente	Amostra	Data da coleta	Espécime clínico	Clínica	<i>Spa type</i>
1	9066	24/06/2009	<i>Swab</i>	IFF	t539
2	14194	02/02/2012	<i>Swab</i>	IFF	t18066
3	14196	02/02/2012	<i>Swab</i>	IFF	t021
4	18815	19/12/2014	Escarro	PPC	
	19627	19/06/2015	Escarro	PPC	
5	9122	16/07/2009	<i>Swab</i>	IFF	t1605
	8394	22/01/2009	<i>Swab</i>	IFF	t1605
6	9840	07/10/2010	Escarro	IFF	t002
7	19630	22/06/2015	Escarro	PPC	
	19785	20/07/2015	Escarro	PPC	
8	8891	22/05/2009	<i>Swab</i>	IFF	t002
	10158	05/04/2010	<i>Swab</i>	IFF	t002
9	19046	06/02/2015	Escarro	PPC	
10	7799	20/08/2008	<i>Swab</i>	IFF	t002
	14197	02/02/2012	<i>Swab</i>	IFF	t318
11	7687	30/07/2008	<i>Swab</i>	IFF	t002
	8484	12/02/2009	<i>Swab</i>	IFF	t002
	9065	25/06/2009	<i>Swab</i>	IFF	t002
12	23049	30/07/2021	Escarro	PPC	
	23050	30/07/2021	Escarro	PPC	
13	10430	30/07/2010	<i>Swab</i>	IFF	t002
14	19133	20/02/2015	Escarro	PPC	
15	10279	10/05/2010	<i>Swab</i>	IFF	t002
	12481	28/04/2011	<i>Swab</i>	IFF	t002
	18904	23/01/2015	Escarro	PPC	
16	130/22	22/07/2022	Escarro	PPC	

Legenda: Instituto Nacional de Saúde da Mulher, da Criança e do Adolescente Fernandes Figueira (IFF) e Policlínica Piquet Carneiro (PPC)

Fonte: O autor, 2023.

2.3 Identificação bacteriana

Os microrganismos identificados previamente pelo Laboratório de Bacteriologia Clínica (LABACT-HUPE) como *S. aureus* que apresentaram perfil fenotípico de MRSA estavam estocados em tubos tipo *ependorf* contendo *skim-milk* acrescido de 10% de glicerol (DifcoLabs, Michigan, USA). Visando a possibilidade de contaminação ou perda de

viabilidade, os microrganismos foram re-identificados como *S. aureus* bem como a verificação do fenótipo MRSA.

A identificação deu-se a partir de crescimento em placas de Ágar Sangue de carneiro a 5% (AS) (preparado em base Ágar Columbia, MicroMed, Brasil) e Ágar Manitol (AM) (Oxoid, Basingstoke, Inglaterra). Avaliou-se o comportamento tintorial pelo método de coloração de Gram e em seguida efetuaram-se provas de verificação da produção das enzimas catalase, coagulase e DNase.

Coloração de Gram – foi realizada para identificar os cocos gram-positivos e para controle da coloração utilizou-se as seguintes cepas: *Escherichia coli* ATCC (American Type Culture Collection) 25922; *S. aureus* ATCC 29213.

Prova da Catalase – Uma alçada de cultivo bacteriano puro foi transferida para uma lâmina limpa e adicionada uma gota de peróxido de hidrogênio 3% (H₂O₂). A formação de bolhas indicou prova positiva e a não formação prova negativa. Foram utilizadas como controles as seguintes cepas: *S. aureus* ATCC 29213 como controle positivo; *Streptococcus pyogenes* ATCC 49619 como controle negativo.

Produção de DNase - Para a realização do teste de detecção da enzima desoxirribosenuclease, uma colônia bacteriana foi semeada em meio Ágar DNase (DifcoLabs, Michigan, USA) e incubada a 36±2°C por 24h. Após o período de incubação, a visualização do halo de degradação do ácido nucleico contido no meio pôde ser vista pela precipitação do DNA, com a adição de ácido clorídrico (HCl 1N) (Vetec, Rio de Janeiro, Brasil) sobre a placa. O aparecimento de um halo claro ao redor das colônias foi interpretado como prova positiva, indicando hidrólise do DNA pela enzima desoxirribosenuclease encontrada em *S. aureus*. As cepas utilizadas como controle negativo foram *E. coli* ATCC 25922 e positivo *S. aureus* ATCC 29213

Produção de coagulase - A verificação da produção de coagulase foi determinada pelo kit Staphclin látex (Laborclin, Paraná, Brasil) que tem a finalidade de identificar *Staphyococcus aureus* por aglutinação em látex. O teste foi realizado de acordo com a bula do fabricante.; em uma lâmina disponibilizada pelo kit, adicionou-se uma colônia ou parte de uma colônia recente e pura, caso a colônia selecionada seja muito espessa adicionou-se uma gota de salina (não oferecida pelo kit) para diluição, em seguida, adicionou-se uma gota do reagente (disponível no kit) e com o palito também disponível no kit foi homogeneizado o conteúdo, fazendo movimentos circulares, a fim de observar a aglutinação, o teste foi considerado positivo quando a suspensão apresentou grumos grandes, vermelhos e bem visíveis; A cepa utilizada para controle positivo foi, *S. aureus* ATCC 29213.

Fermentação do manitol - Uma colônia foi semeada em meio Ágar Manitol Salgado (Oxoid, Basingstoke, Inglaterra) e foi incubada por até 48 horas a $36\pm 2^{\circ}\text{C}$ em aerobiose. O crescimento de colônias amarelas e alteração da coloração do meio (indicando que a bactéria consumiu o carboidrato gerando metabólitos ácidos) indicaram se tratar de *S. aureus*, pois os *Staphylococcus* coagulase negativo apresentam colônias com coloração rosada. Foi utilizado *S. aureus* ATCC 29213 como controle positivo e ATCC 12228 de *Staphylococcus epidermidis* foi utilizada com controle negativo.

2.4 Teste de Sensibilidade a Antimicrobianos

Para o teste de sensibilidade a antimicrobianos (TSA) foi utilizado o método de disco-difusão seguindo o protocolo do BrCast, 2022. As amostras bacterianas foram testadas para o antimicrobiano: cefoxitina – FOX (30 μg), para a confirmar o fenótipo MRSA. A partir de colônias puras e isoladas foi feita uma suspensão em solução salina 0,9% e ajustado à escala 0,5 de MacFarland, em seguida inoculadas com *swab* estéril em uma placa de Ágar Muller-Hinton (Himedia, São Paulo, Brasil). Os discos do antimicrobiano foram distribuídos de forma equidistante sobre a superfície da placa sendo incubados em estufa bacteriológica a $36^{\circ}\text{C}\pm 2^{\circ}\text{C}$ durante um período de 24h. Passado o período de incubação as placas foram analisadas quanto à presença de halos de inibição, com a utilização de régua foram medidos os diâmetros (mm) encontrados, verificando assim, se os organismos são sensíveis, sensível aumentando exposição ou resistentes de acordo com a tabela de pontos de corte disponibilizada pelo BrCast 2022.

2.5 Determinação da concentração inibitória mínima

Para cada amostra testada foi utilizado 12 poços de uma placa de microtitulação de 96 poços, sendo o primeiro poço, A1, inoculado com 200 μL de uma solução de uso, essa solução foi feita separadamente para cada antimicrobiano testado, tendo uma concentração máxima de 64 $\mu\text{g}/\text{mL}$.

A composição da solução de uso para os antimicrobianos ciprofloxacina e vancomicina foi de 0,10mg do antibiótico testado para cada mL de água destilada. O antimicrobiano sulfametoxazol-trimetoprima tem em sua composição dois antimicrobianos, trimetoprima e sulfametoxazol, sendo necessária realizar a pesagem de forma separada. Na solução de sulfametoxazol foi pesado 0,10mg do antimicrobiano e adicionado hidróxido de sódio (NaOH) até a completa dissolução do pó e na solução de trimetoprima, também foi pesado 0,10mg do antimicrobiano e adicionado ácido láctico até a completa dissolução do pó. Posteriormente, foi feita uma proporção de 19 parte de sulfametoxazol para 1 parte trimetoprima, obtendo uma diluição final de 19:1, para a solução de uso de sulfametoxazol-trimetoprima.

Nos 11 poços restantes foi inoculado 100µL de caldo Muller-Hinton ajustado – CAMHB (Kasvi, São Paulo, Brasil) em cada poço; partiu-se então, para uma diluição seriada passando 100µL do primeiro poço, A1, para o segundo poço, A2; do segundo poço, A2 para o terceiro poço, A3 e assim por diante até o décimo poço, A10, obtendo as seguintes diluições de antimicrobiano em cada poço respectivamente: 64, 32, 16, 8, 4, 2, 1, 0,5, 0,25 e 0,125 µg/mL.

Uma suspensão bacteriana com concentração de 10^7 UFC/mL foi produzida e 5µL dessa suspensão foi semeada nos poços correspondentes à amostra. Sendo sempre a primeira linha, A, da placa utilizada com a cepa padrão - Cepa controle de *S. aureus* ATCC 29213, a coluna 11 utilizada sempre como controle negativo e a coluna 12 sempre utilizada como controle positivo. O crescimento bacteriano na coluna 11 foi interpretado como teste inválido e o não crescimento na coluna 12 também apontava invalidade no teste, sendo necessária a repetição daquela amostra.

Após as diluições e a inoculação bacteriana das amostras nos seus respectivos poços essa placa foi incubada a $36^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ por 20h e em seguida foi feita uma leitura visual da turvação ou concentração de uma massa bacteriana no fundo do poço, para determinar a menor diluição capaz de inibir por completo o crescimento bacteriano do patógeno em sua forma planctônica (Eucast, 2022).

Todas as amostras foram feitas em duplicata, considerando o resultado da CIM a mesma concentração encontrada nos dois ensaios. Em caso de discordância, foi feita uma triplicata da amostra.

2.6 Concentração Bactericida Mínima

A Concentração Bactericida Mínima (CBM), é a determinação da menor concentração na qual não há crescimento nenhum de bactéria, ou seja, qual concentração mínima de determinado antibiótico é capaz de inibir o crescimento total do microrganismo.

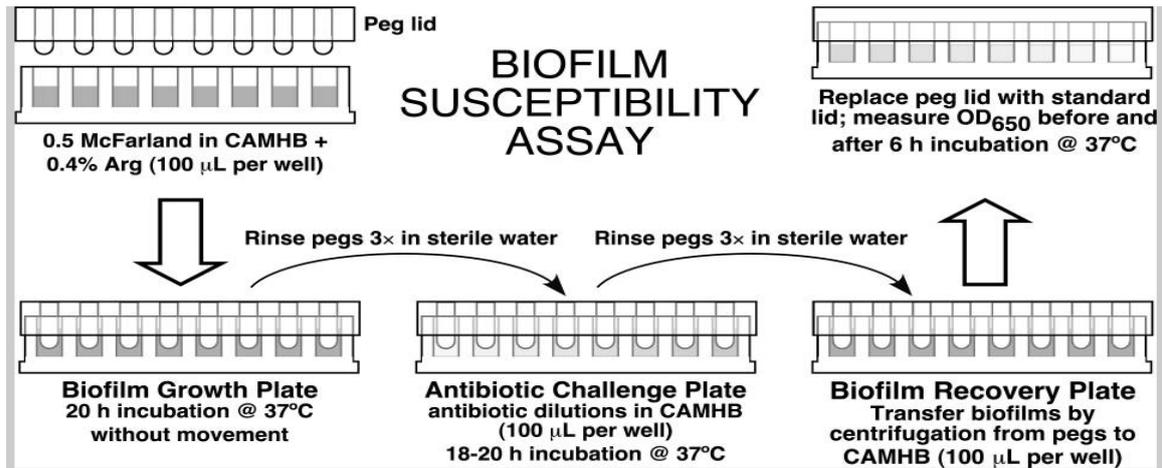
A partir da leitura de CIM foi feito o plaqueamento em Ágar Mueller-Hinton (Himedia, São Paulo, Brasil) de todas as concentrações que não obtiveram crescimento visível. As placas foram incubadas em estufa de $36^{\circ}\text{C}\pm 2^{\circ}\text{C}$ e foi feita a leitura após 24h do início da incubação, sendo considerada a CBM a concentração que não apresentou nenhum crescimento bacteriano.

2.7 Concentração Inibitória em Biofilme

A Concentração Inibitória em Biofilme (BIC) foi realizada segundo Moskowitz, 2013, com algumas modificações. Essa técnica foi dividida em três etapas: - a formação do biofilme; - a diluição em antibiótico e transferência; - e a recuperação do biofilme.

Os isolados bacterianos foram cultivados em Ágar Muller-Hinton (Himedia, São Paulo, Brasil), obtendo-se colônias puras e isoladas. Em seguida foi feita uma suspensão bacteriana ajustada à escala 0,5 de McFarland de cada amostra. Foi transferido 100 μL de CAMHB para os 96 poços de uma placa de microtitulação, em seguida foi transferido 100 μL da suspensão bacteriana antes produzida, cada amostra em uma linha da placa, sendo as colunas 11 e 12 usadas sempre para controle negativo e positivo (ATCC 29123 - *S. aureus*), respectivamente. Foi utilizada a tampa de pinos apropriada para a formação de biofilme (Figura 1). A incubação foi feita a $36^{\circ}\text{C}\pm 2^{\circ}\text{C}$ em estufa bacteriológica por 20h.

Figura 1 - Crescimento do Biofilme



Fonte: Adaptado de Moskowitz, 2004

A segunda etapa, dar-se início com a lavagem das tampas, 3 vezes com água destilada. Em seguida montamos a placa de microtitulação de acordo com a mesma técnica utilizada no CIM (item 3.5), utilizamos a mesma tampa da etapa anterior.

A placa foi incubada novamente em estufa bacteriológica a $36^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ por mais 20h.

Para recuperação e transferência do biofilme, iniciamos também com a lavagem das tampas, 3 vezes com água destilada. Em seguida transferimos a mesma tampa da etapa anterior para uma nova placa de microtitulação de 96 poços contendo 100µL de CAMHB em cada poço. Foi realizada uma centrifugação a 810X por 20 min, sendo feitos em dois ciclos de 10 minutos cada. Assim as tampas de pinos foram descartadas e trocadas por tampa padrão.

Foi feito uma leitura da OD₆₅₀ na 0h. Em seguida essa placa foi incubada por mais 6 horas a $36^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ em estufa bacteriológica e uma nova leitura da OD₆₅₀ foi feita na 6h, sendo os resultados definidos como as concentrações mais baixa da droga que resultaram da diferença entre a OD₆₅₀ na 6h da OD₆₅₀ na 0h.

O controle positivo foi feito utilizando a cepa ATCC 29213 – *S. aureus*.

2.8 Análise estatística

Para validar a análise comparativa entre as diferentes situações abordadas neste estudo foi utilizado o teste-t. Os dados foram avaliados no aplicativo Prisma (GraphPad, Inc., versão 10.0re). Qualquer diferença foi considerada significativa quando $p \leq 0,05$.

3 RESULTADOS

3.1 Confirmação da identificação bacteriana e do fenótipo MRSA

Os procedimentos laboratoriais empregados confirmaram a identificação de todas as amostras incluídas nesse estudo em *S. aureus*. Além disso, as amostras tiveram a resistência confirmada, pelo método de disco-difusão, para o antimicrobiano FOX, confirmando o fenótipo MRSA.

3.2 Avaliação da susceptibilidade aos antimicrobianos

3.2.1 Concentração Inibitória Mínima

A CIM para CIP entre as 26 amostras de MRSA exibiram concentrações cujo resultados variaram de 0,5 a 2µg/mL. Metade das amostras apresentavam CIM de 0,5µg/mL e 7 amostras (27%), CIM de 1 µg/mL. Nessas faixas (0,5 a 1), 3/4 das amostras foram categorizadas como sensíveis aumentando exposição. Apenas 1/4 das amostras foram caracterizadas como resistentes, com CIM de 2µg/mL (Tabela 1).

Observando a CIM de CIP frente aos dois centros analisados, o número de amostras resistentes foi similar, sendo três amostras provenientes do IFF e quatro provenientes do PPC. Entretanto CIM na faixa de 1µg/mL foi observada apenas em amostras oriundas do IFF, centro de acompanhamento pediátrico (Tabela 1).

Tabela 1 - Concentração Inibitória Mínima para ciprofloxacina em *Staphylococcus aureus* resistente à metilina (MRSA) isolados de secreções respiratórias de indivíduos com fibrose cística

Origem Hospitalar	Concentração do antimicrobiano ($\mu\text{g/mL}$)								
	0,25	0,5	1	2	4	8	16	32	64
IFF n= 16	0	6	7	3	0	0	0	0	0
PPC n= 10	0	7	0	3	0	0	0	0	0
Total n= 26	0	13	7	6	0	0	0	0	0

Legenda: Instituto Fernandes Figueira (IFF); Policlínica Piquet Carneiro (PPC).

Fonte: O autor, 2023.

Utilizando a determinação da CIM para VAN, todas as amostras foram classificadas com como sensíveis. A menor CIM observada foi de 0,5 $\mu\text{g/mL}$ e a maior de 2 $\mu\text{g/mL}$. Aproximadamente 70% (n=18) da amostragem apresentou CIM de 1 $\mu\text{g/mL}$, sendo 13 dessas oriundas do IFF (Tabela 2).

Tabela 2 - Concentração Inibitória Mínima para vancomicina em *Staphylococcus aureus* resistente à metilina (MRSA) isolados de secreções respiratórias de indivíduos com fibrose cística.

Origem Hospitalar	Concentração do antimicrobiano ($\mu\text{g/mL}$)								
	0,25	0,5	1	2	4	8	16	32	64
IFF n= 16	0	2	13	1	0	0	0	0	0
PPC n= 10	0	1	5	4	0	0	0	0	0
Total n= 26	0	3	18	5	0	0	0	0	0

Legenda: Instituto Fernandes Figueira (IFF); Policlínica Piquet Carneiro (PPC).

Fonte: O autor, 2023.

Pela determinação da CIM para SUT, as 26 amostras de MRSA exibiram concentrações cujo resultados variaram de 1 a 4 $\mu\text{g/mL}$. 2/3 das amostras incluídas no estudo apresentaram CIM na faixa de 2 $\mu\text{g/mL}$. Apenas seis amostras foram caracterizadas como sensíveis aumentando exposição, isto é, apresentando CIM de 4 $\mu\text{g/mL}$. Nenhuma das amostras testadas para este trabalho foram consideradas resistentes (Tabela 3).

Tabela 3 - Concentração Inibitória Mínima para sulfametoxazol-trimetoprima em *Staphylococcus aureus* resistente à metilina (MRSA) isolados de secreções respiratórias de indivíduos com fibrose cística

Origem Hospitalar	Concentração do antimicrobiano ($\mu\text{g/mL}$)								
	0,25	0,5	1	2	4	8	16	32	64
IFF n= 16	0	0	1	13	2	0	0	0	0
PPC n= 10	0	0	3	3	4	0	0	0	0
Total n= 26	0	0	4	16	6	0	0	0	0

Legenda: Instituto Fernandes Figueira (IFF); Policlínica Piquet Carneiro (PPC).

Fonte: O autor, 2023.

3.2.2 Determinação da MIC₅₀ e o MIC₉₀

Há duas variáveis de CIM que merecem ser estudadas: o MIC₅₀ e o MIC₉₀. Essas são consideradas ferramentas valiosas na análise epidemiológica e são úteis na determinação do plano de tratamento. O MIC₅₀ corresponde à menor concentração que consegue inibir 50% das amostras testadas. Por outro lado, o MIC₉₀ representa a quantidade mínima de medicamento necessária para inibir 90% das amostras. É importante notar que o MIC₉₀ é mais sensível do que o MIC₅₀.

A totalidade das amostras apresentou CIM₅₀ de 0,5 $\mu\text{g/mL}$, 1 $\mu\text{g/mL}$ e 2 $\mu\text{g/mL}$ e CIM₉₀ de 2 $\mu\text{g/mL}$, 1 $\mu\text{g/mL}$ e 2 $\mu\text{g/mL}$ para CIP, VAN e SUT, respectivamente (Tabela 4).

Tabela 4 - CIM₅₀ e CIM₉₀ para ciprofloxacina, vancomicina e sulfametoxazol-trimetoprima em *Staphylococcus aureus* resistente à meticilina (MRSA) isolados de secreções respiratórias de indivíduos com fibrose cística

Origem Hospitalar	Antimicrobiano	Concentração do antimicrobiano (µg/mL)			
		CIM ₅₀	CIM ₉₀	CIM _{min}	CIM _{max}
IFF n=16	CIP	1	2	0,5	2
	VAN	1	1	0,5	2
	SUT	2	2	1	4
PPC n= 10	CIP	0,5	2	0,5	2
	VAN	1	1	0,5	2
	SUT	2	4	1	4
Total n=26	CIP	0,5	2	0,5	2
	VAN	1	1	0,5	2
	SUT	2	2	1	4

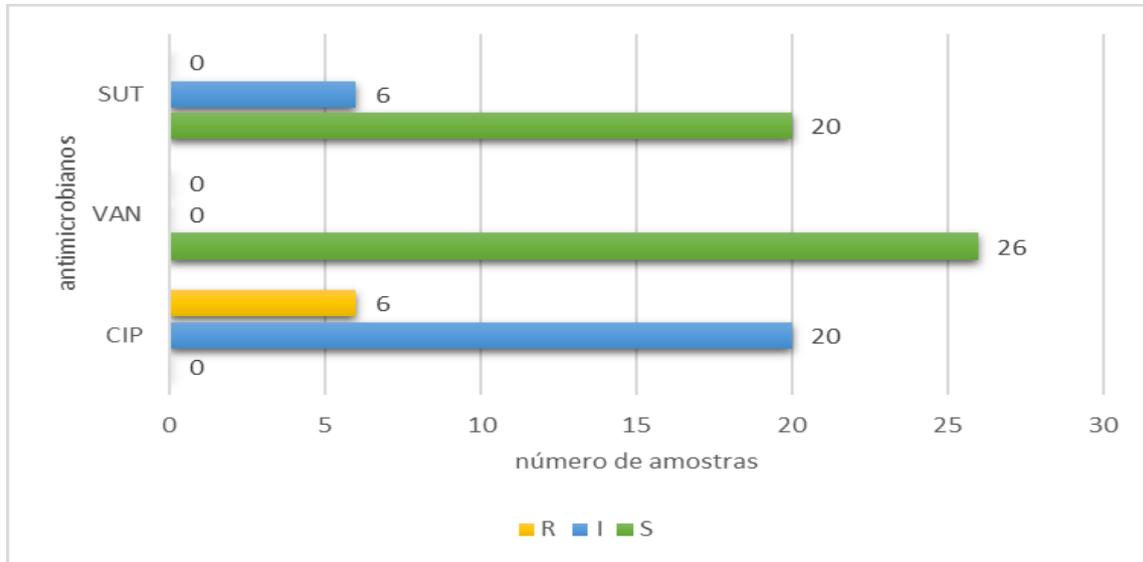
Legenda: Instituto Fernandes Figueira (IFF); Policlínica Piquet Carneiro (PPC); ciprofloxacina (CIP); vancomicina (VAN); sulfametoxazol-trimetoprima (SUT). CIM₅₀: representam as concentrações necessárias para inibir 50% das amostras; CIM₉₀: representam as concentrações necessárias para inibir 90% das amostras.

Fonte: O autor, 2023.

3.2.3 Determinação do perfil de resistência aos antimicrobianos

Analisando o perfil de resistência aos três antimicrobianos testados, frente as 26 amostras de MRSA, destacamos que a maioria dos antimicrobianos apresentaram CIM abaixo do ponto de corte que os categorizaram como sensível ou sensível aumentando exposição. Observamos que a categoria de sensíveis aumentando exposição foi observada na maioria das amostras para CIP (n=20/77%) e em 23% das amostras para SUT (n=6). Para VAN todas as amostras foram identificadas como sensíveis, sendo aproximadamente dois terços (n=20) das amostras apresentando sensibilidade simultânea aos antimicrobianos VAN e SUT. Casos de resistência (n=6) só foram observados para CIP (Gráfico 1).

Gráfico 1 - Perfil de susceptibilidade aos antimicrobianos em *Staphylococcus aureus* resistente à meticilina (MRSA) isolados de secreções respiratórias de indivíduos com fibrose cística



Legenda: ciprofloxacina (CIP); vancomicina (VAN); sulfametoxazol-trimetoprima (SUT); sensível (S); sensibilidade aumentando exposição (I); resistente (R).

Fonte: O autor, 2023.

Amostras com sensibilidade simultânea a VAN e SUT e sensibilidade aumentando exposição para CIP foram observados em 65,38% (n=17), sendo 12 amostras provenientes do IFF e cinco do PPC. Três amostras (9840, 18815 e 23049) apresentaram sensibilidade a VAN e sensibilidade aumentando exposição para CIP e SUT. O perfil resistente a CIP e sensível a VAN e SUT foi observado em duas amostras (7799 e 8394) provenientes do IFF e em uma única amostra (19630) obtida de paciente atendido na PCC. Em contrapartida a amostra 7687 proveniente do IFF e as amostras 19046 e 23050 oriundas do PPC, apresentaram o perfil resistente a CIP, sensível para VAN e sensibilidade aumentando exposição para SUT (Tabela 5).

Metade dos pacientes apresentaram duas ou mais amostras de MRSA analisadas. As amostras 18815 e 19627 provenientes do paciente quatro apresentaram um perfil de resistência diferente para o antimicrobiano SUT, a amostra 18815 coletada em dezembro de 2014 apresentava um padrão de sensibilidade aumentando exposição e a amostra 19627 de junho de 2015, seis meses após a primeira coleta, apresentou um padrão sensível para SUT, ambas foram obtidas de escarro (Tabela 5).

O paciente cinco, também com duas amostras, 9122 e 8394, ambos *spa type* t1605, apresentou uma diferença no perfil de resistência para CIP, sendo a amostra 8394 coletada em

janeiro de 2009 apresentando um perfil resistente para CIP. Seis meses após a primeira coleta a amostra 9122 apresentou o perfil sensível aumentando exposição para o mesmo antimicrobiano, sendo as duas coletadas do mesmo espécime clínico, *swab* nasal.

O paciente sete também apresentou uma diferença no perfil de resistência para CIP, com apenas um mês de diferença entre as coletas das amostras. A amostra 19630 coletada em junho de 2015 apresentou um perfil resistente e a amostras 19785 coletada em julho do mesmo ano apresentou um perfil sensível aumentando exposição.

O paciente oito com amostras coletadas com um ano de diferença, 8891 coletado em 2009 e 10158 de 2010, apresentou o mesmo perfil de resistência, compartilhando também o mesmo *spa type* (t002).

No paciente 10 foi observado que a primeira amostra, 7799, coletada em 2008, apresentava um perfil resistente para CIP e *spa type* t002, quatro anos após a primeira coleta em 2012, a amostra 14197 apresentou um *spa type* diferente, t318 e o perfil para CIP foi sensível aumentando exposição.

Do paciente 11 foram coletadas três amostras todas tipificadas com o *spa type* t002, a amostra 7687 coletada em 2008 apresentou um perfil resistente para CIP, um ano após a primeira coleta, em 2009, as amostras 8484, coletada em fevereiro e 9065 coletada em junho apresentaram o mesmo perfil de resistência.

Do paciente 12, obtivemos duas amostras, 23049 e 23050 coletadas no mesmo dia 30/07/2021 que apresentaram um perfil diferente para o antimicrobiano CIP, sendo a primeira sensível aumentando exposição e a segunda resistente, respectivamente.

E o paciente 15 apresentou três amostras (10279, 12481 e 18904), todas apresentaram o mesmo perfil de resistência e o *spa type* t002 foi identificado para duas amostras que foram coletadas do mesmo espécime clínico, *swab* nasal (Tabela 5).

Tabela 5 - Perfis de resistência aos antimicrobianos em amostras de *Staphylococcus aureus* resistente à meticilina (MRSA) isolados de secreções respiratórias de indivíduos com fibrose cística

Paciente	Amostras	Perfil de resistência				Clínica	Espécime clínico	Spa type
		FOX	CIP	VAN	SUT			
1	9066	R	I	S	S	IFF	Swab	t539
2	14194	R	I	S	S	IFF	Swab	t18066
3	14196	R	I	S	S	IFF	Swab	t021
4	18815	R	I	S	I	PPC	Escarro	
	19627	R	I	S	S	PPC	Escarro	
5	9122	R	I	S	S	IFF	Swab	t1605
	8394	R	R	S	S	IFF	Swab	t1605
6	9840	R	I	S	I	IFF	Escarro	t002
7	19630	R	R	S	S	PPC	Escarro	
	19785	R	I	S	S	PPC	Escarro	
8	8891	R	I	S	S	IFF	Swab	t002
	10158	R	I	S	S	IFF	Swab	t002
9	19046	R	R	S	I	PPC	Escarro	
10	7799	R	R	S	S	IFF	Swab	t002
	14197	R	I	S	S	IFF	Swab	t318
11	7687	R	R	S	I	IFF	Swab	t002
	8484	R	I	S	S	IFF	Swab	t002
	9065	R	I	S	S	IFF	Swab	t002
12	23049	R	I	S	I	PPC	Escarro	
	23050	R	R	S	I	PPC	Escarro	
13	10430	R	I	S	S	IFF	Swab	t002
14	19133	R	I	S	S	PPC	Escarro	
15	10279	R	I	S	S	IFF	Swab	t002
	12481	R	I	S	S	IFF	Swab	t002
	18904	R	I	S	S	PPC	Escarro	
16	130/22	R	I	S	S	PPC	Escarro	

Legenda: cefoxitina (FOX); ciprofloxacina (CIP); vancomicina (VAN); sulfametoxazol-trimetoprima (SUT); sensível (S); sensibilidade aumentando exposição (I); resistente (R); Instituto Fernandes Figueira (IFF); Policlínica Piquet Carneiro (PPC).

Fonte: O autor, 2023.

3.3 Concentração Bactericida Mínima

Analisando os resultados de CBM, observamos que a faixa de concentração variou de 0,5 a 2 µg/mL para CIP e VAN. Para SUT essa faixa variou entre 1 a 8 µg/mL. Casos de

similaridade com os resultados de CIM foi observado para os três antimicrobianos testados. Em 69,3% (n=18) dos casos encontrados tendo resultados similares ao encontrado na CIM para CIP, nove casos apresentaram uma concentração de 0,5 µg/mL, as amostras 8484, 9065 e 9066 apresentaram concentração de 1 µg/mL e seis casos concentração 2 µg/mL. Para VAN toda a nossa amostragem (100%) apresentou resultado similar ao encontrado no CIM. E para SUT 84,7% (n=22) também apresentou a mesma similaridade com os resultados de CIM, sendo quatro casos com concentração de 1 µg/mL, 14 casos apresentando concentração de 2 µg/mL e quatro casos concentração de 4 µg/mL.

Oito amostras apresentaram concentrações diferentes entre CIM e CBM para CIP, cinco amostras provenientes de IFF e três do PPC. Para SUT observamos quatro casos com essa diferença, sendo duas amostras provenientes de IFF e duas do PPC. Observamos que a amostra 18815 apresentou uma diferença de duas diluições para os dois antimicrobianos acima citados e as demais amostras apresentaram a diferença de uma diluição entre os resultados de CIM e CBM (Tabela 6).

Tabela 6 - Resultados da concentração inibitória mínima e concentração bactericida mínima para o antimicrobiano ciprofloxacina, vancomicina, sulfametoxazol-trimetoprima de amostras de MRSA recuperadas de paciente com FC

Antimicrobianos	N° de amostras (%)					P
	0,5 µg/mL	1 µg/mL	2 µg/mL	4 µg/mL	8 µg/mL	
CIP CIM	13 (50)	7 (30)	6 (23)	0	0	0,023
CIP CBM	9 (34,6)	6 (23)	11 (42)	0	0	
VAN CIM	3 (11,5)	18 (69)	5 (19,2)	0	0	0,01
VAN CBM	3 (11,5)	18 (69)	5 (19,2)	0	0	
SUT CIM	0	4 (15,3)	16 (61,5)	6 (23)	0	0,034
SUT CBM	0	5 (19,2)	14 (54)	6 (23)	2 (7,7)	

Legenda: ciprofloxacina (CIP); vancomicina (VAN); sulfametoxazol-trimetoprima (SUT); concentração inibitória mínima (CIM) e concentração bactericida mínima (CBM). Significativo quando $p \leq 0,05$.

Fonte: O autor, 2023.

3.4 Concentração Inibitória Mínima em formação de Biofilme

Todas as amostras de MRSA incluídas nesse estudo demonstraram a capacidade de formar biofilme. As amostras que apresentaram uma DO de até 0,05 foram consideradas fracas formadoras de biofilme, aquelas que apresentaram uma DO entre 0,06 e 0,103 foram

identificadas como formadoras moderadas e as amostras que revelaram uma DO acima de 0,104 foram classificadas como fortes formadoras de biofilme. A cepa ATCC 29213, considerada uma forte formadora de biofilme, apresentando uma DO de 0,206. (Oliveira, 2010)

Entre elas, 15 (57,7%) exibiram uma capacidade fraca, 7 (30%) capacidade moderada de formação de biofilme, enquanto outras 4 (15,3%) mostraram uma capacidade forte. As amostras classificadas como forte formadoras de biofilme apresentaram uma média de densidade óptica (DO) de 0,206 com um intervalo de variação de 0,108 a 0,147. Já as amostras moderadas variaram entre 0,061 e 0,095, com uma média de DO de 0,103 (Tabela 7).

Tabela 7 – Capacidade de formação de biofilme em cepas de *Staphylococcus aureus* resistente a metilina

Capacidade de Formação de biofilme	Nº de amostras (%)	DO média	Intervalo de variação da DO
Fraca	15 (57,7)	0,05	0,01 - 0,059
Moderada	7 (30)	0,103	0,061 - 0,095
Forte	4 (15,3)	0,206	0,108 - 0,147

Legenda: DO – densidade ótica.

Fonte: O autor, 2024.

A determinação da CIM em formação de biofilme para o antimicrobiano CIP variou entre 8 µg/mL e 64 µg/mL. Sendo, em 18 amostras obtivemos a concentração de 64 µg/mL, apenas 2 amostras a concentração foi de 32 µg/mL, em 5 amostras a concentração foi de 16 µg/mL e 1 amostra teve concentração de 8 µg/mL Para o antimicrobiano VAN, tivemos a mesma variação, entre 8 µg/mL e 64 µg/mL. Sendo, em 20 amostras obtivemos a concentração de 64 µg/mL, em apenas 1 amostras foi encontrado a concentração de 32 µg/mL, em 2 amostras a concentração foi de 16 µg/mL e, em 3 amostras apresentaram a concentração de 8 µg/mL

O último antimicrobiano testado foi SUT e para esse fármaco tivemos uma variação entre 16 µg/mL e 64 µg/mL, sendo em 18 amostras a CIM obtida foi de 64 µg/mL, em 4 amostras a concentração foi de 32 µg/mL e em 4 amostras obtivemos a concentração de 16 µg/mL

Foi observado que a maioria das amostras testadas (cerca de 77%) para os três antimicrobianos, a concentração obtida foi de 64 µg/mL, sendo necessário testar

concentrações >64 µg/mL para termos uma definição mais precisa da concentração necessária para esses antimicrobianos surtirem efeito em cepas de MRSA.

3.5 Comparação da Concentração Inibitória Mínima em formação de Biofilme

Observamos que a faixa de concentração de CIM para CIP variou entre 0,5 a 2 µg/mL em contrapartida para o mesmo antimicrobiano a faixa de BIC variou entre 8 a 64 µg/mL. Considerando que em 20 amostras obtivemos a concentração de 64 µg/mL, apenas a amostra 14194 apresentou concentração igual a 32 µg/mL, quatro amostras (9840, 8891, 8484 23050) tiveram resultado de BIC 16 µg/mL e a amostra 10158 apresentou BIC de 8 µg/mL (Tabela 8).

Avaliando da concentração inibitória mínima em formação de biofilme, para CIP, em 42,30% (n=11) do total das amostras analisadas, foi necessário uma concentração $128x \geq$ do que quando avaliado em condições planctônica; para a amostra 14194 essa concentração foi de $64x$ maior e em quatro caso tivemos uma concentração necessária de $64x \geq$ do que quando comparado à condições planctônica; menos de 1/3 das amostras a concentração necessária foi de $32x \geq$, para as amostras 8484, 8891, 9840 e 10158 essa concentração foi de 16x maior e apenas a amostra 23050 precisou de uma concentração 8x maior do que quando avaliado em condições planctônica (Tabela 8).

Para VAN também tivemos uma variação de CIM entre 0,5 a 2 µg/mL e de BIC entre 8 a 64 µg/mL. Avaliamos que em 18 amostras o resultado para BIC foi de 64 µg/mL, duas amostras (14194 e 9065) com BIC de 32 µg/mL, as amostras 9840, 8891, 8484, 10430 e 12481 com BIC de 16µg/mL e uma, 10158 com BIC de 8µg/mL (Tabela 8).

Comparando os resultados de CIM x BIC para VAN notamos que para a amostra 23050 foi necessária uma concentração de $128x \geq$, em 46,15% (n=12) essa concentração foi de $64x \geq$ e apenas a amostra 9065 se mostrou necessário uma concentração 64x maior em comparação com a CIM. Em menos de 1/3 a concentração foi de $32x \geq$ e em 11,53% (n=3) foi necessária uma concentração de 32x e 16x maior do que quando analisado em CIM. Apenas a amostra 10158 se mostrou necessária a concentração 8x maior (Tabela 8).

Os resultados de CIM para SUT variou entre 1 a 8 µg/mL, já para BIC essa variação foi de 16 a 64 µg/mL, sendo 18 amostras com resultado de BIC 64µg/mL, as amostras 14194, 19630, 14197 e 12481 com BIC de 32 µg/mL e quatro amostras (19627, 9122, 19785 e

18904) com BIC igual a $16\mu\text{g/mL}$. Em comparação com a CIM podemos analisar que em apenas uma amostra, 19133 a concentração necessária se mostrou $64x \geq$, em 42,30% ($n=11$) tivemos uma concentração de $32x \geq$ e apenas a amostra 14197 se mostrou necessária a concentração de $32x$ maior em relação a CIM. Em 23,08% ($n=6$) essa concentração se mostrou $16x \geq$ e em 19,23% ($n=5$) precisamos de uma concentração $16x$ maior e para as amostras 9122 e 19627, uma concentração $8x$ maior quando comparada com os resultados de CIM para o mesmo antimicrobiano (Tabela 8).

Observamos também que em 46,15% ($n=12$) foi observado que o valor de BIC para os três antimicrobianos foi igual. Já nas amostras 9122, 19627, 19785 e 18904 o valor de BIC encontrados foi de $64\mu\text{g/mL}$, $64\mu\text{g/mL}$ e $16\mu\text{g/mL}$, respectivamente para CIP, VAN e SUT. Três amostra (9840, 8891 e 8484) apresentaram resultado $16\mu\text{g/mL}$, $16\mu\text{g/mL}$ e $64\mu\text{g/mL}$. Os resultados $64\mu\text{g/mL}$, $64\mu\text{g/mL}$ e $32\mu\text{g/mL}$ foram encontrados nas amostras 19630 e 14197. Para a amostra 10158 foi obtido resultado $8\mu\text{g/mL}$ para CIP e VAN e $64\mu\text{g/mL}$ para SUT, para a amostra 9065 o resultado $64\mu\text{g/mL}$ foi obtido para CIP e SUT, em VAN o resultado foi de $32\mu\text{g/mL}$. A amostra 23050 apresentou um resultado de $16\mu\text{g/mL}$ para CIP e $64\mu\text{g/mL}$ para VAN e SUT. A amostra 12481 obtivemos um resultado diferente pra os três antimicrobianos, $64\mu\text{g/mL}$, $16\mu\text{g/mL}$ e $32\mu\text{g/mL}$ respectivamente, e para a amostra 10430 obtivemos CIP e SUT com resultados $64\mu\text{g/mL}$ e VAN com um resultado de $16\mu\text{g/mL}$ (Tabela 8).

Tabela 8 - Resultados da concentração inibitória mínima e concentração inibitória mínima em formação de biofilme para os antimicrobianos ciprofloxacina, vancomicina, sulfametoxazol-trimetoprima de amostras de MRSA recuperadas de paciente com FC

Paciente	Amostra	Antimicrobianos								Relação CIM x BIC
		CIP ($\mu\text{g/mL}$)		Relação CIM x BIC	VAN ($\mu\text{g/mL}$)		Relação CIM x BIC	SUT ($\mu\text{g/mL}$)		
		CIM	BIC		CIM	BIC		CIM	BIC	
1	9066	1	64	$64x \geq$	1	64	$64x \geq$	2	64	$32x \geq$
2	14194	0,5	32	$64x$	1	32	$32x$	2	32	$16x$
3	14196	0,5	64	$128x \geq$	1	64	$64x \geq$	2	64	$32x \geq$
4	18815	0,5	64	$128x \geq$	1	64	$64x \geq$	4	64	$16x \geq$
	19627	0,5	64	$128x \geq$	2	64	$32x \geq$	2	16	$8x$
5	9122	0,5	64	$128x \geq$	1	64	$64x \geq$	2	16	$8x$
	8394	2	64	$32x \geq$	2	64	$32x \geq$	2	64	$32x \geq$
6	9840	1	16	$16x$	0,5	16	$32x$	4	64	$16x \geq$
7	19630	2	64	$32x \geq$	1	64	$64x \geq$	2	32	$16x$
	19785	0,5	64	$128x \geq$	2	64	$32x \geq$	1	16	$16x$
8	8891	1	16	$16x$	0,5	16	$32x$	2	64	$32x \geq$
	10158	0,5	8	$16x$	1	8	$8x$	2	64	$32x \geq$
9	19046	2	64	$32x \geq$	1	64	$64x \geq$	4	64	$16x \geq$
10	7799	2	64	$32x \geq$	1	64	$64x \geq$	2	64	$32x \geq$
	14197	0,5	64	$128x \geq$	1	64	$64x \geq$	1	32	$32x$

11	7687	2	64	32x ≥	1	64	64x ≥	4	64	16x ≥
	8484	1	16	16x	1	16	16x	2	64	32x ≥
	9065	1	64	64x ≥	1	32	64x	2	64	32x ≥
12	23049	0,5	64	128x ≥	2	64	32x ≥	4	64	16x ≥
	23050	2	16	8x	0,5	64	128x ≥	4	64	16x ≥
13	10430	0,5	64	128x ≥	1	16	16x	2	64	32x ≥
14	19133	0,5	64	128x ≥	1	64	64x ≥	1	64	64x ≥
15	10279	1	64	64x ≥	1	64	64x ≥	2	64	32x ≥
	12481	1	64	64x ≥	1	16	16x	2	32	16x
	18904	0,5	64	128x ≥	1	64	64x ≥	1	16	16x
16	130/22	0,5	64	128x ≥	2	64	32x ≥	2	64	32x ≥

Legenda: ciprofloxacina (CIP); vancomicina (VAN); sulfametoxazol-trimetoprima (SUT); concentração inibitória mínima (CIM) e concentração inibitória mínima em formação de biofilme (BIC).

Fonte: O autor, 2024

4 DISCUSSÃO

A fibrose cística tem uma incidência de aproximadamente 1:7.576 nascidos vivos no Brasil, exceto no Sul do país, cuja incidência cai para 1:2.500 indivíduos nascidos vivos são portadores do gene CFTR (Athanzio, 2017). Esses dados sugerem uma distribuição desigual da doença no território nacional, refletindo o histórico de migrações europeias para o Sul, onde a população caucasiana é mais prevalente. Essa diferença na distribuição da FC tem relevância tanto para o diagnóstico quanto para o desenvolvimento de terapias de tratamento. Regiões com maior registro da doença, deverá requerer programas específicos de triagem neonatal para garantir que os pacientes sejam identificados e tratados precocemente (Ribeiro, 2021).

O último relatório do REBRAFC publicado em 2021 apresentou um $n= 6.427$ indivíduos registrados em seu sistema, sendo $n=15$ estrangeiros e $n= 6.412$ brasileiros, abrangendo 51,22% ($n= .3292$) de indivíduos do sexo masculino e 48,78% ($n= 3.135$) do sexo feminino, entre ≤ 05 anos e ≥ 50 anos. A população pediátrica ainda é predominante, com um percentual de 68,74% indivíduos entre ≤ 05 e ≤ 15 anos, totalizando um $n= 2.118$ crianças portadoras de FC em nosso país. O presente trabalho, evidência essa predominância, onde 61,5% ($n=16$) das amostras são provenientes do IFF/Fiocruz, centro de referência para o tratamento da doença materno-infantil (IFF/Fiocruz, 2005).

Essa predominância está entre os indivíduos caucasianos, que representam 69,04% ($n= 4.437$) nos casos registrados. O Sudeste do país com 44,12% ($n= 2.829$) é a região onde predomina os casos de FC, seguido pelo Sul com 23,03% ($n= 1,477$) e Nordeste com 17,37% ($n= 1.114$). As cidades de São Paulo, Minas Gerais, Rio Grande do Sul, Paraná e Bahia, com 26,8%, 12,4%, 8%, 7,5% e 7,3%, respectivamente, são as que apresentaram o maior número de registros (REBRAFC, 2021).

A predominância da população pediátrica em nosso país destoa dos números observados em países desenvolvidos, o relatório anual de paciente com FC de 2022 da Fundação de Fibrose Cística (CFF), apontou um crescimento na população adulta passando de 32,8% em 1992 para 59,4% em 2022, e a população pediátrica se manteve estável, atualmente sendo representada por 40,6% dos casos. Os Estados Unidos hoje, tem um total de $n= 32.621$ indivíduos cadastrados na CFF, onde 91,2% são brancos, o que demonstra que a população branca mundial tem mais propensão a desenvolver FC. (CFF, 2022)

A expectativa de vida dos pacientes com FC no Brasil também apresenta uma diferença significativa em relação ao Estado Unidos, onde a média de óbitos de acordo com a idade do indivíduo é de 21,5 anos, com a idade máxima de sobrevivência em 45,6 anos. Diferentemente dos dados divulgados pela CFF em seu relatório de 2022, que apresenta a idade média de sobrevivência em 68,2 anos para indivíduos nascidos com FC em 2022, essa diferença se dá devido, principalmente, ao diagnóstico precoce e ao acesso a tratamentos especializados (CFF, 2022; REBRACFC, 2021; Athanazio, 2017).

Apesar dos avanços no diagnóstico precoce e no desenvolvimento de tratamentos especializados, esse cenário reflete a necessidade urgente de melhorias na gestão da saúde desses pacientes no Brasil, incluindo maior investimento em centros de referência, capacitação de profissionais de saúde e desenvolvimento de políticas públicas que assegurem o acesso a tratamentos inovadores e de alta qualidade para todos.

Por ser uma doença hereditária, de caráter multissistêmica e progressiva, o tratamento de indivíduos com FC deve ser feito por uma equipe multidisciplinar, com o objetivo de ser atendida as necessidades em particular de cada paciente, possibilitando, assim uma melhor qualidade de vida para os mesmos (Castellani, 2018).

A FC compromete principalmente o sistema respiratório, sendo necessário terapias pulmonares como: fisioterapias respiratórias, medicamentos broncodilatadores, mucolíticos e antimicrobianos, além de tratamentos específicos para os outros sistemas que podem ser comprometidos pela disfunção da CFTR, como por exemplo o sistema digestório, sendo necessário fazer o uso de enzimas pancreáticas, vitaminas e suplementos para auxiliar na absorção de nutrientes (Allen, 2023).

Além das terapias tradicionais, o desenvolvimento de terapias genéticas vem aumentando nas últimas décadas, moduladores do gene CFTR tem o objetivo de corrigir mutação relacionadas a esse gene, fornecendo um modelo correto para o funcionamento normal das células (Ensinck,2022).

Porém o tratamento medicamentoso ainda se faz necessário, pois o pulmão como principal órgão atingido, se torna uma fonte de microrganismos por sua natureza mucosa, apresentando maior susceptibilidade a contaminações por *S. aureus*, *P. aeruginosa*, *Burkholderia cepacia*, entre outras bactérias (Ensinck,2022). A presença crônica dessas bactérias nos pulmões dos pacientes com FC leva a inflamações e danos pulmonares progressivos, sendo a principal causa de morbidade e mortalidade nesses indivíduos (Rodrigues, 2019).

A terapia medicamentosa em episódios de exarcebações pulmonares é crucial. As frequentes exarcebações, resultam em maior exposição aos antimicrobianos, favorecendo a seleção de microrganismos multirresistentes. Com isso, a escolha dos antimicrobianos e a duração do tratamento são questões que dependem do perfil de resistência dos patógenos envolvidos, da resposta do paciente ao tratamento e da necessidade de minimizar os efeitos colaterais dos medicamentos (Rodrigues, 2019).

Um dos principais colonizadores de infecções pulmonares em paciente com FC, o *S. aureus* é um patógeno bem adaptado a esse ambiente pulmonar, possuindo uma difícil erradicação, pois determinantes genéticos como por exemplo, a presença do gene *mec A* e *mec C*, atribui a esse patógeno uma resistência à metilina e a todos os antimicrobianos β -lactâmicos. Além disso esse patógeno possui uma grande capacidade em formar biofilme, o que dificulta os tratamentos medicamentosos (Goss, 2011).

Sendo o biofilme um fator de virulência que age como uma barreira física e química protegendo as bactérias em diferentes estágios, contra a ação dos antimicrobianos e do sistema imunológico do hospedeiro, permitindo que as infecções persistam cronicamente e aumentem o risco de exarcebações pulmonares graves (He X, 2022).

Entre 2007 e 2022 houve uma diminuição no número de indivíduos fibrocísticos com cultura microbiológica positiva para MRSA, dados americanos evidenciam que a prevalência em 2007 era de 21,3% de cepas positivas para MRSA, em 2012 esse número teve um leve aumento passando para 26,6%, a partir de 2017, observou-se um declínio no número de cepas positivas para MRSA, sendo esse ano marcado com 25,9%, em 2021 foram registradas 18% de cepas positivas para MRSA e em 2022 esse número diminuiu ainda mais, passando para 15,6% de cepas positivas, com o auxílio das terapias genéticas esse número tende a se estabilizar (CFF, 2022; Rodrigues, 2019).

O antibiograma é um importante aliado na rotina laboratorial, não somente pela determinação do perfil de resistência do patógeno diante do antimicrobiano testado, mas também auxilia e promove uma mudança no manejo terapêutico, fornecendo dados sobre o mecanismo de resistência bacteriano e detecção de padrões incomuns. A interpretação correta dos resultados desse teste é importante para a escolha do tratamento mais eficaz, especialmente em um cenário de aumento da resistência bacteriana, onde o uso inadequado de antimicrobianos pode levar a falhas terapêuticas e ao desenvolvimento de cepas ainda mais resistentes (CLSI, 2021; Humphries, 2021).

A exposição constante aos antimicrobianos, comumente administrados nos pacientes com FC, exerce uma forte pressão seletiva sobre os microrganismos, o que acaba

influenciando na plasticidade do genoma desses patógenos. *S. aureus*, em particular, exibe uma alta taxa de mutação durante a infecção pulmonar em pacientes com FC, uma característica que difere das cepas que colonizam indivíduos saudáveis. Essa elevada capacidade de mutação permite que esse microrganismo se adapte rapidamente ao ambiente hostil das vias aéreas comprometidas desses pacientes, facilitando sua sobrevivência e permanência no organismo, mesmo diante de tratamentos antimicrobianos agressivos. Essa adaptabilidade genética é um dos principais fatores que contribuem para a dificuldade no manejo clínico das infecções por *S. aureus* em pacientes com FC (Kahl, 2016; Rodrigues, 2019).

A análise do *spa type* em cepas de *S. aureus* ajuda a entender a dinâmica da resistência bacteriana, especialmente em relação a cepas MRSA. O gene *spa* codifica a proteína A, um importante fator de virulência em *S. aureus*, e suas variações são frequentemente usadas como marcador genético para tipagem molecular. Essa tipagem permite a identificação e a monitorização de diferentes clones bacterianos que circulam em ambientes hospitalares e comunitários, ajudando a rastrear a disseminação de cepas resistentes e a avaliar a eficácia das estratégias de controle de infecções (Shopsin, 2001).

Além disso, essa análise molecular fornecer dados sobre a evolução e a adaptação desses microrganismos em resposta ao uso de antimicrobianos. Ao identificar padrões específicos de mutações ou associações entre tipos de *spa type* e resistência a certos antimicrobianos, pesquisadores podem prever a iminência de novas cepas resistentes e ajustar as terapias antimicrobianas de forma mais adequada. Esse conhecimento é importante para o desenvolvimento de políticas de saúde pública e para a implementação de medidas de prevenção e controle de infecções, contribuindo para a mitigação da resistência bacteriana global (O'Hara, 2016).

Todas as amostras incluídas nesse estudo, fizeram parte de um outro trabalho realizado pelo nosso grupo (Rodrigues, 2019). As amostras tiveram seu perfil de resistência a oxacilina confirmada pelo teste de disco difusão, utilizando-se cefoxitina. É sabido que os métodos laboratoriais comuns para detectar MRSA, como a difusão em disco de cefoxitina por si só, podem falhar na detecção de resistência à meticilina devido ao BORSA (*S. aureus* resistente à oxacilina), que são caracterizadas pela hiperprodução de enzimas β -lactamases, capazes de quebrar a meticilina (Samsudin, 2024). Cabe ressaltar, que essa possibilidade foi descartada nesse estudo uma vez que todas as amostras incluídas foram previamente detectadas o gene *mecA*.

Foi analisado a concentração inibitória mínima pra três antimicrobianos distintos, ciprofloxacina, vancomicina e trimetoprim-sulfametoxazol. Seguindo as orientações do BrCast, foi obtido que 23% (n=6) da nossa amostragem se mostrou resistente para o antimicrobiano ciprofloxacina e 77% (n=20) se mostrou sensível para o mesmo antimicrobiano. Para a vancomicina 100% (n=26) dos nossos isolados apresentaram sensibilidade e para o antimicrobiano trimetoprim-sulfametoxazol, 23,07% (n=6) apresentaram resistência intermediária e 76,92% (n=20) apresentou sensibilidade, sendo nenhuma amostra apresentando resistência. Esses resultados demonstram a importância de uma abordagem personalizada no tratamento de infecções em pacientes com FC, levando em consideração o perfil de resistência local e as características individuais de cada paciente.

Em um estudo realizado por Tran em 2023 que teve como objetivo determinar a taxa de isolados de cepas MRSA que causam pneumonia grave em crianças e avaliar seu nível de resistência a antimicrobianos, demonstrou sensibilidade para o antimicrobiano ciprofloxacina em 65,6% (n=21), um resultado próximo ao que encontramos nesse estudo para a análise de resistência de cepas MRSA em exposição ao antimicrobiano ciprofloxacina (Tran, 2023). No mesmo trabalho, Tran avaliou o antimicrobiano vancomicina para as mesmas cepas e seu resultado apresentou 100 % (n=32) de sensibilidade para esse fármaco, cujo resultado é igual ao encontrado nesse trabalho (Tran, 2023).

O trabalho realizado em 2021 por Jaradat, teve como objetivo avaliar a ocorrência e distribuição de MRSA em diferentes fômites em instalações públicas no norte da Jordânia e determinar seus antibiogramas, ele avaliou 158 isolados de MRSA, onde 15,3% (n=58) apontou resistência a ciprofloxacina e nenhum dos isolados apresentaram resistência a vancomicina. Mesmo a técnica que Jaradat utilizou tenha sido o de disco de difusão os resultados corroboram com os apresentados nesse estudo para os dois antimicrobianos testados (Jaradat, 2021).

Em 2020 um trabalho realizado na Europa por Numanovic apontou o clone sul-alemão de MRSA classificado com *spa type* t041 resistente à ciprofloxacina em 90,48% dos casos (Numanovic, 2020).

Esses dados demonstram a importância de conhecer a origem genética de cada cepa e seu perfil de resistência para guiar o tratamento de forma mais coerente e precisa, além de demonstrar a alta capacidade de cepas MRSA terem perfis diferentes de acordo com a sua origem, o que demonstram a crescente dificuldade no tratamento de infecções por MRSA, especialmente em pacientes com FC, onde a exposição prolongada a antimicrobianos pode selecionar cepas altamente resistentes.

Em relação à análise de resistência de cepas MRSA para o antimicrobiano vancomicina, além dos estudos citados anteriormente, Rossato, 2020 publicou um estudo intitulado “CIM para vancomicina e disfunção *agr* em infecções invasivas por MRSA no sul do Brasil”, que teve como objetivo avaliar a associação entre CIM da vancomicina e disfunção *do agr* em isolados invasivos de MRSA, nesse estudo, os 171 isolados obtidos de 2014 a 2019 apresentaram sensibilidade para vancomicina, demonstrando que a vancomicina ainda é o fármaco de primeira linha para o tratamento de FC, mesmo havendo algumas cepas apresentando resistência a vancomicina essas cepas ainda não são prevalentes entre os pacientes de FC (Rossato, 2020).

Contudo, é importante monitorar continuamente o surgimento de cepas resistentes à vancomicina, pois surgimento de tais cepas podem ter consequências devastadoras, limitando severamente as opções terapêuticas disponíveis para esses pacientes.

Para o antimicrobiano trimetoprima-sulfametoxazol 76,92% (n=20) das nossas amostras se mostraram sensíveis e 23,07% (n=6) se mostrou com resistência intermediária. Duarte, 2018 publicou um estudo onde foi analisado a resistência a antimicrobianos em cepas de *S. Aureus* em um período de 15 anos, onde apresentou um resultado de diminuição da resistência para os antimicrobianos trimetoprim-sulfametoxazol e gentamicina no período estudado. O que pode explicar o nosso resultado de CIM onde nenhuma das nossas cepas apresentaram resistência para o fármaco trimetoprim-sulfametoxazol. Também nesse estudo, o autor apontou uma elevação crescente na CIM para vancomicina no mesmo período, o que mais uma vez demonstra a importância de conhecer a origem genética de cada cepa MRSA (Duarte, 2018).

Outro estudo mais recente de 2020, avaliou o comportamento de cepas MRSA diante de alguns antimicrobianos que vem sendo utilizados nas últimas décadas, dentre eles a vancomicina e o trimetoprima-sulfametoxazol, nesse estudo o autor John, apontou que o uso do antimicrobiano ainda é uma alternativa razoável à terapia de MRSA, porém foi avaliado essas característica em relação a infecções de pele e tecido moles, diferentemente desse trabalho que teve como objetivo avaliar a relação desse antimicrobianos com o ambiente pulmonar característico de pacientes com FC (John, 2020).

Porém pesquisas contínuas são necessárias para o acompanhamento da evolução da resistência dessas cepas, pois mudanças no perfil de resistência podem ocorrer devido a fatores como o uso prolongado de antibióticos, mudanças na prática clínica e a introdução de novas terapias.

A análise da concentração bactericida mínima certificou a eficiência dos antimicrobianos testados para cepas em estágios planctônicos, não havendo uma diferença significativa entre os resultados encontrados em CIM e CBM.

No entanto, é importante destacar que a eficácia dos antimicrobianos em condições planctônicas não necessariamente se traduz em eficácia em condições de biofilme, que representam o estado mais comum e desafiador das infecções crônicas em pacientes com FC.

A concentração inibitória mínima em formação de biofilme traz um resultado esperado para esse estudo, sabendo-se que o biofilme é um fator de virulência extremamente eficaz para a sobrevivência bacteriana, conseguimos comprovar com a análise laboratorial essa eficiência. Com apenas 23% (n=6) da nossa amostragem se comportando de maneira resistente em estágio planctônico para o antimicrobiano ciprofloxacina, quando comparado com o resultado de BIC essa resistência subiu para 96,15% (n= 25), havendo um aumento de 73,15% na quantidade de cepas resistentes. Esse resultado sublinha a importância de desenvolver e implementar novos métodos de tratamento que sejam eficazes contra bactérias em formação de biofilme, como o uso de inibidores de biofilme, terapias combinadas ou novos agentes antimicrobianos.

Para o antimicrobiano vancomicina não foi diferente, onde 100% (n= 26) das nossas amostras se mostraram sensíveis em estágio planctônico obtivemos 96,15% (n= 25) no resultado de BIC. Para trimetoprim– sulfametoxazol em estágio planctônico não apresentamos nenhuma amostra resistente em comparação com o resultado de BIC onde tivemos 96,15% (n=25) da nossa amostragem apresentando resistência para esse fármaco. Estudos demonstram que a eficácia deste antimicrobiano é consideravelmente reduzida em biofilmes formados por *S. aureus*, o que pode explicar a alta taxa de resistência observada nesse estudo. A literatura também relata que o SUT, que é geralmente eficaz contra cepas planctônicas, tende a perder sua eficácia contra bactérias em biofilme devido à incapacidade de penetrar e atingir os biofilmes. (Costerton, 1999)

Um estudo realizado em 2022, onde foi verificado o papel do biofilme nas infecções bacterianas e na resistência aos antimicrobianos, demonstrou que bactérias como *P. aeruginosa* e *S. aureus*, principalmente MRSA, são ótimos produtores de biofilme e apresentam resistência a múltiplos fármacos. O biofilme causa resistência a antibióticos por meio de processos como genes resistentes codificados cromossomicamente. A formação dessa estrutura pode ser relacionada ao desenvolvimento de superbactérias, sendo fundamental o monitoramento regular da resistência antimicrobiana, especialmente em pacientes

hospitalizados, a fim de controlar infecções relacionadas ao biofilme e de prevenir a resistência antimicrobiana (Pokharel, 2022).

Outro estudo, também de 2022, avaliou a estimativa da concentração mínima de três antimicrobianos diferentes para erradicação do biofilme formado em implantes por cepas de MSSA e MRSA, em infecção femoral em roedores, esses implantes foram tratados com diferentes concentrações de antimicrobianos e com combinação entre antimicrobianos para determinar a concentração mínima que mataria 100% e 60% das bactérias. O resultado apresentado demonstrou que a gentamicina foi mais eficaz em matar as bactérias, mas a quantidade necessária do fármaco aumentou conforme o biofilme amadurecia. E demonstrou que a combinação de rifampicina junto com gentamicina ajudou a reduzir a quantidade necessária de antibiótico para eliminar as bactérias, principalmente nos primeiros dias de infecção. Esse estudo demonstra a importância de um tratamento precoce porque, à medida que o biofilme amadurece, fica mais difícil eliminar as bactérias, exigindo doses mais altas de antimicrobianos (Okoe, 2022).

Esses achados indicam que a formação de biofilme por cepas de MRSA em pacientes com FC representa um desafio terapêutico significativo, e estratégias para prevenir ou interromper a formação de biofilmes são essenciais para melhorar os resultados clínicos. Foi observado que a falta de dados na literatura para corroborar com a análise feita nesse estudo em relação a BIC para CIP, VAN e SUT, sendo necessário novos estudos para validar os dados expostos.

Entretanto, esses resultados vêm afirmar a crescente preocupação com a multirresistências de cepas MRSA em diferentes estágios e condições, para diferentes antimicrobianos. Aumentando a necessidade de pesquisas contínuas para o acompanhamento da evolução do perfil de resistência dessas cepas e novas estratégias e condutas para o manejo dos antimicrobianos.

Como dito anteriormente, 16 amostras presentes nesse estudo fizeram parte do trabalho realizado pelo nosso grupo (Rodrigues, 2019) sendo essas tipificadas quanto ao seu *spa type*. Observamos que 62,5% (n=10) das amostras tipificadas apresentaram o *spa type* t002, 12, 5% (n=2) apresentaram *spa type* t1605 e 6,25 % (n=1) apresentaram o *spa type* t021, t18066, t539 e t318.

Em 2021, Gilpin publicou um artigo onde ele analisou as características fenotípicas de isolados MRSA na FC, associando essas cepas a piores resultados em comparação à infecção precoce ou intermitente. Esta associação estar relacionada a alterações bacterianas adaptativas, como por exemplo formação de biofilme (Gilpin, 2021).

Nesse estudo foram analisadas 26 cepas de MRSA, caracterizadas quanto a tipagem da proteína A, teste de suscetibilidade antimicrobiana, formação de biofilme e hemólise sob condições de cultura aeróbica e anaeróbica. Os resultados obtidos demonstraram que 51% (n=25) apresentaram progressão da doença/sintomas após o início do MRSA com uso significativamente maior de antibióticos, o que corrobora com os dados apresentados por Oken no estudo publicado em 2022 (Gilpin, 2021; Oken, 2022).

Sendo, 38% (n=19) dos isolados pertenciam ao *spa type* t002, curiosamente, 16,3% (n=8) dos pacientes tiveram uma mudança no *spa type* ao longo do tempo. O que valida a importância do conhecimento da origem genética de cada cepa MRSA, para um tratamento mais eficaz em cada paciente.

Esse estudo também aponta que a CIM foi significativamente menor em condições anaeróbicas x aeróbicas para vancomicina e rifampicina, mas para trimetoprima-sulfametoxazol a CIM foi maior, podendo ser explicada pelas condições de crescimento anaeróbico, que ocorrem nas vias aéreas dos pacientes com FC, o que pode afetar a expressão de fatores de virulência e a suscetibilidade a antimicrobianos do MRSA, mais do que a duração da infecção, essas infecções persistentes por MRSA são frequentemente associadas ao declínio clínico do paciente (Gilpin, 2021).

Contudo, a falta de dados sobre a tipificação molecular da proteína A de MRSA colonizando pacientes com FC, dificulta a análise fenotípica de cada *spa type*. É sabido que a população de *S. aureus* está em constante evolução, sendo a caracterização dessas cepas essencial para o entendimento aprofundado sobre a distribuição das linhagens já conhecidas e possivelmente, a descoberta de novas linhagens, fornecendo assim, informações críticas sobre a epidemiologia dessas cepas, que demonstram uma alta capacidade de persistir e sobreviver em longo prazo nos pulmões característicos de pacientes com FC.

Compreender a distribuição mundial das cepas de MRSA na colonização crônica na FC, permite o desenvolvimento de estratégias eficazes, capazes de orientar o melhor tratamento e manter uma boa qualidade de vida para os indivíduos portadores do gene CFTR.

A compreensão da dinâmica do MRSA na FC, além de orientar as medidas gerais de controle de infecção e da disseminação, contribui para o aumento de sobrevivência desses pacientes, portanto, a análise contínua dessas cepas é crucial para a adaptação de protocolos clínicos e para a implementação de intervenções que minimizem os impactos dessas infecções no longo prazo.

CONCLUSÃO

Ao fim desse estudo, concluímos que:

- a) Na comparação entre CIM e BIC observamos que a susceptibilidade do antimicrobianos penetrar no biofilme comparado ao crescimento celular planctônico é menor, demonstrando assim uma resistência bacteriana à ação do antimicrobiano em formação de biofilme;
- b) Em estágio planctônico detectamos uma sensibilidade de mais de 88% aos três antimicrobianos testados o que significa que doses menores de antimicrobianos são suficientes para inibir o crescimento de MRSA em estágio planctônico;
- c) A comparação entre a inibição do patógeno com a sua morte diferiu em dois dos antimicrobianos testados;

Para o antimicrobiano Ciprofloxacino observamos uma diferença de 11,38% para a sensibilidade do patógeno e 15,39% para a sua resistência diante do antimicrobiano testado;

Para o antimicrobiano Trimetoprim-sulfametoxazol houve uma diferença de 15,38% para a sua sensibilidade e para o estágio intermediário.

Já para o antimicrobiano Vancomicina não observamos diferenças significativa.

- d) Já em condições de formação de biofilme o cenário se inverte, tendo como parâmetro os mesmos pontos de corte que foram utilizados para CIM, observamos uma resistência de mais de 96% dessas amostras para os três antimicrobianos testados, entendendo-se com isso, que a formação do biofilme é um fator limitante para a inibição de MRSA;
- e) Conhecer a origem e o perfil genético de cada cepa auxilia no tratamento do paciente;
- f) O biofilme se apresenta como um fator de virulência bastante eficaz para a sobrevivência bacteriana;
- g) A necessidade de pesquisas contínuas para entender e acompanhar a evolução cada cepa se faz necessária para auxiliar no monitoramento e controle de cepas multirresistentes.

REFERÊNCIAS

- ABDULAH, N. S.; AL-HEJJAJ, M. Y. The relative of Spa gene types, prevalence and antibiotic resistance in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Archives of Razi Institute*, v. 77, n. 6, p. 2423-2430, 2022. DOI: 10.22092/ARI.2022.358867.2320.
- AKTAS, G. Efficacy of vancomycin in combination with various antimicrobial agents against clinical methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains. *Pakistan Journal of Medical Sciences*, v. 37, n. 1, p. 151-156, 2021. DOI: 10.12669/pjms.37.1.2887.
- ALLEN, L. et al. Future therapies for cystic fibrosis. *Nature Communications*, v. 14, n. 1, p. 693, 8 fev. 2023. DOI: 10.1038/s41467-023-36244-2. PMID: 36755044; PMCID: PMC9907205.
- ANGYAL, D. et al. Bicarbonate transport in cystic fibrosis and pancreatitis. *Cells*, v. 11, n. 1, p. 54, 24 dez. 2021. DOI: 10.3390/cells11010054. PMID: 35011616; PMCID: PMC8750324.
- ATHANAZIO, R. A. et al. Brazilian guidelines for the pharmacological treatment of the pulmonary symptoms of cystic fibrosis. *Jornal Brasileiro de Pneumologia*, v. 49, n. 2, p. e20230040, 15 maio 2023. DOI: 10.36416/1806-3756/e20230040. PMID: 37194817; PMCID: PMC10171269.
- CHEUNG, G. Y. C.; BAE, J. S.; OTTO, M. Pathogenicity and virulence of *Staphylococcus aureus*. *Virulence*, v. 12, n. 1, p. 547-569, dez. 2021. DOI: 10.1080/21505594.2021.1878688. PMID: 33522395; PMCID: PMC7872022.
- CLATWORTHY, A.; PIERSON, E.; HUNG, D. Visando a virulência: um novo paradigma para terapia antimicrobiana. *Nature Chemical Biology*, v. 3, p. 541-548, 2007. DOI: 10.1038/nchembio.2007.24.
- COCORULLO, M.; CHIARELLI, L. R.; STELITANO, G. Improving protection to prevent bacterial infections: preliminary applications of reverse vaccinology against the main cystic fibrosis pathogens. *Vaccines (Basel)*, v. 11, n. 7, p. 1221, 9 jul. 2023. DOI: 10.3390/vaccines11071221. PMID: 37515037; PMCID: PMC10384294.
- COSTERTON, J. W.; STEWART, P. S.; GREENBERG, E. P. Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections. *Science*, v. 284, n. 5418, p. 1318-1322, 1999. DOI: 10.1126/science.284.5418.1318.
- ENSINCK, M. M.; CARLON, M. S. One size does not fit all: the past, present and future of cystic fibrosis causal therapies. *Cells*, v. 11, n. 12, p. 1868, 8 jun. 2022. DOI: 10.3390/cells11121868. PMID: 35740997; PMCID: PMC9220995.
- ESPOSITO, S. et al. Antimicrobial treatment of *Staphylococcus aureus* in patients with cystic fibrosis. *Frontiers in Pharmacology*, v. 10, p. 849, 7 ago. 2019. DOI: 10.3389/fphar.2019.00849. PMID: 31447669; PMCID: PMC6692479.
- FOSTER, C. E. et al. Adhesin genes and biofilm formation among pediatric *Staphylococcus aureus* isolates from implant-associated infections. *PLoS One*, v. 15, n. 6, p. e0235115, 22 jun. 2020. DOI: 10.1371/journal.pone.0235115. PMID: 32569268; PMCID: PMC7307771.

- GAVILLET, H. et al. Bacterial culture underestimates lung pathogen detection and infection status in cystic fibrosis. *Microbiology Spectrum*, v. 10, n. 5, p. e0041922, 26 out. 2022. DOI: 10.1128/spectrum.00419-22. Epub 16 ago. 2022. PMID: 35972283; PMCID: PMC9602735.
- GUO, H. et al. Biofilm and small colony variants—an update on *Staphylococcus aureus* strategies toward drug resistance. *International Journal of Molecular Sciences*, v. 23, n. 3, p. 1241, 22 jan. 2022. DOI: 10.3390/ijms23031241. PMID: 35163165; PMCID: PMC8835882.
- HALLOUCH, O. et al. Cystic fibrosis in the 21st century: what every radiologist should know. *Clinical Imaging*, v. 84, p. 118-129, abr. 2022. DOI: 10.1016/j.clinimag.2022.02.004. Epub 12 fev. 2022. PMID: 35183916.
- HE, X. et al. Global downregulation of penicillin resistance and biofilm formation by MRSA is associated with the interaction between kaempferol rhamnoses and quercetin. *Microbiology Spectrum*, v. 10, n. 6, p. e0278222, 21 dez. 2022. DOI: 10.1128/spectrum.02782-22. Epub 10 nov. 2022. PMID: 36354319; PMCID: PMC9769653.
- HUMPHRIES, R. et al. Overview of changes to the Clinical and Laboratory Standards Institute performance standards for antimicrobial susceptibility testing, M100, 31st edition. *Journal of Clinical Microbiology*, v. 59, n. 12, p. e0021321, 18 nov. 2021. DOI: 10.1128/JCM.00213-21. Epub 22 set. 2021. PMID: 34550809; PMCID: PMC8601225.
- IDREES, M. M. et al. Prevalence of mecA- and mecC-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in clinical specimens, Punjab, Pakistan. *Biomedicines*, v. 11, n. 3, p. 878, 13 mar. 2023. DOI: 10.3390/biomedicines11030878. PMID: 36979
- JALALIFAR, S. et al. The emerging role of probiotics and their derivatives against biofilm-producing MRSA: a scoping review. *Biomedical Research International*, v. 2022, p. 4959487, 27 dez. 2022. DOI: 10.1155/2022/4959487. PMID: 36605101; PMCID: PMC9810406.
- JOHN J Jr. The treatment of resistant staphylococcal infections. *F1000Res*, 2020 Feb 26;9:F1000 Faculty Rev-150. doi: 10.12688/f1000research.17718.1. PMID: 32148777; PMCID: PMC7047908.
- KAHL, B. C.; BECKER, K.; LÖFFLER, B. Clinical significance and pathogenesis of staphylococcal small colony variants in persistent infections. *Clinical Microbiology Reviews*, v. 29, n. 2, p. 401-427, abr. 2016. DOI: 10.1128/CMR.00069-15. PMID: 26960941; PMCID: PMC4786882.
- LAKHUNDI, S.; ZHANG, K. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: molecular characterization, evolution, and epidemiology. *Clinical Microbiology Reviews*, v. 31, n. 4, p. e00020-18, 12 set. 2018. DOI: 10.1128/CMR.00020-18. PMID: 30209034; PMCID: PMC6148192.
- LIU, V. X. et al. The timing of early antibiotics and hospital mortality in sepsis. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, v. 196, n. 7, p. 856-863, 1 out. 2017. DOI: 10.1164/rccm.201609-1848OC. PMID: 28345952; PMCID: PMC5649973.

MCGUINNESS, W. A.; MALACHOWA, N.; DELEO, F. R. Vancomycin resistance in *Staphylococcus aureus*. *Yale Journal of Biology and Medicine*, v. 90, n. 2, p. 269-281, 23 jun. 2017. PMID: 28656013; PMCID: PMC5482303.

MORAN, G. J. et al. Methicillin-resistant *S. aureus* infections among patients in the emergency department. *New England Journal of Medicine*, v. 355, n. 7, p. 666-674, 17 ago. 2006. DOI: 10.1056/NEJMoa055356. PMID: 16914702.

NOVICK, R. P. Pathogenicity islands and their role in staphylococcal biology. *Microbiology Spectrum*, v. 7, n. 3, 2019. DOI: 10.1128/microbiolspec.GPP3-0062-2019. PMID: 31172913.

NUMANOVIĆ, F. et al. Caracterização e representação clonal de cepas de MRSA no Cantão de Tuzla, Bósnia e Herzegovina, de 2009 a 2017. *Medicinski Glasnik*, v. 18, n. 1, p. 38-46, 2020. DOI: 10.17392/1265-21.

O'HARA, F. P. et al. spa typing and multilocus sequence typing show comparable performance in a macroepidemiologic study of *Staphylococcus aureus* in the United States. *Microbial Drug Resistance*, v. 22, n. 1, p. 88-96, jan. 2016. DOI: 10.1089/mdr.2014.0238. Epub 15 dez. 2015. PMID: 26669861; PMCID: PMC4722571.

OKAE, Y. et al. Estimation of Minimum Biofilm Eradication Concentration (MBEC) on In Vivo Biofilm on Orthopedic Implants in a Rodent Femoral Infection Model. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, v. 12, p. 896978, 2022. DOI: 10.3389/fcimb.2022.896978. PMID: 35846761; PMCID: PMC9285014.

OLIVEIRA, A.; CUNHA, M. de L. R. S. Comparison of methods for the detection of biofilm production in coagulase-negative staphylococci. *BMC Research Notes*, v. 3, n. 1, p. 260, 2010. DOI: 10.1186/1756-0500-3-260.

PICKENS, C. I.; WUNDERINK, R. G. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* hospital-acquired pneumonia/ventilator-associated pneumonia. *Seminars in Respiratory and Critical Care Medicine*, v. 43, n. 2, p. 304-309, abr. 2022. DOI: 10.1055/s-0041-1740583. Epub 15 fev. 2022. PMID: 35170002; PMCID: PMC10623688.

POKHAREL, K.; DAWADI, B. R.; SHRESTHA, L. B. Role of Biofilm in Bacterial Infection and Antimicrobial Resistance. *JNMA Journal of Nepal Medical Association*, v. 60, n. 253, p. 836-840, 2022. DOI: 10.31729/jnma.7580. PMID: 36705135; PMCID: PMC9794942.

RATHER, M. A.; GUPTA, K.; MANDAL, M. Microbial biofilm: formation, architecture, antibiotic resistance, and control strategies. *Brazilian Journal of Microbiology*, v. 52, n. 4, p. 1701-1718, dez. 2021. DOI: 10.1007/s42770-021-00624-x. Epub 23 set. 2021. PMID: 34558029; PMCID: PMC8578483.

RAUBER FRAMZ, A.; MEZZOMO DEBIASI, M. Fibrose cística e os obstáculos para a qualidade de vida. *Seminário de Iniciação Científica e Seminário Integrado de Ensino, Pesquisa e Extensão (SIEPE)*, [S. l.], p. e31470, 2022. Disponível em: <https://periodicos.unoesc.edu.br/siepe/article/view/31470>. Acesso em: 16 jul. 2024.

RIBEIRO, M. N. A. et al. Fibrose cística: história e principais meios de diagnóstico. *Pesquisa, Sociedade e Desenvolvimento*, [S. l.], v. 3, p. e11710313075, 2021. DOI:

10.33448/rsd-v10i3.13075. Disponível em:

<https://rsdjournal.org/index.php/rsd/article/view/13075>. Acesso em: 3 ago. 2024.

RODRIGUES, D. C. da S. Tipificação molecular de *Staphylococcus aureus* resistente à meticilina isolados de infecção pulmonar crônica em pacientes com fibrose cística.

Dissertação de mestrado, Universidade do Estado do Rio de Janeiro (UERJ), 2019.

ROSSATO AM, Primon-Barros M, Dias CAG, d'Azevedo PA. Vancomycin MIC and agr dysfunction in invasive MRSA infections in southern Brazil. *Brazilian Journal of Microbiology*, v. 51, n. 4, p. 1819-1823, dez. 2020. DOI: 10.1007/s42770-020-00384-0. Epub 2020 Oct 19. PMID: 33074551; PMCID: PMC7688728.

RUHAL, R.; KATARIA, R. Biofilm patterns in gram-positive and gram-negative bacteria.

Microbiological Research, v. 251, p. 126829, out. 2021. DOI: 10.1016/j.micres.2021.126829.

Epub 23 jul. 2021. PMID: 34332222.

SAMSUDIN N, Chua WC, Hasan H, Hassan SA, Deris ZZ. Underdiagnosis of Borderline oxacillin-resistant *Staphylococcus aureus* (BORSA) - Case series. *Malaysian Journal of Pathology*, v. 46, n. 1, p. 95-102, abr. 2024. PMID: 38682849.

SANTO, A. H.; SILVA-FILHO, L. V. R. F. da. Cystic fibrosis-related mortality trends in Brazil for the 1999-2017 period: a multiple-cause-of-death study. *Jornal Brasileiro de Pneumologia*, v. 47, n. 2, p. e20200166, 2021. DOI: 10.36416/1806-3756/e20200166.

Disponível em: <https://doi.org/10.36416/1806-3756/e20200166>.

SCOTET, V.; L'HOSTIS, C.; FÉREC, C. The changing epidemiology of cystic fibrosis:

incidence, survival and impact of the CFTR gene discovery. *Genes (Basel)*, v. 11, n. 6, p. 589,

26 maio 2020. DOI: 10.3390/genes11060589. PMID: 32466381; PMCID: PMC7348877.

SHOPSIN, B.; KREISWIRTH, B. N. Molecular epidemiology of methicillin-resistant

Staphylococcus aureus. *Emerging Infectious Diseases*, v. 7, n. 2, p. 323-326, mar.-abr. 2001.

DOI: 10.3201/eid0702.010236. PMID: 11294733; PMCID: PMC2631714.

SIDDIQUI, A. H.; KOIRALA, J. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. In:

STATPEARLS [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2024 jan. Disponível

em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29489200>. Acesso em: 2 abr. 2023.

SMITH, S. et al. Standard versus biofilm antimicrobial susceptibility testing to guide

antibiotic therapy in cystic fibrosis. *Cochrane Database of Systematic Reviews*, v. 6, n. 6, p.

CD009528, 10 jun. 2020. DOI: 10.1002/14651858.CD009528.pub5. PMID: 32520436;

PMCID: PMC7388933.

TONG, S. Y. C. et al. *Staphylococcus aureus* infections: epidemiology, pathophysiology,

clinical manifestations, and management. *Clinical Microbiology Reviews*, v. 28, n. 3, p. 603-

661, jul. 2015. DOI: 10.1128/CMR.00134-14. PMID: 26016486; PMCID: PMC4451395.

TRAN KQ, Nguyen TTD, Pham VH, Pham QM, Tran HD. Pathogenic Role and Antibiotic Resistance of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) Strains Causing Severe Community-Acquired Pneumonia in Vietnamese Children. *Advances in Respiratory*

Medicine, v. 91, n. 2, p. 135-145, 2023. DOI: 10.3390/arm91020012. PMID: 37102779; PMCID: PMC10135923.

TURNER, N. A. et al. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: an overview of basic and clinical research. *Nature Reviews Microbiology*, v. 17, n. 4, p. 203-218, abr. 2019. DOI: 10.1038/s41579-018-0147-4. PMID: 30737488; PMCID: PMC6939889.

WILCOX, M. et al. Reporting elevated vancomycin minimum inhibitory concentration in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: consensus by an International Working Group. *Future Microbiology*, v. 14, n. 4, p. 345-352, mar. 2019. DOI: 10.2217/fmb-2018-0346. Epub 6 fev. 2019. PMID: 30724113; PMCID: PMC6479275.