



Universidade Nova de Lisboa
Instituto de Higiene e Medicina Tropical

**Contribuição do efluxo para a resistência a
compostos antimicrobianos em
*Staphylococcus epidermidis***

Mafalda Sofia Reisinho de Oliveira Rosa

**DISSERTAÇÃO PARA A OBTENÇÃO DO GRAU DE MESTRE EM CIÊNCIAS BIOMÉDICAS,
ESPECIALIDADE EM BIOLOGIA MOLECULAR EM SAÚDE TROPICAL E INTERNACIONAL**

ABRIL DE 2017



Universidade Nova de Lisboa
Instituto de Higiene e Medicina Tropical

**Contribuição do efluxo para a resistência a compostos
antimicrobianos em *Staphylococcus epidermidis***

Autora: Mafalda Sofia Reisinho de Oliveira Rosa

Orientadora: Professora Doutora Isabel Couto

Coorientadora: Doutora Sofia Santos Costa

Dissertação apresentada para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção do grau de
Mestre em Ciências Biomédicas, Especialidade em Biologia Molecular em Saúde Tropical e Internacional

Agradecimentos

À Professora Doutora Isabel Couto, pela sua orientação, interesse e conhecimentos transmitidos ao longo de todo o trabalho. Pela disponibilidade e ajuda que demonstrou ao longo desta Dissertação. Por me ter aceite como sua aluna e por ter possibilitado a minha chegada até esta fase.

À Doutora Sofia Santos Costa, por todos os conhecimentos e conselhos transmitidos ao longo deste ano. Por todo o apoio e disponibilidade demonstrado ao longo de todo o trabalho. Por toda a sua amizade e entusiasmo. Muito obrigada!

À Professora Doutora Constança Pomba, da Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade de Lisboa, por ter disponibilizado as colecções de *Staphylococcus epidermidis* estudadas neste trabalho.

Ao Professor Doutor Miguel Viveiros por todo o apoio e pela transmissão de conhecimentos.

Ao Professor Doutor Celso Cunha por todo o apoio prestado, conhecimentos e conselhos prestados ao longo dos dois anos de Mestrado.

Aos meus colegas do Grupo de Micobactérias de Microbiologia Médica do IHMT, Investigadora Ana Armada, Doutora Diana Machado e Mestre Jorge Ramos pelo apoio e companheirismo demonstrados.

Aos meus colegas do Mestrado de Ciências Biomédicas, que me acompanharam nesta fase, por todo o apoio e companheirismo.

Às colegas do grupo de Leptospiras, Mestre Teresa Carreira e Doutora Mónica Nunes, por todas as conversas e horas de almoço bem passadas.

Aos meus amigos por me apoiarem e por todas as palavras de motivação e amizade demonstrados ao longo deste ano. Por serem pessoas maravilhosas que têm sempre uma palavra amiga para me darem.

Aos meus avós que me ajudaram bastante nesta fase. Por todo o vosso apoio, força, dedicação e amor.

Aos meus sogros, que sempre me apoiaram nesta fase. Por terem estado presentes em todos os momentos, pela força, carinho e amor que me transmitiram e por me ajudarem a concluir mais esta etapa.

Aos meus pais, por todo o amor, carinho e apoio que sempre me deram ao longo da minha vida. Por tudo o que sempre fizeram para que eu me tornasse na pessoa que sou hoje. Por ouvirem os meus desabafos e saberem sempre o que eu precisava de ouvir. Por estarem sempre disponíveis para mim, com o colo que só uma Mãe e um Pai sabem dar. Muito obrigada por tudo!

E por fim, ao meu marido André, por todo o amor, carinho e apoio que me deu nesta fase. Por todo o companheirismo e paciência demonstrados. Por estar sempre presente, independentemente da distância que nos separava. Muito obrigada meu querido!

A todos, o meu sincero Muito Obrigada!

Resumo

A bactéria *Staphylococcus epidermidis* faz parte da flora comensal de humanos e animais, sendo considerada um agente patogénico oportunista. Os compostos antimicrobianos, como antibióticos ou biocidas, são amplamente utilizados no tratamento e prevenção de infecções causadas por esta e outras bactérias na prática clínica, humana ou veterinária. No entanto, o aumento constante da resistência a estes compostos é actualmente um grave problema de saúde pública. Um dos mecanismos de resistência a compostos antimicrobianos é a sua extrusão por bombas de efluxo, algumas das quais codificadas em plasmídeos, como é o caso dos sistemas QacA/B e Smr. Porém, pouco se sabe acerca da sua prevalência e contribuição para a resistência aos antimicrobianos em *S. epidermidis*. Neste trabalho, pretendeu-se avaliar a frequência dos determinantes *qacA/B* e *smr* em *S. epidermidis* isolados de animais ou humanos em contacto próximo com estes, correlacionando a presença de QacA/B e Smr com a capacidade de efluxo e o perfil de susceptibilidade a antibióticos.

Para tal, foram estudadas duas colecções de *S. epidermidis*, correspondendo a 17 isolados provenientes de locais de infecção em animais de companhia (cães e gatos) e 112 isolados de colonização nasal em profissionais e estudantes de Medicina Veterinária. A identificação dos isolados foi confirmada através de ITS-PCR e o seu perfil de susceptibilidade a antibióticos determinado através do método de difusão em disco e pesquisa por PCR do gene *mecA*. Os determinantes plasmídicos *qacA/B* e *smr* foram também pesquisados por PCR. A actividade de efluxo foi detectada pela determinação da concentração mínima inibitória (CMI) de brometo de etídeo (EtBr) e pelo método de “Cartwheel” e caracterizada por fluorometria em tempo-real para um conjunto de isolados representativos dos genótipos encontrados.

Os isolados de ambas as colecções apresentaram uma elevada frequência de resistência a diversas classes de antibióticos, nomeadamente, β -lactâmicos, macrólidos, ácido fusídico e fluoroquinolonas, assim como tetraciclina para os isolados de infecção em animais, e aminoglicosídeos nos isolados de colonização em humanos. A abordagem metodológica aplicada permitiu detectar uma alta frequência de isolados com actividade de efluxo aumentada, correlacionável com a presença dos determinantes plasmídicos *qacA*, *qacB* e *smr*, sendo o primeiro o mais frequente. Os isolados com *qacA* apresentaram valores de CMI para o EtBr superiores aos dos isolados com *smr*, bem como maior actividade de efluxo.

Entre os 129 isolados de *S. epidermidis* estudados, 62 são multirresistentes aos antibióticos. Embora os antibióticos não sejam substratos dos sistemas de efluxo estudados, a elevada frequência de isolados com *qacA/B* ou *smr* nestes isolados indica uma contribuição dos sistemas QacA/B e Smr para este fenótipo, que se sugere ocorra por co-selecção de outros determinantes de resistência plasmídicos ou pela vantagem selectiva que estes sistemas conferem na resposta a agentes antimicrobianos.

As frequências de resistência aos antibióticos e dos sistemas de efluxo plasmídicos QacA/B ou Smr observadas nas duas colecções de *S. epidermidis* estudadas realçam a relevância da componente veterinária no desenvolvimento e disseminação da resistência aos antimicrobianos e a necessidade de realizar mais estudos que incluam esta vertente,

para uma melhor compreensão deste problema e desenho de estratégias eficazes de resposta à sua emergência.

Palavras-chave: *Staphylococcus epidermidis*, antibióticos, resistência, efluxo, genes *qac*

Abstract

Staphylococcus epidermidis is part of the commensal flora of humans and animals, being considered an opportunistic pathogen. Antimicrobial compounds, such as antibiotics or biocides, are widely used for treatment and prevention of the infections caused by this and other bacteria in animal and human clinical practice. However, the increasing resistance to these compounds became a serious problem of public health. One of the resistance mechanisms to antimicrobial compounds is their extrusion by efflux pumps, some of which can be plasmid-encoded, such as the QacA/B and Smr systems. However, not much is known on their prevalence and contribution to antimicrobial resistance in *S. epidermidis*. In this study, we intended to determine the frequency of *qacA/B* and *smr* determinants in *S. epidermidis* isolates recovered from animals and humans in close contact with animals, correlating the presence of QacA/B and Smr with efflux activity and antibiotic susceptibility profile in these isolates.

We studied two collections of *S. epidermidis*, comprising 17 isolates from infection sites in companion animals (dogs and cats) and 112 nasal colonization isolates collected from Veterinary Medicine professionals and students. The identification of isolates was confirmed by ITS-PCR and their antibiotic susceptibility profile determined by disc diffusion and detection of the *mecA* gene by PCR. The plasmid determinants *qacA/B* and *smr* were also screened by PCR. The efflux activity was detected by determining the minimum inhibitory concentration (MIC) of ethidium bromide (EtBr) and by Cartwheel method and characterized by real-time fluorometry on a set of representative isolates, selected according to their genotypes.

Isolates from both collections showed high frequency of resistance to several antibiotics classes, namely β -lactams, macrolides, fusidic acid and fluoroquinolones, as well as tetracyclines for the isolates of infection in animals, and aminoglycosides in colonization isolates in humans. The methodological approach applied allowed to detect a high frequency of isolates with increased efflux activity, which was correlated with the presence of the plasmid determinants *qacA*, *qacB* and *smr*, the first of which the most frequent. The isolates with *qacA* showed higher MICs for EtBr as compared with the ones harboring *smr*, as well as higher efflux activity.

Among the 129 *S. epidermidis* isolates studied, 62 were multiresistant. Although antibiotics are not substrates of the efflux systems studied, the high frequency of isolates with *qacA/B* or *smr* in these isolates suggests that the contribution of the QacA/B and Smr systems to this phenotype, which is proposed to occur either by co-selection of other plasmidic resistance determinants or by the selective advantage conferred by these systems against antimicrobials.

The frequency of antibiotic resistance and plasmid efflux systems QacA/B or Smr observed in the two collections of *S. epidermidis* studied highlighted the relevance of the veterinary component in the development and dissemination of resistance to antimicrobials and the need of additional studies including this component to guarantee a better understanding of this problem and the design of effective response strategies to its emergence.

Keywords: *Staphylococcus epidermidis*, antibiotics, resistance, efflux, *qac* genes

Índice Geral

AGRADECIMENTOS	i
RESUMO.....	iii
ABSTRACT.....	v
ÍNDICE GERAL.....	vi
ÍNDICE DE TABELAS.....	ix
ÍNDICE DE FIGURAS	xi
LISTA DE ABREVIATURAS.....	xii
1 INTRODUÇÃO	1
1.1 <i>Staphylococcus epidermidis</i>: características gerais e importância clínica ...	1
1.2 A crescente problemática da resistência a compostos antimicrobianos.....	2
1.3 Sistemas de efluxo presentes em <i>Staphylococcus</i>.....	7
1.3.1 Características gerais dos sistemas de efluxo.....	7
1.3.2 Sistemas de efluxo codificados em plasmídeos	9
1.3.3 Sistemas de efluxo codificados no cromossoma	12
1.4 Metodologias de estudo da actividade de efluxo.....	13
1.5 Objectivos desta Dissertação	15
2 MATERIAIS E MÉTODOS.....	16
2.1 Materiais	16
2.1.1 Estirpes bacterianas.....	16
2.1.2 Outro material biológico	18

2.1.3	Meios de cultura, enzimas e soluções	18
2.2	Métodos	22
2.2.1	Cultura e armazenamento das estirpes bacterianas	22
2.2.2	Extracção de DNA total	22
2.2.3	Extracção de DNA plasmídico pelo método de lise alcalina modificado	23
2.2.4	Confirmação da identificação dos isolados por ITS-PCR.....	24
2.2.5	Susceptibilidade a antibióticos pelo método de difusão em disco	24
2.2.6	Detecção dos genes <i>qacA/B</i> e <i>smr</i> em plasmídeos.....	25
2.2.7	Detecção da presença do gene <i>mecA</i>	27
2.2.8	Detecção e caracterização da actividade de efluxo	28
3	RESULTADOS	33
3.1	Confirmação da identificação dos isolados por ITS-PCR.....	33
3.2	Caracterização do perfil de susceptibilidade a antibióticos	34
3.2.1	Isolados de <i>S. epidermidis</i> de infecção em animais de companhia.....	34
3.2.2	Isolados de <i>S. epidermidis</i> de colonização em humanos.....	37
3.3	Detecção do gene <i>mecA</i>	44
3.4	Detecção de actividade de efluxo aumentada	44
3.4.1	Caracterização das estirpes controlo	44
3.4.2	Isolados de <i>S. epidermidis</i> de infecção em animais de companhia.....	45
3.4.3	Isolados de <i>S. epidermidis</i> de colonização em humanos.....	47
3.5	Detecção dos genes plasmídicos <i>qacA/B</i> e <i>smr</i>	47
3.5.1	Genes <i>qacA/B</i>	47
3.5.2	Gene <i>smr</i>	48
3.6	Caracterização da actividade de efluxo por fluorometria em tempo-real	52
3.6.1	Estirpe controlo <i>S. epidermidis</i> ATCC12228.....	52
3.6.2	Isolados de <i>S. epidermidis</i> de infecção em animais de companhia.....	54
3.6.3	Isolados de <i>S. epidermidis</i> de colonização em humanos.....	58

4	DISCUSSÃO E CONCLUSÕES	62
4.1	Perfil de resistência a antibióticos dos isolados de <i>S. epidermidis</i>	63
4.2	Actividade de efluxo dos isolados <i>S. epidermidis</i>	69
4.3	Sistemas de efluxo plasmídicos e perfil de resistência a antibióticos.....	72
4.4	Conclusões gerais	75
5	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	77
	ANEXOS.....	89
	A1. Halos de inibição para diferentes antibióticos dos isolados <i>S. epidermidis</i> de infecção em animais	90
	A2. Halos de inibição para diferentes antibióticos dos isolados <i>S. epidermidis</i> de colonização em humanos	93
	A3. Halos de inibição determinados em meio TSA	108

Índice de Tabelas

Tabela 1.	Mecanismos de acção de antibióticos e principais mecanismos de resistência	5
Tabela 2.	Caracterização das famílias de sistemas de efluxo MDR bacterianas.	9
Tabela 3.	Sistemas de efluxo codificados em plasmídeos de <i>S. epidermidis</i> e outros estafilococos	12
Tabela 4.	Sistemas de efluxo codificados no cromossoma de <i>S. epidermidis</i> e outros estafilococos.....	13
Tabela 5.	Caracterização dos isolados de <i>S. epidermidis</i> recolhidos de locais de infecção em cães e gatos.....	16
Tabela 6.	Caracterização dos isolados de <i>S. epidermidis</i> de colonização em profissionais e estudantes de Medicina Veterinária.....	17
Tabela 7.	Sequências nucleotídicas dos “primers” utilizados na amplificação por PCR dos genes em estudo.....	18
Tabela 8.	Composição dos meios de cultura usados neste trabalho.....	19
Tabela 9.	Enzimas utilizadas ao longo deste trabalho.....	19
Tabela 10.	Composição e preparação das soluções “stock” utilizadas neste trabalho.....	20
Tabela 11.	Composição e preparação das soluções de brometo de etídeo e verapamil.....	20
Tabela 12.	Lista de antibióticos utilizados no teste de difusão em disco “Kirby-Bauer” e respectivos valores de interpretação.....	21
Tabela 13.	Programas de PCR utilizados na amplificação de genes de bombas de efluxo e do gene <i>mecA</i>	26
Tabela 14.	Halos de inibição para diferentes antibióticos da estirpe de referência ATCC12228.....	34
Tabela 15.	Perfil de susceptibilidade aos antibióticos dos isolados de <i>S. epidermidis</i> de infecção em animais.....	36
Tabela 16.	Perfil de susceptibilidade aos antibióticos dos isolados de <i>S. epidermidis</i> de colonização em humanos.....	39

Tabela 17.	Detecção de actividade de efluxo aumentada para as estirpes controlo	45
Tabela 18.	Detecção de actividade de efluxo aumentada e presença de diferentes genes para isolados de infecção em animais.....	49
Tabela 19.	Detecção de actividade de efluxo aumentada e presença de diferentes genes para isolados de colonização em humanos.....	50
Tabela 20.	Frequência de resistência dos isolados de <i>S. epidermidis</i> de infecção em animais e de colonização em humanos.....	64
Tabela 21.	Presença dos genes <i>qacA/B</i> e <i>smr</i> e fenótipo MDR dos isolados <i>S. epidermidis</i>	74
Tabela A1.	Halos de inibição para diferentes antibióticos dos isolados <i>S. epidermidis</i> de infecção em animais	90
Tabela A3.	Halos de inibição para diferentes antibióticos dos isolados <i>S. epidermidis</i> de colonização em humanos	93
Tabela A3.	Halos de inibição determinados em meio TSA.....	108

Índice de Figuras

Figura 1.	Representação dos alvos dos antibióticos e os principais mecanismos de resistência.....	4
Figura 2.	Representação das cinco famílias de bombas de efluxo MDR presentes em bactérias.....	8
Figura 3.	Imagens ilustrativas do método de “Cartwheel”.....	29
Figura 4.	Imagem ilustrativa da determinação de CMIs pelo método de microdiluição em placas de 96 poços.....	30
Figura 5.	Análise dos produtos de ITS-PCR por electroforese em gel de agarose.....	33
Figura 6.	Resultados exemplificativos do método de “Cartwheel”.....	46
Figura 7.	Análise dos produtos de PCR dos genes <i>qacA/B</i> por electroforese em gel de agarose.....	47
Figura 8.	Análise dos produtos de digestão dos fragmentos de amplificação <i>qacA/B</i> com <i>AluI</i>	48
Figura 9.	Análise dos produtos de PCR do gene <i>smr</i> por electroforese em gel de agarose.....	49
Figura 10.	Ensaio de acumulação na presença de concentrações crescentes de EtBr para a estirpe ATCC12228.....	53
Figura 11.	Ensaio de efluxo de EtBr para a estirpe ATCC12228.....	53
Figura 12.	Ensaio de acumulação na presença de concentrações crescentes de EtBr de <i>S. epidermidis</i> isolados de infecção em animais	55
Figura 13.	Ensaio de efluxo de <i>S. epidermidis</i> isolados de infecção em animais ..	57
Figura 14.	Ensaio de acumulação na presença de concentrações crescentes de EtBr de <i>S. epidermidis</i> isolados de colonização em humanos.....	59
Figura 15.	Ensaio de efluxo de <i>S. epidermidis</i> isolados de colonização em humanos.....	61
Figura 16.	Frequência de MDR/não-MDR nos isolados <i>S. epidermidis</i> de colonização em humanos.....	68
Figura 17.	Presença dos genes <i>qacA</i> , <i>qacB</i> e <i>smr</i> nos isolados <i>S. epidermidis</i> de colonização em humanos.....	70
Figura 18.	Presença/ausência de bombas de efluxo e perfil MDR ou MRSE/MSSE dos isolados <i>S. epidermidis</i> estudados das duas colecções.....	74

Lista de Abreviaturas

ABC – “ATP-binding cassette”

AMP – Ampicilina

CHL – Cloranfenicol

CIP – Ciprofloxacina

CLI – Clindamicina

CMI – Concentração mínima inibitória

DNA – Ácido desoxirribonucleico, de “deoxyribonucleic acid”

dNTPs – Desoxirribonucleotídeos, de “Deoxynucleotide”

DO – Densidade óptica

ERY – Eritromicina

EtBr – Brometo de etídeo

EtBrCW – Método de “Cartwheel”, de “EtBr-agar Cartwheel”

EUCAST – “European Committee of Antimicrobial Susceptibility Testing”

FFC – Florfenicol

FOX – Cefoxitina

FUS – Ácido fusídico

GEN – Gentamicina

IE – Inibidor de efluxo

ITS – Região intergênica 16S-23S rRNA, de “Internal transcribed spacer”

KAN – Canamicina

LZD – Linezolida

MATE – “Multidrug and Toxic Compound Extrusion”

MDR – Multirresistência, de “multidrug resistance”

MFS – “Major Facilitator Superfamily”

MHA – “Mueller-Hinton agar”

MHB – “Mueller-Hinton broth”

MRSA – *Staphylococcus aureus* resistentes à meticilina, de “methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*”

MRSE – *Staphylococcus epidermidis* resistentes à meticilina, de “methicillin-resistant *Staphylococcus epidermidis*”

MSSE – *Staphylococcus epidermidis* susceptíveis à meticilina, de “methicillin-sensitive *Staphylococcus epidermidis*”

MXF – Moxifloxacina

MUP – Mupirocina

NIT – Nitrofurantoína

NOR – Norfloxacin

OXA – Oxacilina

PBS – Tampão fosfato salino, de “phosphate buffered saline”

PBP – Proteína de ligação à penicilina, de “penicillin-binding protein”

PCR – Reacção de polimerase e cadeia, de “polymerase chain reaction”

PEN – Penicilina

QAC – Compostos de amónio quaternário

QDT - Quinopristina/dalfopristina

RIF – Rifampicina

RNA – Ácido ribonucleico, de “ribonucleic acid”

RND – “Resistance-Nodulation-Cell Division”

SMR – “Small Multidrug Resistance”

SXT – Trimetoprim-sulfametoxazole

TET – Tetraciclina

TGC – Tigeciclina

TMP - Trimetoprim

TOB – Tobramicina

TSA – “Tryptone Soya Agar”

TSB – “Tryptone Soya Broth”

VER – Verapamil

Lista de Unidades

pb – pares de bases, Kb – “Kilo base”

µL – microlitro, mL – mililitro, L – litro

ng – nanograma, µg – micrograma, mg – miligrama

seg – segundos, min – minutos

mm – milímetro

mM – milimolar

pmol - picomol

rpm – rotações por minuto

V – Volt

1 Introdução

1.1 *Staphylococcus epidermidis*: características gerais e importância clínica

A espécie *Staphylococcus epidermidis*, integrada no género *Staphylococcus*, engloba bactérias de forma esférica que formam agrupamentos em cacho, Gram-positivas e não endosporogénicas [6]. Como todos os estafilococos, são catalase-positivas, facultativamente anaeróbias, crescem a temperaturas entre os 18°C e os 40°C e possuem um baixo conteúdo em guanina e citosina [6]. Para além disso, distinguem-se de outros estafilococos por não produzirem coagulase nem oxidase, serem susceptíveis à novobiocina e em meio sólido formarem, tipicamente, colónias de cor branca ou esbranquiçada [8].

S. epidermidis é um dos principais agentes colonizadores da pele e mucosas em humanos e também em animais, tanto de companhia como de produção [8]. Devido à sua natureza comensal, grande parte das infecções causadas por *S. epidermidis* são de origem endógena, razão pela qual tem sido considerado um agente patogénico oportunista [95]. De facto, vários estudos têm demonstrado que grande parte das infecções causadas por este microrganismo tem como origem estirpes que colonizam o indivíduo infectado [8, 95]. Nos últimos anos, *S. epidermidis* tem surgido como um importante agente patogénico nosocomial, uma vez que afecta indivíduos imunocomprometidos portadores de dispositivos médicos, como cateteres intravasculares e do sistema urinário, "pacemakers" e implantes protéticos [46, 140]. Para além disso, na saúde animal, esta bactéria pode provocar infecções como otites, lesões na pele e infecções no tracto urinário ou respiratório em animais de companhia, como cães e gatos, ou animais de produção [8, 116].

Apesar de *S. epidermidis* não apresentar o potencial patogénico de, por exemplo, *Staphylococcus aureus*, ainda assim é capaz de originar diversas infecções graves, como endocardite ou bacteriemia, sendo também um importante agente de infecções associadas a cateteres, material protésico e outros dispositivos médicos. Estas últimas estão muito associadas com a capacidade significativa que estas bactérias apresentam de

produção de biofilmes, que tornam muitas vezes as infecções resilientes ao tratamento com antibióticos. [95]. Nos últimos anos tem-se registado uma redução contínua da susceptibilidade de *S. epidermidis* a vários antibióticos, incluindo β -lactâmicos, macrólidos, lincosamidas e fluoroquinolonas, sendo a resistência a estes antibióticos, por vezes, mais frequente do que em *S. aureus*, um dos principais agentes patogénicos em humanos e também em animais [8, 95].

1.2 A crescente problemática da resistência a compostos antimicrobianos

A resistência a compostos antimicrobianos é um problema que, embora não seja recente, tem vindo a aumentar, tendo hoje em dia uma dimensão preocupante [93, 134]. Dentro das várias perspectivas com que se tem encarado este problema, surge o conceito “One Health”, que correlaciona a saúde humana, a saúde animal e o meio ambiente, reconhecendo a interligação entre estas vertentes e a necessidade de as analisar segundo uma visão global como via para uma resposta adequada e eficaz aos crescentes problemas de saúde, nas suas vertentes humana ou animal [19]. Indo ao encontro deste conceito, vários estudos têm sido publicados tentando estabelecer correlações na transmissão de estirpes resistentes a compostos antimicrobianos entre humanos, animais e meio ambiente.

O número de infecções causadas por *S. epidermidis* em ambiente hospitalar tem aumentado, sendo este microrganismo considerado um dos principais dez agentes patogénicos de infecções nosocomiais na Europa, incluindo em Portugal [42]. Por outro lado, verifica-se também um aumento das infecções por *S. epidermidis* tanto em animais de companhia como em animais de produção [5, 37].

Tendo em conta que *S. epidermidis* é um dos principais colonizadores da pele em humanos, foram realizados vários estudos para avaliação dos perfis de resistência desta bactéria a compostos antimicrobianos, em particular em profissionais de saúde ou estudantes de medicina, tendo sido detectada uma elevada percentagem de *S. epidermidis* colonizadores de pele que eram resistentes à meticilina (MRSE) [22, 88, 119]. No entanto, este tipo de estudos ainda é relativamente escasso.

Por outro lado, nos últimos anos, tem sido dada atenção crescente aos animais de companhia como reservatórios de bactérias resistentes aos antibióticos, uma vez que estes determinantes de resistência podem circular entre animais e humanos [37, 116]. Para além disso, já foi documentado o isolamento de estirpes MRSE em superfícies de trabalho em instituições de saúde humana ou animal [110, 131].

Agentes antimicrobianos – principais mecanismos de acção e de resistência

Tanto na saúde humana, como animal ou mesmo na comunidade, os compostos antimicrobianos como antibióticos e/ou biocidas são vastamente utilizados para o tratamento e prevenção de infecções bacterianas, incluindo as causadas por *S. epidermidis* [20, 105, 116]. Os antibióticos são compostos naturais ou sintéticos que podem ter uma acção bacteriostática (capacidade de inibir o crescimento bacteriano) ou bactericida (capacidade de eliminar as células bacterianas) [38, 67, 71]. De um modo geral, estes compostos podem exercer a sua acção através de interferência na síntese da parede celular, por exemplo os β -lactâmicos; interferência na síntese proteica, caso das tetraciclina, macrólidos e cloranfenicol; ou interferência no processo de replicação do DNA, como por exemplo as fluoroquinolonas [38, 67, 71] (Figura 1).

As bactérias podem ser intrinsecamente resistentes a uma ou mais classes de antibióticos, como *Pseudomonas aeruginosa*, enquanto outras são naturalmente susceptíveis, como grande parte das espécies pertencentes ao género de *Staphylococcus*. No entanto, mesmo bactérias inicialmente susceptíveis podem desenvolver resistência a uma ou mais classes de antibióticos, através de mutações espontâneas em genes alvo, inactivação enzimática do antibiótico, inibição da entrada do antibiótico ou activação de bombas de efluxo [38] (Figura 1). Estes encontram-se geralmente localizados em elementos genéticos móveis, como plasmídeos, sendo adquiridos por processos de transferência genética horizontal, como transformação, conjugação ou transdução [38].

Local de acção

Mecanismo de resistência

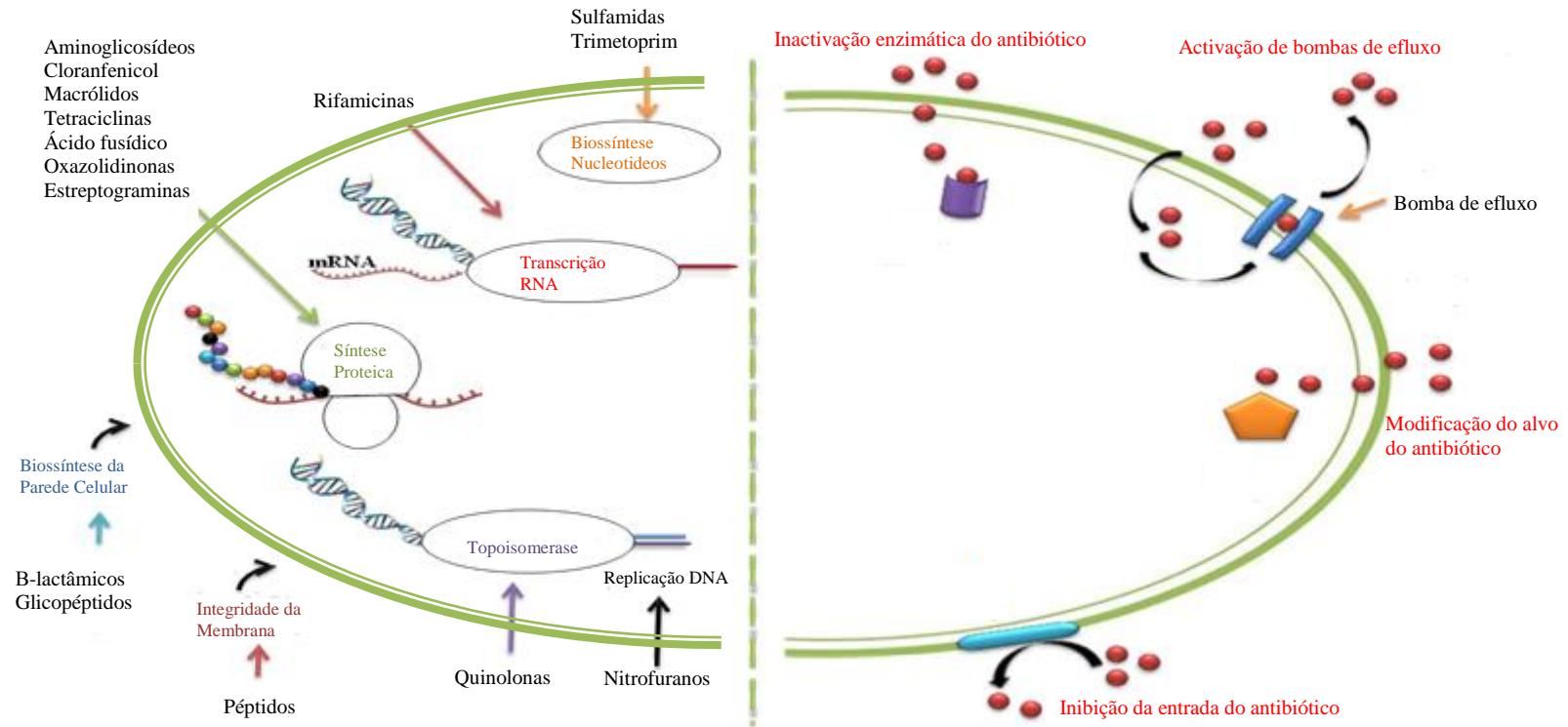


Figura 1. Representação dos alvos dos antibióticos e os principais mecanismos de resistência. Adaptado de Costa, 2013 [26].

Na Tabela 1 encontram-se resumidos os mecanismos de acção das classes de antibióticos estudados nesta Dissertação, assim como os mecanismos de resistência a estes antibióticos já descritos em estafilococos.

Tabela 1. Mecanismos de acção de antibióticos e principais mecanismos de resistência.

Classe de antibióticos	Mecanismo de acção	Principais mecanismos de resistência	Genes envolvidos e sua localização	Referências
β-lactâmicos	Inibição da síntese do peptidoglicano por ligação a PBPs	Inactivação enzimática	<i>blaZ</i> (Tn, P, C)	[38, 91, 101, 132, 133]
		Produção de PBP alternativa, PBP2a	<i>mecA</i> (C) <i>mecC</i> (C)	
Macrólidos	Inibição da síntese proteica por ligação do antibiótico à sub-unidade 50S ribossomal	Metilação do alvo	Genes <i>erm</i> (Tn, P, C)	[91, 132, 133]
		Inactivação enzimática	<i>mph(C)</i> (C, P)	
		Efluxo	<i>msr(A)</i> (C, P)	
Lincosamidas	Inibição da síntese proteica por ligação do antibiótico à sub-unidade 50S ribossomal	Inactivação enzimática	<i>lnu(A)</i> (P) <i>lnu(B)</i> (P,C)	[116, 132, 133]
		Metilação do alvo	Genes <i>erm</i> (Tn,P, C) <i>cfr</i> (P, C)	
		Efluxo	<i>lsa(B)</i> (P) <i>lsa(E)</i> (P, C) Genes <i>vga</i> (Tn, P, C)	
Fluoroquinolonas	Inibição da síntese de DNA através da ligação a Topoisomerases	Modificação do alvo	<i>gyrA/B</i> (C) <i>grlA/B</i> (C)	[91, 116]
		Efluxo	Genes <i>nor</i> (C)	
Aminoglicosídeos	Inibição da síntese proteica pela ligação à subunidade 30S do ribossoma	Inactivação enzimática	<i>aacA-aphD</i> (Tn, P, C) <i>aadD</i> (P, C) <i>aadE</i> (Tn, P) <i>aphA3</i> (Tn, P, C) <i>str</i> (P)	[91, 132, 133]
Estreptograminas	Inibição da síntese proteica por ligação do antibiótico à sub-unidade 50S ribossomal	Metilação do alvo	Genes <i>erm</i> (Tn, P, C) <i>cfr</i> (P, C)	[116, 132, 133]
		Efluxo	<i>msr(A)</i> (C, P) <i>vat(B)</i> (P) <i>vgb(B)</i> (P) Genes <i>vga</i> (Tn,P, C) <i>lsa(E)</i> (P, C)	

PBP: Proteína de ligação à penicilina; Tn: transposição; P: plasmídeo; C: cromossoma.

Tabela 1. Continuação.

Classe de antibióticos	Mecanismo de acção	Principais mecanismos de resistência	Genes envolvidos e sua localização	Referências
Tetraciclinas	Inibição da síntese proteica pela ligação à subunidade 30S do ribossoma	Efluxo Protecção do alvo Modificação do alvo	Genes <i>tet</i> (Tn, P, C)	[91, 116]
Oxazolidinonas	Inibição da síntese proteica por ligação à sub-unidade 50S ribossomal	Mutação no alvo	<i>cfr</i> (P, C)	[116]
Fenicóis	Inibição da síntese proteica por ligação do antibiótico à sub-unidade 50S ribossomal	Inactivação enzimática	Genes <i>cat</i>	[116]
		Efluxo	<i>fexA</i> (Tn, P, C)	
Fusidanos	Inibição da síntese proteica por ligação do antibiótico à sub-unidade 50S ribossomal	Mutações no alvo	<i>fusA</i> (C) <i>fusE</i> (C)	[116, 132, 133]
		Protecção do alvo	<i>fusB</i> (P) <i>fusC</i> (P, C) <i>fusD</i> (P)	
Ácidos pseudomónicos	Inibição da síntese proteica	Produção de um alvo alternativo resistente	<i>ileS2</i> (P)	[116]
Nitrofuranos	Inibição da transcrição, da síntese proteica e da parede celular	n.i.	n.i.	[91, 116]
Rifamicinas	Impedimento do início da transcrição do DNA, bloqueando a síntese proteica	Mutações no alvo	<i>rpoB</i> (C)	[91]
Trimetoprim/Sulfamidas	Inibição da síntese de folatos	Produção de um alvo alternativo resistente	Genes <i>dfp</i> (Tn, P, C)	[116]

n.i: ainda não foi identificado o mecanismo de resistência; PBP: Proteína de ligação à penicilina; Tn: transposão; P: plasmídeo; C: cromossoma.

Por sua vez, os biocidas (antisépticos, desinfetantes e preservantes) são compostos capazes de inibir ou eliminar bactérias, apresentando mecanismo(s) de acção mais inespecífico(s) [105]. Estes compostos são aplicados a concentrações elevadas, tendo um efeito generalizado na célula bacteriana, podendo actuar simultaneamente em vários alvos celulares [105]. Entre os vários efeitos que apresentam, os biocidas podem actuar ao nível da membrana externa e da membrana citoplasmática [79]. Como excepção, o biocida triclosan, quando usado a concentrações mais baixas pode actuar sobre um alvo celular específico, a enzima *FabI*, envolvida na biossíntese de ácidos gordos [104]. Por esta razão, têm sido poucos os mecanismos de resistência descritos para biocidas. No entanto, têm sido reportados casos de susceptibilidade reduzida a biocidas, tal como

triclosan, compostos de amónio quaternários e clorhexidina, em várias espécies de *Staphylococcus* [104, 106], fenótipos geralmente associados à acção de bombas de efluxo [106].

1.3 Sistemas de efluxo presentes em *Staphylococcus*

1.3.1 Características gerais dos sistemas de efluxo

As bombas de efluxo são proteínas membranares que têm como função desintoxicar as células através da extrusão de moléculas nocivas [103, 130]. Entre estas moléculas, contam-se para além das resultantes do próprio metabolismo celular, outros compostos nocivos como antibióticos ou biocidas. Assim, a extrusão destes agentes antimicrobianos pode ser considerada como uma “função accidental” de alguns sistemas de efluxo [107, 130]. As bombas de efluxo podem ser específicas para um antibiótico ou podem extrusar mais que uma classe de antibióticos e/ ou outros compostos antimicrobianos, sendo então designadas por bombas de efluxo MDR (de “multidrug resistance”) [130].

Os sistemas de efluxo MDR são actualmente classificados em cinco famílias, nomeadamente: superfamília MFS (de “Major Facilitator Superfamily”); família SMR (de “Small Multidrug Resistance”); família RND (de “Resistance-Nodulation-cell Division”); família ABC (de “Adenosine triphosphate (ATP)-Binding Cassette); família MATE (de “Multidrug and Toxic Compound Extrusion”) (Figura 2) [103]. Esta classificação baseia-se na fonte de energia usada por estes sistemas e por relações filogenéticas [103]. Relativamente ao critério energético, podem ainda distinguir-se dois grupos de transportadores, os transportadores primários, que utilizam a hidrólise de ATP para a efectuar a extrusão do substrato (família ABC); e os transportadores secundários, que utilizam a força motriz protónica para exportar substratos através de antiporte com um protão, H⁺ (famílias MFS, SMR, RND) e/ou antiporte com um ião Na⁺ (família MATE) [103]. Os sistemas de efluxo pertencentes às famílias MFS, SMR, ABC e MATE estão presentes em bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, enquanto

os transportadores RND se encontram maioritariamente em bactérias Gram-negativas, devido à estrutura membranar bacteriana [15] (Figura 2).

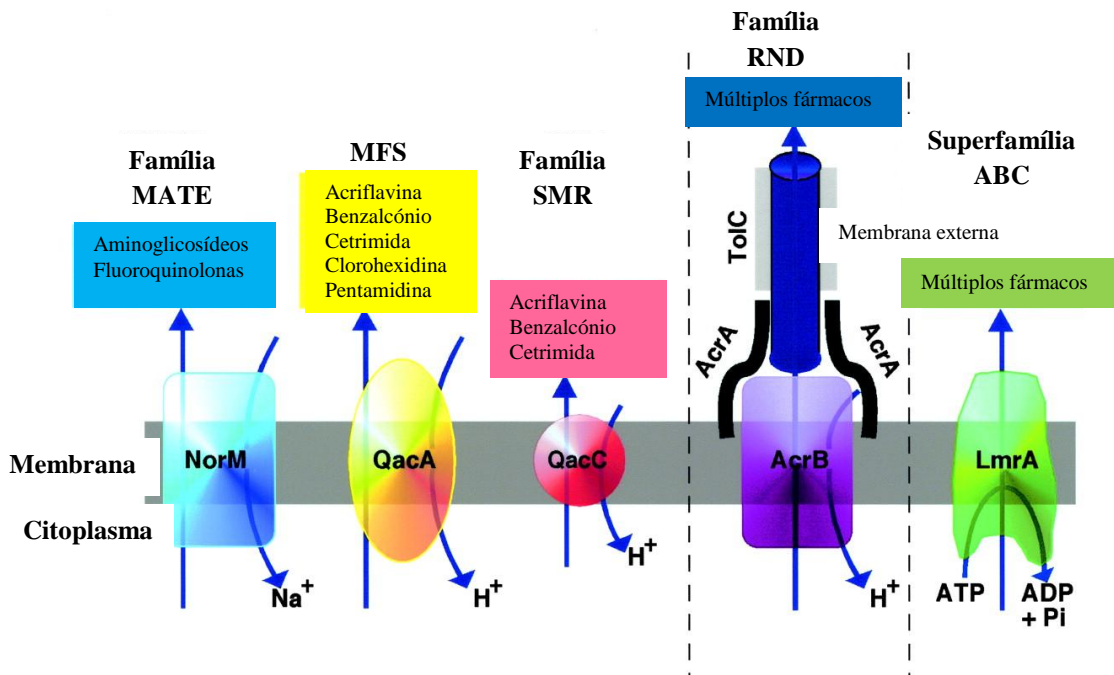


Figura 2. Representação das cinco famílias de bombas de efluxo MDR presentes em bactérias. Adaptado de Pidcock, 2006 [103]. Algumas bombas de efluxo da família MATE utilizam o antiporte de H^+ .

Os sistemas de efluxo podem ser nativos, sendo codificados por genes que se encontram no cromossoma bacteriano, ou podem ser codificados em elementos genéticos móveis, como plasmídeos ou transposões [116, 132].

As principais características das cinco famílias de bombas de efluxo MDR bacterianas encontram-se descritas na Tabela 2.

Tabela 2. Caracterização das famílias de sistemas de efluxo MDR bacterianas.

Família	Fonte de energia	Substratos	Bombas de efluxo relevantes	Referências
MFS	Antiporte de H ⁺	Açúcares, metabolitos, aniões e compostos antimicrobianos	QacA, <i>S. aureus</i> NorA, <i>S. aureus</i> PmrA, <i>Streptococcus pneumoniae</i>	[69, 103]
SMR	Antiporte de H ⁺	Compostos lipofílicos, QACs, antissépticos e detergentes	Smr, <i>S. aureus</i> EmrE, <i>Escherichia coli</i>	[7]
RND	Antiporte de H ⁺	Antibióticos, metais pesados, corantes, detergentes e solventes	AcrAB-TolC, <i>E. coli</i> MexAB-OprM, <i>P. aeruginosa</i>	[69, 130]
MATE	Antiporte de H ⁺ e/ou Na ⁺	Corantes catiónicos e antibióticos	NorM, <i>Vibrio parahaemolyticus</i> YdhE, <i>E. coli</i>	[69, 130]
ABC	Hidrólise de ATP	Antibióticos, açúcares, aminoácidos, polissacarídeos e proteínas	LmrA, <i>Lactococcus lactis</i>	[69, 130]

MFS: “Major Facilitator Superfamily”; H⁺: Hidrogénio; SMR: “Small Multidrug Resistance”; RND: “Resistance-Nodulation-Cell Division”; MATE: “Multidrug and Toxic Extrusion”; Na⁺: Sódio; ABC: “ATP-binding cassette”; QAC: Compostos de amónio quaternário.

1.3.2 Sistemas de efluxo codificados em plasmídeos

São vários os sistemas de efluxo codificados em plasmídeos descritos em estafilococos [28]. Estes incluem bombas de efluxo MDR, tais como os sistemas QacA/B e Smr e bombas de efluxo específicas, tais como os sistemas Tet(K), MrsA e FexA, os quais conferem resistência a tetraciclinas, macrólidos e estreptograminas B e fenicóis, respectivamente [132].

Sistemas de efluxo QacA/B

As bombas de efluxo QacA e QacB, pertencentes à superfamília MFS, são constituídas por 514 aminoácidos e 14 segmentos transmembranares, [16, 86]. Os genes que as codificam, respectivamente, *qacA* e *qacB*, encontram-se localizados em plasmídeos e estão organizados em operação com o gene *qacR*, que codifica para a proteína QacR [16, 86]. Esta é um repressor directo da expressão dos genes *qacA/B*, uma vez que se liga à região promotora destes genes, suprimindo a sua transcrição [16, 51]. As duas bombas de efluxo são muito semelhantes, diferindo entre si em sete nucleótidos [16, 86]. Apesar da semelhança estrutural, as duas bombas variam na sua especificidade de substratos;

enquanto QacA exporta compostos catiónicos, quer monovalentes quer divalentes, incluindo compostos de amónio quaternário (QACs), diamidinas, biguanidinas e corantes, como o brometo de etídeo (EtBr), os substratos do sistema QacB restringem-se aos compostos catiónicos monovalentes [16, 28, 87]. Esta diferença de especificidade deve-se apenas à substituição do aminoácido aspartato na posição 323 de QacA pelo aminoácido alanina em QacB, sugerindo que este resíduo de aspartato terá um papel crucial na resistência a compostos catiónicos divalentes [16, 99].

O primeiro sistema a ser identificado foi QacA, na década de 1980, no plasmídeo pSK1 isolado de uma amostra clínica de *S. aureus* [121]. Apesar de QacB ter sido identificada posteriormente, a sua ocorrência foi detectada no plasmídeo pSK23 de um isolado clínico de *S. aureus*, recolhido na década de 1950 [100]. Até ao momento, os genes *qacA/B* têm sido detectados em diversas espécies de estafilococos de origem clínica humana, animal ou ambiental [12, 49, 56, 77, 82, 94, 126].

Sistema de efluxo Smr

O sistema de efluxo Smr é constituído por 107 aminoácidos e quatro segmentos transmembranares e pertence à família de transportadores SMR [7]. Este sistema foi identificado no final da década de 1980, tendo sido associado a quatro genes plasmídicos, *ebr* [113], *qacC/D* [74] ou *smr* [50]. No entanto, estudos posteriores determinaram que a sequência nucleotídica destes genes era idêntica [7], sendo as denominações *smr* e *qacC* as que são utilizadas actualmente na literatura. Este sistema de efluxo confere um baixo grau de resistência aos seus substratos, os quais englobam compostos como QACs (cetrimida e cloreto de benzalcónio) e corantes (EtBr) [7, 92]. O gene *smr* tem sido descrito quer em plasmídeos conjugativos de grande dimensão, como pSK41, quer em plasmídeos pequenos não conjugativos, como pSK89 [1, 7, 10, 92]. Apesar de este sistema ter sido identificado em *S. aureus*, já foi descrito também em estafilococos não produtores de coagulase, incluindo *S. epidermidis* [7, 72,73], em amostras de origem humana ou animal [12, 49, 77, 82, 126].

Sistemas de efluxo QacG, QacH e QacJ

À semelhança da bomba de efluxo Smr, os sistemas de efluxo QacG, QacH e QacJ são constituídos por 107 aminoácidos e quatro segmentos transmembranares, pertencendo à família de transportadores SMR [7, 28]. De igual modo, partilham a mesma gama de substratos, ou seja, QACs, como cloreto de benzalcónio, e corantes, por exemplo EtBr, conferindo um baixo grau de resistência para os seus substratos [7, 105, 106, 129]. Todos estes sistemas foram, até à data, associados a pequenos plasmídeos não conjugativos.

O sistema de efluxo QacG foi identificado em amostras de *S. aureus* provenientes da indústria alimentar, sendo codificado pelo gene *qacG* e apresentando 69,2% de identidade com a bomba de efluxo Smr [55]. Por outro lado, o sistema de efluxo QacH foi detectado numa estirpe de *Staphylococcus saprophyticus*, também proveniente da indústria alimentar, sendo codificado pelo gene *qacH* e apresentando 76% e 70% de identidade para os genes *smr* e *qacG*, respectivamente [54]. Por fim, o sistema de efluxo QacJ foi identificado em várias amostras de *S. aureus*, *Staphylococcus simulans* e *Staphylococcus intermedius*, provenientes de cavalos, sendo codificado pelo gene *qacJ* e apresentando 72,5%, 82,6% e 73,4% de identidade com os genes *smr*, *qacG* e *qacH*, respectivamente [11]. Nos últimos anos, tem sido demonstrada a presença dos genes que codificam para estas bombas de efluxo em isolados clínicos e/ou de colonização em humanos, em animais e também em amostras ambientais, inclusive em isolados contendo também os genes *qacA/B* e/ou *smr* [49, 36, 137].

A informação sobre os sistemas de efluxo codificados em plasmídeos encontra-se resumida na Tabela 3.

Tabela 3. Sistemas de efluxo codificados em plasmídeos de *S. epidermidis* e outros estafilococos.

Sistema de efluxo	Família	Regulador	Substratos	Espécies em que foram detectados	Referências
QacA	MFS	QacR	Compostos catiónicos monovalentes e divalentes (QACs, diamidinas, biguanidinas e corantes)	<i>S. epidermidis</i> <i>S. aureus</i> <i>S. pseudintermedius</i> <i>S. warneri</i> <i>S. haemolyticus</i>	[4, 8, 12, 16, 34, 35, 87]
QacB	MFS	QacR	Compostos catiónicos monovalentes (QACs, diamidinas, biguanidinas e corantes)	<i>S. epidermidis</i> <i>S. aureus</i> <i>S. pseudintermedius</i> <i>S. warneri</i> <i>S. haemolyticus</i> <i>S. cohnii</i>	[8, 12, 16, 34, 35, 87]
Smr	SMR	---	QACs, EtBr	<i>S. epidermidis</i> <i>S. aureus</i> <i>S. pasteurii</i> <i>S. warneri</i> <i>S. haemolyticus</i> <i>S. caprae</i> <i>S. hominis</i> <i>S. saprophyticus</i>	[1, 7, 10, 12-14, 92]
QacG	SMR	---	QACs, EtBr	<i>S. saprophyticus</i> <i>S. aureus</i> <i>S. warneri</i> <i>S. cohnii</i>	[7, 12, 105]
QacH	SMR	---	QACs, EtBr	<i>S. saprophyticus</i> <i>S. aureus</i>	[7, 105]
QacJ	SMR	---	QACs, EtBr	<i>S. epidermidis</i> <i>S. simulans</i> <i>S. intermedius</i> <i>S. aureus</i> <i>S. hominis</i> <i>S. delphini</i>	[7, 12, 36, 105, 137]

(---): Não existe regulador identificado até à data; MFS: “Major Facilitator Superfamily”; SMR: “Small Multidrug Resistance”; QACs: compostos de amônio quaternário; EtBr: brometo de etídeo.

1.3.3 Sistemas de efluxo codificados no cromossoma

Os sistemas de efluxo codificados no cromossoma têm sido estudados ao longo dos últimos anos, principalmente em *S. aureus*. Dentro destes, figuram as bombas de efluxo NorA, NorB, NorC, que extrusam antibióticos, como fluoroquinolonas e alguns biocidas como QACs e corantes [28, 103, 122, 138]. São ainda escassos os estudos realizados sobre estes sistemas de efluxo em outras espécies de estafilococos. Em *S. epidermidis* e outros estafilococos, Juárez-Verdayes e colegas demonstraram a presença de homólogos dos genes *norA*, *norB* e *norC* [63]. De igual forma, foi identificado em *S. epidermidis* um homólogo do gene *mgrA*, que codifica para o regulador global MgrA,

envolvido na regulação das bombas de efluxo mencionadas [63]. Em *S. aureus*, já foram descritos e caracterizados outros sistemas de efluxo cromossómicos, nomeadamente SepA, MdeA, MepA, SdrM e LmrS [28, 105]. Todavia, análises genómicas comparativas demonstraram que em *S. epidermidis*, apenas estão presentes genes homólogos aos que codificam para as bombas de efluxo SdrM e LmrS (Costa *et al.*, manuscrito em preparação). Estes sistemas de efluxo encontram-se descritos na Tabela 4.

Tabela 4. Sistemas de efluxo codificados no cromossoma de *S. epidermidis* e outros estafilococos.

Sistema de efluxo	Família	Regulador ^a	Substratos	Espécies em que foram detectados	Referências
NorA	MFS	MgrA, NorG(?)	Fluoroquinolonas hidrofílicas, QACs e corantes	<i>S. epidermidis</i> <i>S. aureus</i>	[64, 103, 138]
NorB	MFS	MgrA, NorG	Fluoroquinolonas hidrofílicas e hidrofóbicas, tetraciclina, QACs e corantes	<i>S. epidermidis</i> <i>S. aureus</i>	[48, 63, 78, 124]
NorC	MFS	MgrA (?), NorG	Fluoroquinolonas hidrofílicas e hidrofóbicas, corantes	<i>S. epidermidis</i> <i>S. aureus</i>	[63, 123, 125]
MdeA	MFS	Por identificar	Fluoroquinolonas hidrofílicas, outros antibióticos, QACs e corantes	<i>S. aureus</i>	[59, 136]
SdrM	MFS	Por identificar	Fluoroquinolonas hidrofílicas e corantes	<i>S. epidermidis</i> <i>S. aureus</i>	[135]
LmrS	MFS	Por identificar	Alguns antibióticos, QACs, detergentes e corantes	<i>S. epidermidis</i> <i>S. aureus</i>	[47]
MepA	MATE	MepR	Fluoroquinolonas, QACs e corantes	<i>S. aureus</i>	[65, 70]
SepA	Por identificar	Por identificar	QACs, biguanidinas e corantes	<i>S. aureus</i>	[90]

^a O papel do regulador NorG no sistema de efluxo NorA e do regulador MgrA no sistema de efluxo NorC continua por esclarecer; MFS: “Major Facilitator Superfamily”; SMR: “Small Multidrug Resistance”; MATE: “Multidrug and Toxic Compound Extrusion”; QACs: compostos de amónio quaternário.

1.4 Metodologias de estudo da actividade de efluxo

O reconhecimento do efluxo como uma componente importante na emergência da resistência a antibióticos em várias espécies bacterianas tem promovido o desenvolvimento de métodos para a detecção e caracterização da actividade de efluxo. Entre estes métodos, contam-se abordagens que envolvem a utilização de fluorocromos

que são, simultaneamente, substratos comuns de bombas de efluxo [29, 96, 128]. Vários estudos têm utilizado o fluorocromo EtBr, como marcador de actividade de efluxo em estafilococos e outras espécies bacterianas, através da determinação da concentração mínima inibitória (CMI) para este composto [68, 98], do método do EtBr em agar ou método de “Cartwheel” [80, 81] e de fluorometria em tempo-real [29, 96, 128]. Outros métodos incluem a determinação de CMIs para substratos de efluxo, na ausência e na presença de compostos, denominados como inibidores de efluxo (IEs), que possuem a capacidade de inibição de actividade de efluxo [29, 96].

A aplicação da determinação de CMI de EtBr em *S. aureus* demonstrou ser um método com elevada sensibilidade, reprodutível para o rastreio de actividade de efluxo em grandes colecções de isolados clínicos [68, 98]. Este processo é feito através do método de microdiluição numa placa de 96 poços, tornando-se um método relativamente simples, rápido (com resultados entre as 18 e as 24 horas) e pouco dispendioso [68, 98]. Isolados que possuem uma actividade de efluxo acrescida, apresentam valores de CMI superiores a isolados com actividade de efluxo basal, podendo assim ser facilmente detectáveis [68, 98].

Por sua vez, o método de “Cartwheel” consiste no crescimento de estirpes bacterianas em meio TSA suplementado com concentrações crescentes de EtBr. Estirpes com actividade de efluxo aumentada, irão emitir fluorescência associada ao crescimento bacteriano a uma concentração de EtBr superior, quando comparadas com estirpes com actividade de efluxo basal [80, 81].

Um outro método para avaliação da actividade de efluxo é a fluorometria em tempo-real, a qual permite caracterizar a actividade de efluxo presente em células bacterianas, através da detecção em tempo-real, da acumulação de EtBr no interior das células assim como da sua extrusão [96, 128]. Neste método é também possível caracterizar, em tempo-real, o efeito de IEs na actividade de efluxo [96, 128]. Este método mostrou ser útil no estudo da actividade de efluxo em estirpes de *S. aureus* [25, 29, 30, 33].

1.5 Objectivos desta Dissertação

A utilização de antibióticos e biocidas é incontornável no tratamento e prevenção de infecções bacterianas, sendo por isso amplamente aplicados em ambiente hospitalar, na prática clínica animal, e mesmo na comunidade [93, 134]. No entanto, o uso extensivo destes compostos antimicrobianos pode ser um factor de selecção e de disseminação de bactérias com resistência a antibióticos e/ou biocidas. Nos últimos anos, tem sido dada particular atenção ao papel desempenhado pelas bombas de efluxo, capazes de expelir da célula bacteriana diferentes tipos de compostos, no aparecimento de resistência a estes compostos e em particular, no desenvolvimento de fenótipos de multirresistência. No entanto, ainda pouco se sabe sobre a sua frequência e relevância em *S. epidermidis*.

Esta Dissertação teve como principal objectivo avaliar a frequência dos determinantes de efluxo localizados em plasmídeos, *qacA/B* e *smr*, em *S. epidermidis* isolados de duas populações com elevada exposição a antimicrobianos, nomeadamente animais de companhia e profissionais e estudantes de Medicina Veterinária. A presença/ausência destes determinantes de resistência foi, posteriormente, correlacionada com a capacidade de efluxo das estirpes bacterianas e o seu perfil de susceptibilidade a antibióticos.

2 Materiais e Métodos

2.1 Materiais

2.1.1 Estirpes bacterianas

A estirpe de referência *Staphylococcus epidermidis* ATCC®12228™ foi utilizada, ao longo deste trabalho, como controlo e será denominada ATCC12228. A estirpe *S. epidermidis* ATCC12228 adaptada a 16 mg/L de EtBr (Costa *et al.*, manuscrito em preparação) foi utilizada como controlo positivo de efluxo e será denominada ao longo deste trabalho como ATCC12228_EtBr16.

Neste trabalho foram estudadas duas colecções de isolados de *S. epidermidis*, facultadas pela Professora Doutora Constança Pomba, Laboratório de Resistência aos Antibióticos e Biocidas da Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade de Lisboa. A primeira colecção consistia em 21 isolados recolhidos de locais de infecção em cães e gatos [37] – Tabela 5.

Tabela 5. Caracterização dos isolados de *S. epidermidis* recolhidos de locais de infecção em cães e gatos.

Isolado	Origem	Material biológico	Data de colheita
FMV – 1	Gato	Amostra Auricular	2001
FMV – 2	Gato	Urina	2002
FMV – 3	Gato	Amostra Auricular	2002
FMV – 4	Gato	Urina	2002
FMV – 5	Gato	Amostra de Pele	2003
FMV – 6	Cão	Amostra de Pele	2006
FMV – 7	Gato	Urina	2006
FMV – 8	Cão	Amostra de Pele	2007
FMV – 9	Gato	Urina	2007
FMV – 10	Gato	Urina	2008
FMV – 11	Cão	Urina	2009
FMV – 12	Cão	Material Cirúrgico (Discospondilite)	2011

Tabela 5. Continuação.

Isolado	Origem	Origem (material biológico)	Data de recolha
FMV – 13	Cão	Zaragatoa	2012
FMV – 14	Cão	Amostra Auricular	2012
FMV – 15	Cão	Zaragatoa	2012
FMV – 16	Gato	Amostra de Pele	2012
FMV – 17	Cão	Zaragatoa Material Ortopédico	2012
FMV – 18	Gato	Amostra Auricular	2012
FMV – 19	Gato	Líquido toracocentese	2012
FMV – 20	Gato	Zaragatoa ferida membro posterior esquerdo	2015
FMV – 21	Cão	Zaragatoa interdigital	2016

A segunda coleção estudada compreendia 116 isolados de colonização (FMV-22 a FMV-137) recolhidos num grupo de 129 indivíduos composto por 71 veterinários, 10 enfermeiros veterinários, 14 auxiliares veterinários e 34 estudantes de Medicina Veterinária (Tabela 6). Todas as estirpes foram recolhidas por zaragatoa nasal no período de Março a Agosto de 2014 [111].

Tabela 6. Caracterização dos isolados de *S. epidermidis* recolhidos de colonização em profissionais e estudantes de Medicina Veterinária no ano de 2014.

Ocupação	Isolados
Médicos Veterinários	FMV-22; 23; 30; 31; 45; 46; 47; 53; 55; 57; 58; 59; 60; 64; 68 ^(a) ; 69 ^(a) ; 70; 71 ^(b) ; 72 ^(b) ; 73; 74; 75; 77; 78; 79; 80; 81; 82; 83; 84; 87; 88; 89 ^(c) ; 90 ^(c) ; 91 ^(d) ; 92 ^(d) ; 93; 96; 97 ^(e) ; 98 ^(e) ; 99 ^(f) ; 100 ^(f) ; 101; 102; 103; 107; 110; 111; 112; 113; 114; 119; 120; 121; 123 ^(g) ; 124 ^(g) ; 127; 129; 130; 131; 133; 135 ^(h) ; 136 ^(h)
Enfermeiros Veterinários	FMV-32 ⁽ⁱ⁾ ; 33 ⁽ⁱ⁾ ; 52; 54; 62; 118; 122; 126; 137
Auxiliares Veterinários	FMV-25 ^(j) ; 26 ^(j) ; 27 ^(k) ; 28 ^(k) ; 29; 61; 63; 66; 115 ^(l) ; 116 ^(l) ; 117; 125; 132; 134
Estudantes de Medicina Veterinária	FMV-24; 34; 35; 36; 37; 38; 39; 40; 41; 42; 48; 49; 50 ^(m) ; 51 ^(m) ; 65; 67; 76; 85; 86; 94; 104; 105; 106; 108; 109; 128

(a) a (m): Isolados *S. epidermidis* pertencentes ao mesmo indivíduo.

2.1.2 Outro material biológico

Ao longo do trabalho foram utilizados os seguintes marcadores de peso molecular: λ HindIII, Gene Ruler 50 bp, Gene Ruler 100 bp Plus e Gene Ruler 1 Kb (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, E.U.A). Estes marcadores foram utilizados na análise de DNA plasmídico, de produtos de restrição enzimática ou de produtos de PCR.

Como controlos positivos das reacções de PCR foram utilizados DNAs cromossómico ou plasmídico das estirpes de *S. aureus*: SM1 (*mecA*) [25], SM39 (*qacA/B*) [31] e SM52 (*smr*) [27, 31].

Os “primers” utilizados ao longo deste trabalho encontram-se descritos na Tabela 7.

Tabela 7. Sequências nucleotídicas dos “primers” utilizados na amplificação por PCR dos genes em estudo e tamanho esperado de cada amplificação, em pares de base (pb).

Alvo	“primers”	Sequência nucleotídica (5' – 3')	Amplicação (pb)	Referências
Zona ITS entre 16S e 23S rRNA	G1	GAAGTCGTAACAAGG	Vários	[61]
	L1	CAAGGCATCCACCGT		
<i>qacA/B</i>	QacA/B_Fw	GCTGCATTTATGACAATGTTTG	628	[4]
	QacA/B_Rv	AATCCCACCTACTAAAGCAG		
<i>smr</i>	Smr_Fw	ATAAGTACTGAAGTTATTGGAAGT	285	[10]
	Smr_Rv	TTCCGAAAATGTTTAAACGAAACTA		
<i>mecA</i>	mecF	GGTCCCATTA ACTCTGAAG	1040	[102]
	mecR	AGTTCTGCAGTACCGGATTTGC		

2.1.3 Meios de cultura, enzimas e soluções

Os meios de cultura e as soluções usadas neste trabalho foram preparados com água destilada autoclavada e, quando necessário, autoclavados a 121°C durante 20 minutos, à excepção da solução de glicerol (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, E.U.A) a 50% (v/v), que foi esterilizada à temperatura de 110°C.

Os meios de cultura utilizados encontram-se descritos na Tabela 8.

Tabela 8. Composição dos meios de cultura usados neste trabalho.

Meio de cultura ⁽¹⁾	Composição (por litro)
Tryptone Soya Broth (TSB)	17 g caseína de pâncreas digerida; 3 g enzima de feijão de soja digerida; 5 g cloreto de sódio; 2,5 g fosfato dipotássico de hidrogénio; 2,5 g glucose; pH 7,3 ± 0,2 @ 25°C
Tryptone Soya Agar (TSA)	15 g caseína de pâncreas digerida; 5 g enzima de feijão de soja digerida; 5 g cloreto de sódio; 15 g ágar; pH 7,3 ± 0,2 @ 25°C
Mueller-Hinton Broth (MHB)	300 g infusão desidratada de carne de vaca; 17,5 g caseína hidrolisada; 1,5 g amido; pH 7,3 ± 0,1 @ 25°C
Mueller-Hinton Agar (MHA)	300 g infusão desidratada de carne de vaca; 17,5 g caseína hidrolisada; 1,5 g amido; 17 g ágar; pH 7,3 ± 0,1 @ 25°C

(1) Oxoid Ltd., Basingstoke, Inglaterra.

Ao longo deste trabalho também foram utilizadas diferentes enzimas, que se encontram descritas na Tabela 9.

Tabela 9. Enzimas utilizadas ao longo deste trabalho.

Enzima	Composição/ Preparação da solução “stock”
RNase⁽¹⁾	10 mg/mL em 50 mM Tris base, 10 mM EDTA e pH 8,0 ajustada com HCl. Mantida em alíquotas a -20°C.
Lisostafina⁽¹⁾	15 mg/mL em água bidestilada estéril. Mantida em alíquotas a -20°C.
Proteinase K⁽¹⁾	20 mg/mL em água bidestilada estéril. Mantida em alíquotas a -20°C.
<i>AluI</i>⁽²⁾	Solução “stock” a 10 U/μL Mantida a -20°C
<i>Taq</i> DNA Polimerase⁽²⁾	Solução “stock” a 5 U/μL Mantida a -20°C

(1) Sigma-Aldrich; (2) Thermo Fisher.

A composição e preparação das soluções tampão utilizadas ao longo do trabalho experimental encontram-se descritas na Tabela 10.

Tabela 10. Composição e preparação das soluções “stock” utilizadas neste trabalho.

Solução	Composição
TE 1x	10 mM Tris-HCl ⁽¹⁾ , 1 mM EDTA ⁽¹⁾ pH 8,0
Tampão P1	50 mM Tris base, 10 mM EDTA, ajuste de pH 8,0 com HCl ⁽²⁾
Tampão P2	0,2 M NaOH ⁽³⁾ ; 1% (p/v) dodecil sulfato de sódio ⁽¹⁾
Tampão P3	3 M Acetato de sódio ⁽³⁾ , ajuste de pH a 4,8 com ácido acético glacial ⁽⁴⁾
PBS ⁽¹⁾	10 mM Tampão fosfato; 2,7 mM cloreto de potássio; 137 mM cloreto de sódio; pH 7,4 a 25°C Dissolução de uma pastilha em 200 mL de água
TAE 50X	2 M Tris-base, 50 mM EDTA, ajuste a pH 8,0 com ácido acético Solução de trabalho a 1X (40mM Tris-base; 1 mM EDTA e ajuste a pH 8,0 com ácido acético)
Triton X-100 ⁽¹⁾	10% (p/v) em água bidestilada estéril Mantida a 4°C
Soro fisiológico	0,9% (p/v) de cloreto de sódio ⁽³⁾ em água bidestilada estéril
Glucose	20% (p/v) de glucose ⁽⁴⁾ em água bidestilada estéril Mantida a 4°C

(1) Sigma-Aldrich; (2) Panreac, Barcelona, Espanha; (3) Merck, Darmstadt, Alemanha; (4): Riedel-de Haen, Sigma-Aldrich.

Neste trabalho foram utilizadas soluções do marcador de efluxo brometo de etídeo (EtBr) e do inibidor de efluxo verapamil (VER), descritas na Tabela 11.

Tabela 11. Composição e preparação das soluções de brometo de etídeo e verapamil.

Solução⁽¹⁾	Composição/ Preparação solução “stock”
Brometo de Etídeo (EtBr)	10 mg/mL em água bidestilada estéril Mantida a 4°C
Verapamil (VER)	40 mg/mL em água bidestilada estéril Mantida a -20°C

(1) Sigma-Aldrich.

Foram ainda utilizados discos de antibiótico para estudar a susceptibilidade aos diferentes antibióticos pelo método de difusão em disco – Tabela 12.

Tabela 12. Lista de antibióticos utilizados no teste de difusão em disco “Kirby-Bauer” e respectivos valores de interpretação, segundo as recomendações da EUCAST [43].

Classe	Antibiótico ⁽¹⁾	Carga do disco (µg)	“breakpoint” halo de inibição (mm)	
			S	R
β – lactâmicos	Penicilina	1 U	A	A
	Ampicilina	2	A	A
	Oxacilina	1	A	A
	Cefoxitina	30	≥ 25	< 25
Macrólidos	Eritromicina	15	≥ 21	< 18
Lincosamidas	Clindamicina	2	≥ 22	< 19
Fluoroquinolonas	Ciprofloxacina	5	≥ 20	< 20
	Norfloxacina	10	≥ 17	A
	Moxifloxacina	5	≥ 24	< 21
Aminoglicosídeos	Gentamicina	10	≥ 22	< 22
	Canamicina	30	A	A
	Tobramicina	10	≥ 22	< 22
Estreptograminas	Quinopristina–dalfopristina	15	≥ 21	< 18
Tetraciclinas	Tetraciclina	30	≥ 22	< 19
	Tigeciclina	15	≥ 18	< 18
Oxazolidinonas	Linezolida	10	≥ 19	< 19
Fenicóis	Cloranfenicol	30	≥ 18	< 18
	Florfenicol	30	A	A
Fusidanos	Ácido fusídico	10	≥ 24	< 24
Ácidos pseudomônicos	Mupirocina	200	≥ 30	< 18
Nitrofuranos	Nitrofurantoína	300	A	A
Rifamicinas	Rifampicina	5	≥ 26	< 23
Trimetoprim/Sulfonamidas	Trimetoprim	5	≥ 17	< 14
	Trimetoprim-sulfametoxazole	1,25/23,75	≥ 17	< 14

(1) Oxoid. U: unidade; S: susceptível; R: resistente; A: Valores de “breakpoint” não padronizados [43].

2.2 Métodos

2.2.1 Cultura e armazenamento das estirpes bacterianas

As estirpes bacterianas foram cultivadas em meio líquido “tryptone soya broth” (TSB) a 37°C com agitação a 180 rotações por minuto (rpm), durante 18 horas, ou em meio sólido “tryptone soya agar” (TSA) a 37°C, por 18 a 24 horas. Para os testes de susceptibilidade ao brometo de etídeo (EtBr), as estirpes foram cultivadas em meio líquido “Mueller-Hinton broth” (MHB) a 37°C com agitação a 180 rpm, ou em meio sólido “Mueller-Hinton agar” (MHA) a 37°C, durante 18 a 24 horas.

Foram preparados “stocks” das estirpes de *S. epidermidis* em estudo, em meio TSB suplementado com 10% (v/v) de glicerol. Os “stocks” foram mantidos a -80°C e a -180°C.

2.2.2 Extração de DNA total

A extração de DNA total foi feita através do método de fervura adaptado de Alexopoulou *et al.*, 2006 [2]. A partir de placas de isolamento em TSA foram retiradas duas a três colónias isoladas e transferidas para 5 mL de meio TSB. As culturas foram crescidas a 37°C com agitação durante a noite. A partir de 1 mL de cultura, recolheram-se as células por centrifugação a 13.000 rpm durante cinco minutos. Em seguida o “pellet” foi ressuscitado em 0,5 mL de Tampão TE suplementado com 1% (p/v) de Triton X-100 e 180 µg/mL de Proteinase K e a suspensão foi incubada num banho de água a 56°C durante uma hora, seguida de incubação a 100°C durante cinco minutos. Os tubos foram depois arrefecidos em gelo e o sobrenadante, contendo o DNA total, recolhido por centrifugação a 13.000 rpm durante 5 minutos e transferido para um novo tubo. A partir de cada preparação foi retirada uma alíquota e esta diluída 1:10 em água MiliQ autoclavada. O DNA total foi mantido a -20°C, enquanto o DNA total diluído foi mantido a 4°C.

2.2.3 Extracção de DNA plasmídico pelo método de lise alcalina modificado

A extracção de DNA plasmídico foi feita pelo método modificado de lise alcalina [31, 114]. A partir de placas de isolamento em TSA foram retiradas duas a três colónias e transferidas para 5 mL de meio TSB. As culturas foram crescidas a 37°C com agitação a 180 rpm durante a noite (aproximadamente 18 horas). A partir de 1,5 mL de cultura, recolheram-se as células por centrifugação a 13.000 rpm durante dez minutos. De seguida o “pellet” foi ressuscitado em 0,1 mL de tampão P1 suplementado com 100 µg/mL de RNase, raspando os tubos numa superfície rugosa. Seguiu-se a adição de 40 µg/mL de lisostafina e incubou-se a 37°C durante aproximadamente 90 minutos. Após a lise celular adicionaram-se 0,2 mL de tampão P2 misturando-se por inversão até a solução ficar viscosa e incubou-se em gelo durante cinco minutos. De seguida adicionaram-se 0,15 mL de tampão P3 e incubou-se em gelo durante dez minutos. Posteriormente, centrifugou-se a 13.000 rpm durante 30 minutos a 4°C e o sobrenadante foi transferido para tubos de eppendorf contendo 1 mL de etanol absoluto, arrefecido a -20°C, e incubou-se à temperatura ambiente durante uma hora. De seguida, voltou-se a centrifugar a 13.000 rpm durante 30 minutos a 4°C, o sobrenadante foi descartado e o “pellet” foi lavado com 0,5 mL de etanol a 80% (v/v) arrefecido a -20°C. Após nova centrifugação a 13.000 rpm durante dez minutos a 4°C, descartou-se o sobrenadante. O “pellet” foi seco por incubação a 37°C durante 15 minutos e, de seguida ressuscitado em 0,04 mL de água MiliQ autoclavada. O DNA plasmídico extraído foi mantido a -20°C e utilizado em reacções de PCR de confirmação da presença de genes plasmídicos de bombas de efluxo.

A presença de plasmídeos foi verificada através de electroforese em gel de agarose (Sigma) a 1,5% (p/v) em TAE a 1X, com uma fonte de alimentação Amersham Pharmacia Biotech EPS 301 (GE Healthcare, Londres, Reino Unido). Após a corrida, a 80V durante 90 minutos, o gel foi corado numa solução de EtBr a 0,5 mg/L e os resultados foram visualizados e registados num aparelho Gel-doc XR (Bio-Rad, Califórnia, E.U.A.).

2.2.4 Confirmação da identificação dos isolados por ITS-PCR

O método de identificação ITS-PCR (“Internal Transcribed Spacer-PCR”) permite distinguir a maioria das espécies do género *Staphylococcus* através da amplificação da região intergénica entre os genes codificantes para o 16S rRNA e o 23S rRNA [32]. Os “primers” utilizados nesta reacção de PCR, L1 e G1, encontram-se descritos na Tabela 7.

As reacções de ITS-PCR foram preparadas num volume final de 50 µL contendo 1X Tampão *Taq*, 1,75 mM de cloreto de magnésio (Thermo Fisher), 0,1 mM de dNTPs (NZYTech, Lisboa, Portugal), 50 ng de “primers” G1 e L1, 2U *Taq* DNA Polimerase e 5 µL de DNA total diluído (1:10).

O programa desta reacção de PCR consiste num passo de desnaturação inicial a 94°C durante 4 minutos, seguindo-se 25 ciclos, constituídos por: um passo de 2 minutos a 94°C, arrefecimento até 55°C durante 2 minutos e 10 segundos, 7 minutos a 55°C, aquecimento até 72°C durante 2 minutos e 20 segundos, 2 minutos a 72°C e um passo de extensão final a 72°C durante 7 minutos [32, 61]. As reacções de PCR foram realizadas num termociclador “Mastercycler personal” 5332 (Eppendorf AG, Barkhausenweg, Alemanha).

Os produtos de ITS-PCR foram analisados visualmente através de um gel de agarose Metaphor (Lonza, Rockland, ME, E.U.A.) a 3% (p/v) em TAE a 1X suplementado com 0,5 mg/L de EtBr, por comparação com o padrão da estirpe de referência de *S. epidermidis* ATCC12228. A electroforese decorreu a 60V durante, aproximadamente, três horas. Os resultados foram visualizados e registados num aparelho Gel-doc XR (Bio-Rad).

2.2.5 Susceptibilidade a antibióticos pelo método de difusão em disco

A susceptibilidade a antibióticos foi testada através do método de difusão em disco (método de “Kirby-Bauer”), segundo as recomendações do “European Committee of

Antimicrobial Susceptibility Testing” [43]. Os antibióticos testados são representativos de várias classes e encontram-se descritos na Tabela 12.

Para a realização do teste de “Kirby-Bauer”, prepararam-se placas de isolamento em TSA. A partir destas placas, retiraram-se quatro a cinco colónias isoladas e transferiram-se para 8 mL de soro fisiológico. A suspensão celular foi ajustada à escala de 0,5 de McFarland com soro fisiológico e inoculada em placas de MHA, por espalhamento com zaragatoa. Alguns dos isolados não cresceram em meio MHA e, por esta razão, o ensaio de difusão em disco foi realizado em meio TSA. Os discos de antibióticos foram colocados sobre o meio inoculado, as placas invertidas e incubadas numa estufa a 37°C. A leitura dos halos de inibição foi realizada após 18 horas de incubação para todos os antibióticos, com excepção da cefoxitina (FOX) e da oxacilina (OXA), cujos resultados foram adicionalmente lidos após 24 horas de incubação.

A presença de resistência indutível à clindamicina (CLI) foi testada através do método “D-test”, que consiste em colocar o disco de CLI entre 12 a 20 mm de distância do disco de eritromicina (ERY) [43]. A formação de um halo de inibição da clindamicina em forma de D na proximidade do disco de eritromicina é indicativa de resistência indutível à clindamicina.

2.2.6 Detecção dos genes *qacA/B* e *smr* em plasmídeos

A presença dos genes *qacA/B* e *smr*, que codificam para bombas de efluxo em *S. epidermidis*, foi determinada pela amplificação de fragmentos internos de cada gene, por PCR, utilizando os “primers” descritos na Tabela 7.

As reacções de PCR foram preparadas num volume final de 25 µL, contendo 1X Tampão *Taq*; 1,75 mM de cloreto de magnésio; 0,2 mM de dNTPs; 10 pmol de cada “primer”; 1,25 U de *Taq* Polimerase. A cada reacção foi adicionado 2,5 µL de DNA total diluído (1:10). Estas reacções foram realizadas em termocicladores “Mastercycler personal 5332” (Eppendorf AG) ou Uno II (Biometra, Göttingen, Alemanha). Os programas de amplificação encontram-se descritos na Tabela 13. Para a reacção de

amplificação dos genes *qacA/B* utilizou-se como controlo positivo o DNA plasmídico da estirpe *S. aureus* SM39, que contém o gene *qacA* [31], e para o gene *smr*, o DNA plasmídico da estirpe *S. aureus* SM52 [27], tendo-se utilizado o DNA plasmídico da estirpe ATCC12228 como controlo negativo para ambas reacções de PCR.

Tabela 13. Programas de PCR utilizados na amplificação de genes de bombas de efluxo e do gene *mecA*.

Genes	Programas de amplificação	Ampliação (pb)	Referências	
<i>qacA/B</i>	95°C – 5 min	35 ciclos	628	[4]
	95°C – 1 min			
	40°C – 45 seg			
	72°C – 1 min			
	72°C – 5 min			
<i>smr</i>	95°C – 4 min	35 ciclos	285	[10]
	95°C – 30 seg			
	48°C – 30 seg			
	72°C – 30 seg			
	72°C – 5 min			
<i>mecA</i>	94°C – 4 min	30 ciclos	1040	[102]
	94°C – 1 min			
	58°C – 1 min			
	72°C – 2 min			
	72°C – 10 min			

min: minutos; seg: segundos.

Os produtos de PCR foram analisados através de electroforese em gel de agarose (Sigma, para uso de rotina) a 1,5% (p/v) em TAE 1X, a 80V durante 45 minutos. Após a corrida, o gel foi corado numa solução de EtBr a 0,5 mg/L e os resultados foram visualizados e registados num aparelho Gel-doc XR (Bio-Rad).

- **Restrição com *AluI***

Para diferenciar os genes *qacA* e *qacB*, os produtos de amplificação foram depois digeridos com a enzima de restrição *AluI*, cuja sequência de reconhecimento (5'- AG | CT) abarca um dos sete nucleótidos que diferem entre os dois genes. No caso de *qacA* são produzidos vários fragmentos de restrição, o maior dos quais de 200 pb, enquanto no caso de *qacB* este fragmento é de 176 pb [24].

A reacção de restrição foi preparada num volume final de 20 μL , com 10 μL do produto de PCR *qacA/B*, contendo 1X tampão *AluI* e 5U de *AluI*. A reacção de restrição foi incubada 3 horas a 37°C e no final, a enzima foi inactivada durante 20 minutos a 65°C.

Os produtos de restrição foram analisados através de electroforese em gel de agarose Metaphor (Lonza) a 3% (p/v) em TAE 1X suplementado com 0,5 mg/L de EtBr. A electroforese foi efectuada a 50V durante, aproximadamente, duas horas. Após a corrida, os resultados foram visualizados e registados num aparelho Gel-doc XR (Bio-Rad).

2.2.7 Detecção da presença do gene *mecA*

A presença do gene *mecA* foi determinada através de reacção de PCR. O gene *mecA* é um gene exógeno, presente num elemento genético móvel, *SCCmec* (de “staphylococcal cassette chromosome *mec*” [60, 66]. Este gene codifica para uma PBP adicional, a PBP2a, que possui baixa afinidade para a classe dos β -lactâmicos, conferindo resistência aos antibióticos pertencentes a esta classe [53]. Os “primers” utilizados neste PCR encontram-se descritos na Tabela 7.

A reacção de PCR foi preparada num volume final de 25 μL , contendo 1X Tampão *Taq*; 1,75 mM de cloreto de magnésio; 0,2 mM de dNTPs; 10 pmol de cada “primer” e 1,25U de *Taq* Polimerase. A cada reacção foi adicionado 2,5 μL de DNA total diluído (1:10). Esta reacção foi realizada no termociclador “Mastercycler personal 5332” e o respectivo programa encontra-se descrito na Tabela 13. O DNA genómico pertencente à estirpe *S. aureus* SM1, que contém o gene *mecA*, foi utilizado como controlo positivo, enquanto o DNA total da estirpe ATCC12228 foi utilizado como controlo negativo.

Os produtos de PCR foram analisados através de electroforese em gel de agarose a 1,5% (p/v) em TAE 1X a 80V durante 45 minutos. Após a corrida, o gel foi corado numa solução de EtBr a 0,5 mg/L e os resultados foram visualizados e registados num aparelho Gel-doc XR (Bio-Rad).

2.2.8 Detecção e caracterização da actividade de efluxo

A identificação de estirpes com actividade de efluxo aumentada foi efectuada recorrendo a dois métodos: o método de brometo de etídeo em agar (método de “Cartwheel”) e a determinação da concentração mínima inibitória (CMI) do EtBr. A avaliação e caracterização da actividade de efluxo foram feitas por fluorometria em tempo-real. O EtBr foi utilizado nestes ensaios, pois é um substrato comum das bombas de efluxo [80, 81].

- **Método de brometo de etídeo em agar (método de “Cartwheel”, EtBrCW)**

O principal objectivo deste método é determinar, de entre as estirpes bacterianas em estudo, quais as que possuem uma actividade de efluxo aumentada. Para tal, estirpes bacterianas são crescidas em meio TSA suplementado com concentrações crescentes de EtBr a 37°C durante 18 horas. É esperado verificar-se um aumento da fluorescência associada ao crescimento bacteriano, indicando assim a acumulação de EtBr no interior das células bacterianas [80]. No caso de uma estirpe possuir sistema(s) de efluxo sobreexpresso(s), o EtBr pode ser extrusado das células, evitando assim a sua acumulação no interior das células e diminuindo a emissão de fluorescência [80].

A partir de uma placa de isolamento em meio TSA, foram transferidas duas a três colónias isoladas para tubos contendo meio TSB e incubados a 37°C com agitação, durante seis horas. De seguida, preparou-se uma suspensão celular, transferindo 10 µL de cultura para 10 mL de PBS (diluição 1:1000). Esta suspensão diluída foi depois inoculada sob a forma de traços (do centro para o exterior) em placas de TSA suplementadas com concentrações crescentes de EtBr: 0; 0,125; 0,25; 0,5; 0,75; 1 e 1,5 mg/L, com a ajuda de zaragatoa, como ilustrado na Figura 3. Cada placa foi inoculada com um máximo de oito estirpes, incluindo o controlo negativo (estirpe ATCC12228) e o controlo positivo (estirpe ATCC12228_EtBr16) e incubada a 37°C durante 18 horas. Após este período, a emissão de fluorescência foi observada num transiluminador UviTec (Cambridge, Inglaterra) sob luz ultravioleta e registada fotograficamente num aparelho Gel-Doc XR (Bio-Rad) com um tempo de exposição de 0,1 segundos. Para

cada isolado, registou-se a concentração de EtBr a partir da qual se verificou a emissão de fluorescência. Estirpes que comecem a emitir fluorescência a concentrações superiores de EtBr deverão ter uma actividade de efluxo superior às que emitem fluorescência a concentrações de EtBr inferiores [80, 81].

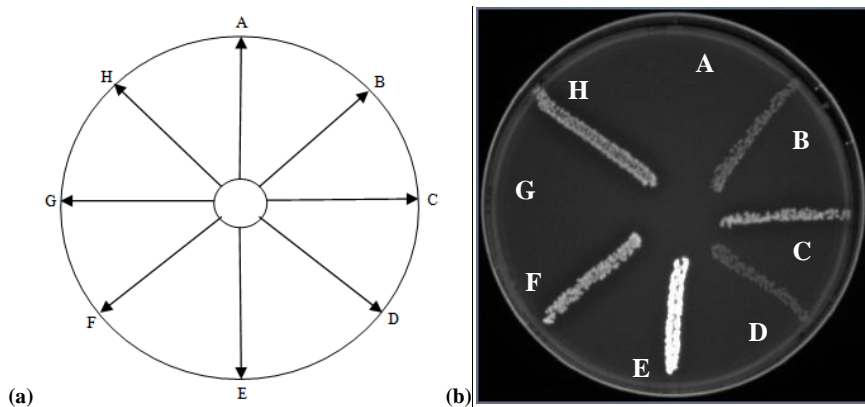


Figura 3. Imagens ilustrativas do método de “Cartwheel”. (a): Esquema da placa de Petri utilizado no ensaio de EtBrCW; (b): Resultado de um dos ensaios de EtBrCW, com 1,5 mg/L de EtBr; **A:** ATCC12228; **B:** ATCC12228_EtBr16; **C:** FMV-132; **D:** FMV-133; **E:** FMV-134; **F:** FMV-135; **G:** FMV-136; **H:** FMV-137.

- **Determinação da concentração mínima inibitória de brometo de etídio**

A CMI do EtBr foi determinada através do método de microdiluição, usando duas gamas de concentração: de 32 mg/L a 0,06 mg/L e de 256 mg/L a 0,5 mg/L. Os isolados em estudo foram inoculados em 5 mL de meio MHB e incubados durante a noite, a 37°C com agitação. A partir destas culturas foram preparadas suspensões celulares ajustadas à escala de McFarland 0,5 em meio MHB.

Foram preparadas placas de 96 poços, distribuindo 100 µL de meio MHB em cada poço das colunas 2 a 12 e 200 µL de meio aos poços da coluna 1 (Figura 4). A cada poço da coluna 2 foram adicionados 100 µL de uma solução de EtBr a uma concentração 4 vezes superior à concentração máxima testada. De seguida, foram feitas diluições 1:2, transferindo-se 100 µL de volume, dos poços da coluna 2 para os poços da coluna adjacente e, assim sucessivamente, até à coluna 11. Neste ponto, foram rejeitados os 100 µL em excesso. Posteriormente, cada poço da placa, com exceção da coluna 1, foi inoculado com 100 µL de suspensão celular previamente preparada. As placas foram incubadas a 37° C durante 18 horas. A leitura dos resultados foi feita após este período,

considerando a CMI como a concentração de EtBr mais baixa que inibe o crescimento bacteriano. Estes ensaios foram realizados em duplicado e, em caso de dúvida, em triplicado.

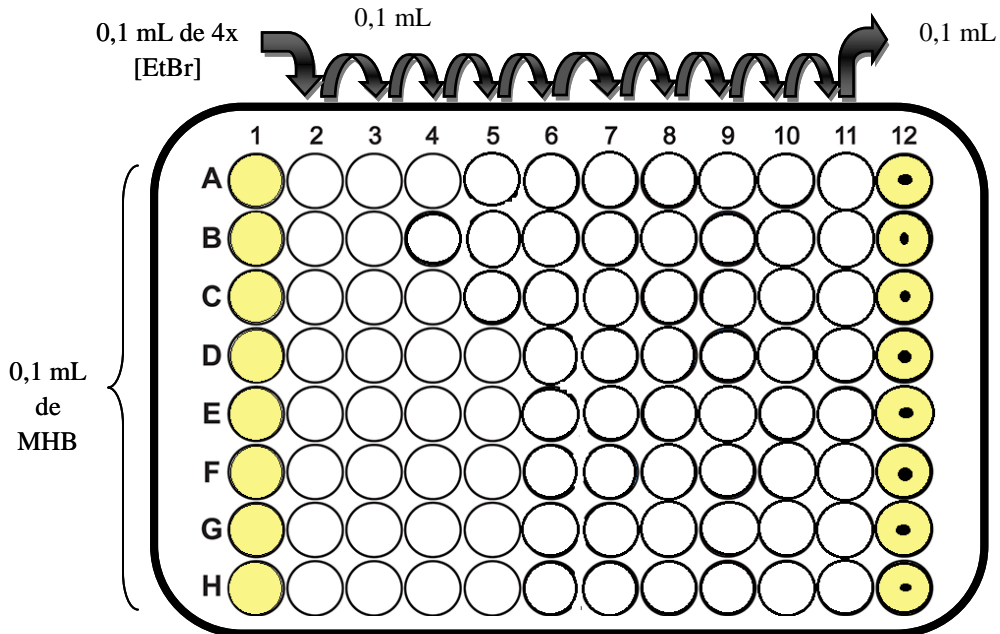


Figura 4. Imagem ilustrativa da determinação de CMIs pelo método de microdiluição em placas de 96 poços. Coluna 1: controle de esterilidade; Coluna 12: controle de crescimento.

- **Caracterização de sistemas de efluxo pelo método de fluorometria em tempo-real**

Os ensaios de fluorometria foram realizados num termociclador Rotor-Gene™3000 (Corbett Research, Sidney, Austrália), recorrendo a um “software” que permite analisar a emissão de fluorescência em tempo real. Para se caracterizar a actividade de efluxo dos isolados em estudo foram realizados ensaios de acumulação e de efluxo de EtBr, na presença e ausência de glucose e na presença de um inibidor de efluxo, o verapamil (VER).

Ensaio de acumulação: Para cada estirpe estudada foram preparadas culturas em 10 mL de meio TSB, a 37°C e com agitação a 180 rpm, até atingirem uma densidade óptica

a 600 nm (DO_{600}) de 0,6. As células foram recolhidas por centrifugação a 13.000 rpm durante 5 minutos e lavadas duas vezes com PBS. De seguida, ressuspendeu-se o “pellet” bacteriano em PBS de modo a obter uma suspensão celular com uma DO_{600} de 0,6. Entretanto foram preparados tubos de 0,2 mL contendo: (i) 50 μ L de PBS; (ii) 50 μ L de solução de EtBr 2 x concentrada; (iii) 50 μ L de solução de EtBr 2 x concentrada suplementada com glucose a 0,8%. As concentrações finais de EtBr testadas foram de 0,125; 0,25; 0,5; 1; 2 e 3 mg/L; a concentração final de glucose testada foi de 0,4%. A cada microtubo foram adicionados 50 μ L da suspensão celular, obtendo uma suspensão final a uma DO_{600} de 0,3. Os microtubos foram colocados no rotor do aparelho Rotor-Gene™3000. Os ensaios de acumulação de EtBr foram realizados à temperatura de 37°C, utilizando os comprimentos de onda de 530 nm para a excitação de EtBr e de 585 nm para leitura da fluorescência emitida. As leituras foram realizadas após cada ciclo de 60 segundos, durante 60 minutos. Cada ensaio foi realizado em duplicado.

Estes ensaios foram realizados para (i) avaliar o perfil de acumulação de EtBr das células bacterianas e (ii) determinar a concentração de EtBr à qual o influxo e o efluxo de EtBr estão em equilíbrio.

Ensaio de efluxo de EtBr: A cultura, recolha e lavagem das células foram iguais aos utilizados no ensaio de acumulação. Para os ensaios de efluxo, a suspensão celular foi ajustada com PBS a uma DO_{600} de 0,3. A esta suspensão celular foram adicionados, num tubo de ensaio, EtBr e VER (400 mg/L, equivalente a ½ CMI) durante 60 minutos, de modo a maximizar a acumulação de EtBr dentro das células. A concentração de EtBr de equilíbrio varia de estirpe para estirpe, estando discriminada na secção Resultados. Após uma hora de incubação, as células foram recolhidas por centrifugação a 13.000 rpm durante 10 minutos, sendo o sobrenadante descartado e o “pellet” ressuspendido em PBS de modo a obter uma suspensão celular com DO_{600} de 0,6. Foram preparados microtubos de 0,2 mL em que foram adicionados: (i) 50 μ L de PBS; (ii) 50 μ L de PBS com glucose a 0,8%; (iii) 50 μ L de PBS com VER a 800 mg/L; (iv) 50 μ L de PBS com VER a 800 mg/L e glucose a 0,8%. A concentração final de VER foi de 400 mg/L, o que corresponde a ½ da CMI garantindo a viabilidade celular, a concentração final de

glucose foi de 0,4% e a DO_{600} final de 0,3. Os microtubos foram colocados num aparelho Rotor-Gene™3000. Os ensaios de acumulação de EtBr foram realizados à temperatura de 37°C, utilizando o comprimento de onda de 530 nm para a excitação de EtBr e de 585 nm para leitura de fluorescência. As leituras foram realizadas após cada ciclo de 10 segundos, durante 10 minutos. Os valores de fluorescência foram normalizados em relação à curva de efluxo mínimo (incubação com verapamil, na ausência de glucose) - fluorescência relativa, considerando como 1 o valor inicial de cada curva [127]. Cada ensaio foi realizado em duplicado.

3 Resultados

3.1 Confirmação da identificação dos isolados por ITS-PCR

A identificação dos isolados das duas colecções estudadas foi confirmada por ITS-PCR, após o seu isolamento em placa. O perfil de ITS-PCR de estafilococos, utilizando os “primers” L1 e G1 apresenta quatro a nove bandas, na gama de 320 pb a 750 pb [32]. *S. epidermidis* apresenta um perfil de ITS-PCR com cinco bandas, entre 350 pb e 550 pb [32]. Todos os isolados de *S. epidermidis* apresentaram um padrão de ITS-PCR idêntico ao da estirpe de referência ATCC12228 (Figura 5).

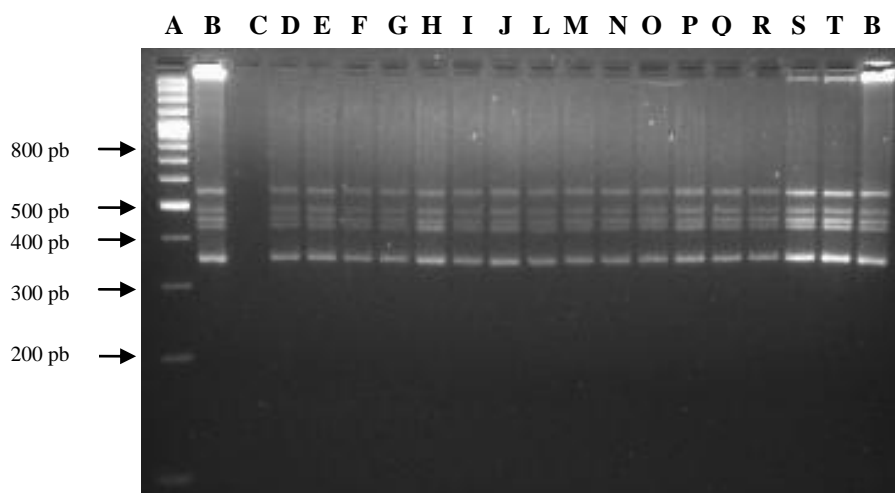


Figura 5. Análise dos produtos de ITS-PCR por electroforese em gel de agarose Metaphor 3% (p/v). **A:** Marcador GeneRuler™ 100 pb Plus; **B:** *S. epidermidis* ATCC12228. **C:** Controlo negativo (H₂O); **D:** FMV-20; **E:** FMV-97; **F:** FMV-105; **G:** FMV-107; **H:** FMV-108; **I:** FMV-112; **J:** FMV-113; **L:** FMV-114; **M:** FMV-116; **N:** FMV-117; **O:** FMV-123; **P:** FMV-125; **Q:** FMV-126; **R:** FMV-127; **S:** FMV-129; **T:** FMV-130.

Na colecção de isolados de infecção em animais foram identificados 17 isolados de *S. epidermidis*, enquanto na colecção de colonização em humanos foram identificados 112 isolados de *S. epidermidis*. Os restantes isolados das colecções iniciais (FMV-4, FMV-7, FMV-9 e FMV-21, da colecção de infecção; FMV-43, FMV-44, FMV-56 e FMV-95, da colecção de colonização) apresentaram perfis diferentes comparativamente com os perfis de *S. epidermidis* ATCC12228 e por isso não foram incluídos neste estudo.

3.2 Caracterização do perfil de susceptibilidade a antibióticos

O perfil de susceptibilidade a antibióticos foi determinado através do método de difusão em disco, como descrito no ponto 2.2.5 (Materiais e Métodos), utilizando as recomendações EUCAST [43]. A estirpe de referência ATCC12228, utilizada como controlo, apresentou resistência à tetraciclina, como esperado [139] - Tabela 14.

Tabela 14. Halos de inibição para diferentes antibióticos da estirpe de referência ATCC12228.

ATCC 12228		
Antibiótico	Halo (mm)	Fenótipo
PEN	6	A
AMP	18	A
OXA	24	A
FOX	26	S
ERY	34	S
CLI	32	S
CIP	34	S
NOR	34	S
MXF	36	S
GEN	32	S
KAN	32	A
TOB	34	S
QDT	32	S
TET	6	R
TGC	28	S
LZD	34	S
CHL	34	S
FFC	36	A
FUS	34	S
MUP	44	S
NIT	32	A
RIF	42	S
TMP	42	S
SXT	34	S

A: Valores de “breakpoint” não padronizados; **S:** susceptível; **R:** resistente; **PEN:** penicilina; **AMP:** ampicilina; **OXA:** oxacilina; **FOX:** cefoxitina; **ERY:** eritomicina; **CLI:** clindamicina; **CIP:** ciprofloxacina; **NOR:** norfloxacina; **MXF:** moxifloxacina; **GEN:** gentamicina; **KAN:** canamicina; **TOB:** tobramicina; **QDT:** quinopristina/dalfopristina; **TET:** tetraciclina; **TGC:** tigeciclina; **LZD:** linezolid; **CHL:** cloranfenicol; **FFC:** florfenicol; **FUS:** ácido fusídico; **MUP:** mupirocina; **NIT:** nitrofurantoína; **RIF:** rifampicina; **TMP:** trimetoprim; **SXT:** trimetoprim-sulfametoxazole.

3.2.1 Isolados de *S. epidermidis* de infecção em animais de companhia

Os valores dos halos de inibição obtidos para a colecção de 17 isolados de locais de infecção encontram-se detalhados na Tabela A1 (em Anexo). Foram observados vários perfis de susceptibilidade aos antibióticos nesta colecção, tal como descrito na Tabela

15. Os isolados caracterizados como intermédios foram considerados resistentes. O antibiograma do isolado FMV-20, que não cresceu em meio MHA, foi feito em meio TSA. Embora estas condições não sejam padronizadas, foram aplicados os mesmos critérios para a categorização deste isolado.

Relativamente à classe dos **β -lactâmicos**, oito dos 17 isolados apresentaram resistência à cefoxitina. Quanto à classe dos **macrólidos**, oito dos isolados apresentaram resistência à eritromicina, dos quais quatro apresentavam resistência indutível à clindamicina (**lincosamidas**).

Relativamente às **fluoroquinolonas**, seis isolados eram resistentes à norfloxacin, quatro eram resistentes à ciprofloxacina e apenas um isolado era resistente à moxifloxacina.

Em relação à classe dos **aminoglicosídeos**, três isolados apresentaram resistência à gentamicina e à tobramicina, e um isolado apresentou apenas resistência à tobramicina.

Quanto às **tetraciclinas**, sete isolados eram resistentes à tetraciclina e nenhum isolado era resistente à tigeciclina.

Em relação à classe de antibióticos **fusidano** sete isolados apresentaram resistência ao ácido fusídico.

Detectou-se ainda resistência pontual ao **trimetoprim/sulfonamidas** (dois isolados) e à mupirocina (um isolado).

Nesta coleção não foram detectados isolados resistentes à quinopristina/dalfopristina (**estreptograminas**), à linezolida (**oxazolidinonas**), ao cloranfenicol (**fenicóis**) ou à rifampicina (**rifamicinas**).

Dos 17 isolados de locais de infecção testados, apenas quatro não apresentaram resistência a nenhum dos antibióticos testados, enquanto oito dos 17 isolados apresentaram resistência a três ou mais classes de antibióticos [120] (Tabela 15).

Tabela 15. Perfil de susceptibilidade aos antibióticos dos isolados de *S. epidermidis* de infecção em animais.

Isolado	Antibióticos																	
	FOX	ERY	CLI	CIP	NOR	MXF	GEN	TOB	QDT	TET	TGC	LZD	CHL	FUS	MUP	RIF	TMP	SXT
FMV-1																		
FMV-2		■												■				
FMV-3	■				■			■									■	■
FMV-5																		
FMV-6	■									■								
FMV-8																		
FMV-10	■	■	■	■	■	■	■	■						■				
FMV-11																		
FMV-12					■					■					■			
FMV-13														■				
FMV-14	■	■	■	■	■	■	■	■		■				■				
FMV-15																		
FMV-16	■	■	■	■	■	■	■	■		■				■				
FMV-17																		
FMV-18	■	■	■	■	■	■	■	■		■				■				
FMV-19		■															■	■
FMV-20 ^(*)		■								■				■				

□ Susceptível; ■ Resistente; ■ Resistência indutível à clindamicina; (*): Os valores correspondentes ao isolado FMV-20 foram obtidos em meio TSA; FOX: cefoxitina; ERY: eritromicina; CLI: clindamicina; CIP: ciprofloxacina; NOR: norfloxacina; MXF: moxifloxacina; GEN: gentamicina; TOB: tobramicina; QDT: quinopristina/dalfopristina; TET: tetraciclina; TGC: tigeciclina; LZD: linezolida; CHL: cloranfenicol; FUS: ácido fusídico; MUP: mupirocina; RIF: rifampicina; TMP: trimetoprim; SXT: trimetoprim-sulfametoxazole.

3.2.2 Isolados de *S. epidermidis* de colonização em humanos

Os valores dos halos de inibição obtidos para esta colecção de 112 isolados encontram-se registados na Tabela A2 (em Anexo). Os isolados caracterizados como intermédios foram considerados resistentes. Tal como na colecção anterior, também para estes isolados foram observados diferentes perfis de susceptibilidade aos antibióticos- Tabela 16. O antibiograma dos isolados FMV-33, FMV-45, FMV-68, FMV-122 e FMV-127 foi realizado em meio TSA, uma vez que não cresciam em meio MHA.

Quanto à classe dos **β -lactâmicos**, verificou-se que 57 (50,9%) dos 112 isolados apresentaram resistência à cefoxitina.

Tal como para a colecção anterior, o único **macrólido** testado foi a eritromicina, à qual 57 (50,9%) dos 112 isolados eram resistentes. Em relação à classe das **lincosamidas**, 38 (34%) isolados apresentaram resistência à clindamicina, quer seja constitutiva (19 isolados) ou indutível (19 isolados).

Relativamente à classe das **fluoroquinolonas**, 28 (25%) isolados eram resistentes à norfloxacin, 25 (22,3%) apresentaram resistência para a ciprofloxacina e apenas 13 (11,6%) eram resistentes à moxifloxacina.

Quanto aos **aminoglicosídeos**, verificou-se que 29 (25,9%) apresentaram resistência à tobramicina, enquanto 17 (15,2%) dos isolados eram resistentes à gentamicina. Dos isolados com resistência à gentamicina, 16 eram igualmente resistentes à tobramicina e não apresentaram halo de inibição para a canamicina.

Em relação às **tetraciclinas** 26 isolados (23,2%) eram resistentes à tetraciclina, não se detectando resistência à tigeciclina.

Em relação à classe dos **fenicóis**, dois (1,8%) dos isolados apresentaram resistência ao cloranfenicol.

Para os **ácidos pseudomónicos**, apenas um (0,9%) dos isolados era resistente à mupirocina.

Quanto à classe dos **fusidanos**, 51 (45,6%) dos 112 isolados apresentaram resistência ao ácido fusídico.

Em relação à classe das **rifamicinas**, cinco (4,5%) dos isolados testados eram resistentes à rifampicina.

Em relação à classe do **trimetoprim/sulfonamidas**, verificou-se que quatro (3,6%) dos isolados apresentaram resistência ao trimetoprim, dos quais três (2,7%) eram também resistentes ao trimetoprim-sulfametoxazole.

Nesta colecção não foram detectados isolados resistentes à quinopristina/dalfopristina (**estreptograminas**) e à linezolida (**oxazolidinonas**).

Tabela 16. Perfil de susceptibilidade aos antibióticos dos isolados de *S. epidermidis* de colonização em humanos.

Isolado	Antibióticos																	
	FOX	ERY	CLI	CIP	NOR	MXF	GEN	TOB	QDT	TET	TGC	LZD	CHL	FUS	MUP	RIF	TMP	SXT
FMV-22	■													■				
FMV-23	■									■				■				
FMV-24	■			■	■	■												
FMV-25 ^(j)		■						■		■				■				
FMV-26 ^(j)																		
FMV-27 ^(k)	■	■	■		■		■	■		■				■				
FMV-28 ^(k)	■							■						■				
FMV-29																		
FMV-30	■															■		
FMV-31	■	■	■	■	■													
FMV-32 ⁽ⁱ⁾				■	■									■				
FMV-33 ^(i,*)	■		■	■	■		■	■		■				■				
FMV-34								■		■				■				
FMV-35														■				
FMV-36		■																
FMV-37		■												■				
FMV-38														■				
FMV-39		■												■				
FMV-40														■				
FMV-41														■				
FMV-42	■	■	■							■				■				
FMV-45 ^(*)		■	■															
FMV-46															■			
FMV-47		■												■				
FMV-48																		
FMV-49		■												■				
FMV-50 ^(m)		■												■				

□ Susceptível; ■ Resistente; ■ Resistência indutível à clindamicina; (*) valores obtidos em meio TSA; (i, j, k, m): isolados pertencentes ao mesmo indivíduo; FOX: cefoxitina; ERY: eritromicina; CLI: clindamicina; CIP: ciprofloxacina; NOR: norfloxacina; MXF: moxifloxacina; GEN: gentamicina; TOB: tobramicina; QDT: quinopristina/dalfopristina; TET: tetraciclina; TGC: tigeciclina; LZD: linezolida; CHL: cloranfenicol; FUS: ácido fusídico; MUP: mupirocina; RIF: rifampicina; TMP: trimetoprim; SXT: trimetoprim-sulfametoxazole.

Tabela 16. (continuação).

Isolado	Antibióticos																	
	FOX	ERY	CLI	CIP	NOR	MXF	GEN	TOB	QDT	TET	TGC	LZD	CHL	FUS	MUP	RIF	TMP	SXT
FMV-51 ^(m)	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
FMV-52	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
FMV-53	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
FMV-54	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
FMV-55	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
FMV-57	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
FMV-58	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
FMV-59	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
FMV-60	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
FMV-61	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
FMV-62	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
FMV-63	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
FMV-64	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
FMV-65	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
FMV-66	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
FMV-67	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
FMV-68 ^(a,*)	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
FMV-69 ^(a)	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
FMV-70	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
FMV-71 ^(b)	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
FMV-72 ^(b)	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
FMV-73	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
FMV-74	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
FMV-75	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
FMV-76	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
FMV-77	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
FMV-78	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■

□ Susceptível; ■ Resistente; ■ Resistência indutível à clindamicina; (*) valores obtidos em meio TSA; (a, b, m): isolados pertencentes ao mesmo indivíduo; FOX: cefoxitina; ERY: eritromicina; CLI: clindamicina; CIP: ciprofloxacina; NOR: norfloxacina; MXF: moxifloxacina; GEN: gentamicina; TOB: tobramicina; QDT: quinopristina/dalfopristina; TET: tetraciclina; TGC: tigeciclina; LZD: linezolida; CHL: cloranfenicol; FUS: ácido fusídico; MUP: mupirocina; RIF: rifampicina; TMP: trimetoprim; SXT: trimetoprim-sulfametoxazole.

Tabela 16. (continuação).

Isolado	Antibióticos																	
	FOX	ERY	CLI	CIP	NOR	MXF	GEN	TOB	QDT	TET	TGC	LZD	CHL	FUS	MUP	RIF	TMP	SXT
FMV-79	■									■								
FMV-80	■		■											■				
FMV-81	■	■								■				■				
FMV-82																		
FMV-83	■		■	■	■	■												
FMV-84	■	■								■				■				
FMV-85																		
FMV-86																		
FMV-87	■			■	■	■				■				■			■	■
FMV-88	■	■	■		■	■	■			■				■				
FMV-89 ^(c)																		
FMV-90 ^(c)																		
FMV-91 ^(d)	■	■	■															
FMV-92 ^(d)																		
FMV-93	■	■	■	■	■	■				■				■				
FMV-94	■	■	■							■				■				
FMV-96	■	■		■	■	■				■				■				
FMV-97 ^(e)	■	■	■							■				■				
FMV-98 ^(e)																		
FMV-99 ^(f)	■			■	■	■												
FMV-100 ^(f)	■	■	■							■				■				
FMV-101	■	■	■	■	■	■				■				■				
FMV-102	■	■	■															
FMV-103	■															■		
FMV-104	■	■	■	■	■	■				■				■			■	■
FMV-105																		

□ Susceptível; ■ Resistente; ■ Resistência indutível à clindamicina; (c-f): isolados pertencentes ao mesmo indivíduo; FOX: cefoxitina; ERY: eritromicina; CLI: clindamicina; CIP: ciprofloxacina; NOR: norfloxacina; MXF: moxifloxacina; GEN: gentamicina; TOB: tobramicina; QDT: quinopristina/dalfopristina; TET: tetraciclina; TGC: tigeciclina; LZD: linezolida; CHL: cloranfenicol; FUS: ácido fusídico; MUP: mupirocina; RIF: rifampicina; TMP: trimetoprim; SXT: trimetoprim-sulfametoxazole.

Tabela 16. (continuação).

Isolado	Antibióticos																	
	FOX	ERY	CLI	CIP	NOR	MXF	GEN	TOB	QDT	TET	TGC	LZD	CHL	FUS	MUP	RIF	TMP	SXT
FMV-106																		
FMV-107																		
FMV-108																		
FMV-109																		
FMV-110																		
FMV-111																		
FMV-112																		
FMV-113																		
FMV-114																		
FMV-115 ^(l)																		
FMV-116 ^(l)																		
FMV-117																		
FMV-118																		
FMV-119																		
FMV-120																		
FMV-121																		
FMV-122 ^(*)																		
FMV-123 ^(g)																		
FMV-124 ^(g)																		
FMV-125																		
FMV-126																		
FMV-128																		
FMV-127 ^(*)																		
FMV-129																		
FMV-130																		
FMV-131																		

□ Susceptível; ■ Resistente; ▒ Resistência indutível à clindamicina; (*) valores obtidos em meio TSA; (l, g): isolados pertencentes ao mesmo indivíduo; FOX: cefoxitina; ERY: eritromicina; CLI: clindamicina; CIP: ciprofloxacina; NOR: norfloxacina; MXF: moxifloxacina; GEN: gentamicina; TOB: tobramicina; QDT: quinopristina/dalfopristina; TET: tetraciclina; TGC: tigeciclina; LZD: linezolida; CHL: cloranfenicol; FUS: ácido fusídico; MUP: mupirocina; RIF: rifampicina; TMP: trimetoprim; SXT: trimetoprim-sulfametoxazole.

Tabela 16. (continuação).

Isolado	Antibióticos																	
	FOX	ERY	CLI	CIP	NOR	MXF	GEN	TOB	QDT	TET	TGC	LZD	CHL	FUS	MUP	RIF	TMP	SXT
FMV-132	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
FMV-133	■	□	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
FMV-134	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
FMV-135 ^(h)	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
FMV-136 ^(h)	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
FMV-137	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■

□ Susceptível; ■ Resistente; ■ Resistência indutível à clindamicina; (h): isolados pertencentes ao mesmo indivíduo; FOX: cefoxitina; ERY: eritromicina; CLI: clindamicina; CIP: ciprofloxacina; NOR: norfloxacina; MXF: moxifloxacina; GEN: gentamicina; TOB: tobramicina; QDT: quinopristina/dalfopristina; TET: tetraciclina; TGC: tigeciclina; LZD: linezolida; CHL: cloranfenicol; FUS: ácido fusídico; MUP: mupirocina; RIF: rifampicina; TMP: trimetoprim; SXT: trimetoprim-sulfametoxazole.

3.3 Detecção do gene *mecA*

Todos os isolados estudados foram testados para o gene *mecA*, que foi detectado em oito isolados da colecção de infecção em animais de companhia e em 68 isolados da colecção de colonização em humanos. Estes isolados incluem todos os que apresentam resistência à cefoxitina, bem como 11 isolados adicionais da colecção de colonização em humanos, que no teste de difusão em disco, mostraram ser susceptíveis a este antibiótico (FMV-25, FMV-32, FMV-46, FMV-74, FMV-90, FMV-94, FMV-109, FMV-115, FMV-120, FMV-127 e FMV-130) (Tabelas 19 e A2).

3.4 Detecção de actividade de efluxo aumentada

Os isolados das duas colecções foram testados quanto à presença de actividade de efluxo aumentada pelo método de “Cartwheel” e determinação da concentração mínima inibitória de EtBr.

3.4.1 Caracterização das estirpes controlo

O método de “Cartwheel” realiza-se em meio TSA suplementado com EtBr. Este método baseia-se num aumento da fluorescência detectável a olho nu aquando da acumulação de EtBr no interior das células. No caso de as células possuírem sistemas de efluxo com actividade aumentada, o EtBr pode ser extrusado do seu interior, evitando assim a sua acumulação intracelular e, por conseguinte, apresentando menor fluorescência [80].

A estirpe ATCC12228, que apresenta actividade de efluxo residual, foi utilizada como controlo negativo de efluxo. Como controlo positivo, foi utilizada a estirpe ATCC12228_EtBr16, anteriormente adaptada a 16 mg/L de EtBr, e que sobreexpressa o gene *norA* que codifica para a bomba de efluxo NorA (Costa *et al.*, manuscrito em preparação). Após incubação a 37°C, a estirpe ATCC12228 apresentou fluorescência a partir de uma concentração de 0,25 mg/L de EtBr, enquanto a estirpe

ATCC12228_EtBr16 não apresentou fluorescência até à concentração máxima de EtBr testada (1,5 mg/L), confirmando a maior actividade de efluxo desta estirpe (Tabela 17 e Figura 6).

A CMI de EtBr para a estirpe ATCC12228 foi de 0,5 mg/L, enquanto a CMI de EtBr para a estirpe ATCC12228_EtBr16 foi de 16 mg/L (Tabela 17), valores que confirmam o efluxo residual da estirpe ATCC12228 e a maior capacidade de efluxo da estirpe ATCC12228_EtBr16.

Tabela 17. Detecção de actividade de efluxo aumentada para as estirpes controlo.

Estirpe	[EtBr] “Cartwheel” (mg/L)	CMI EtBr (mg/L)
ATCC12228	0,25	0,5
ATCC12228_EtBr16	> 1,5	16

3.4.2 Isolados de *S. epidermidis* de infecção em animais de companhia

Entre os 17 isolados testados pelo método de “Cartwheel”, sete não emitiram fluorescência até à concentração máxima de EtBr testada (1,5 mg/L), apresentando valores de CMI de EtBr entre os 64 mg/L e os 128 mg/L (Tabela 18, página 49). Dois dos 17 isolados começaram a emitir fluorescência a concentrações entre 0,75 e 1 mg/L, apresentando valores de CMI do EtBr entre os 16 e 32 mg/L, enquanto os restantes oito isolados emitiram fluorescência entre 0,25 e 0,5 mg/L de EtBr, apresentando valores de CMI do EtBr entre 1 e 2 mg/L (Tabela 18).

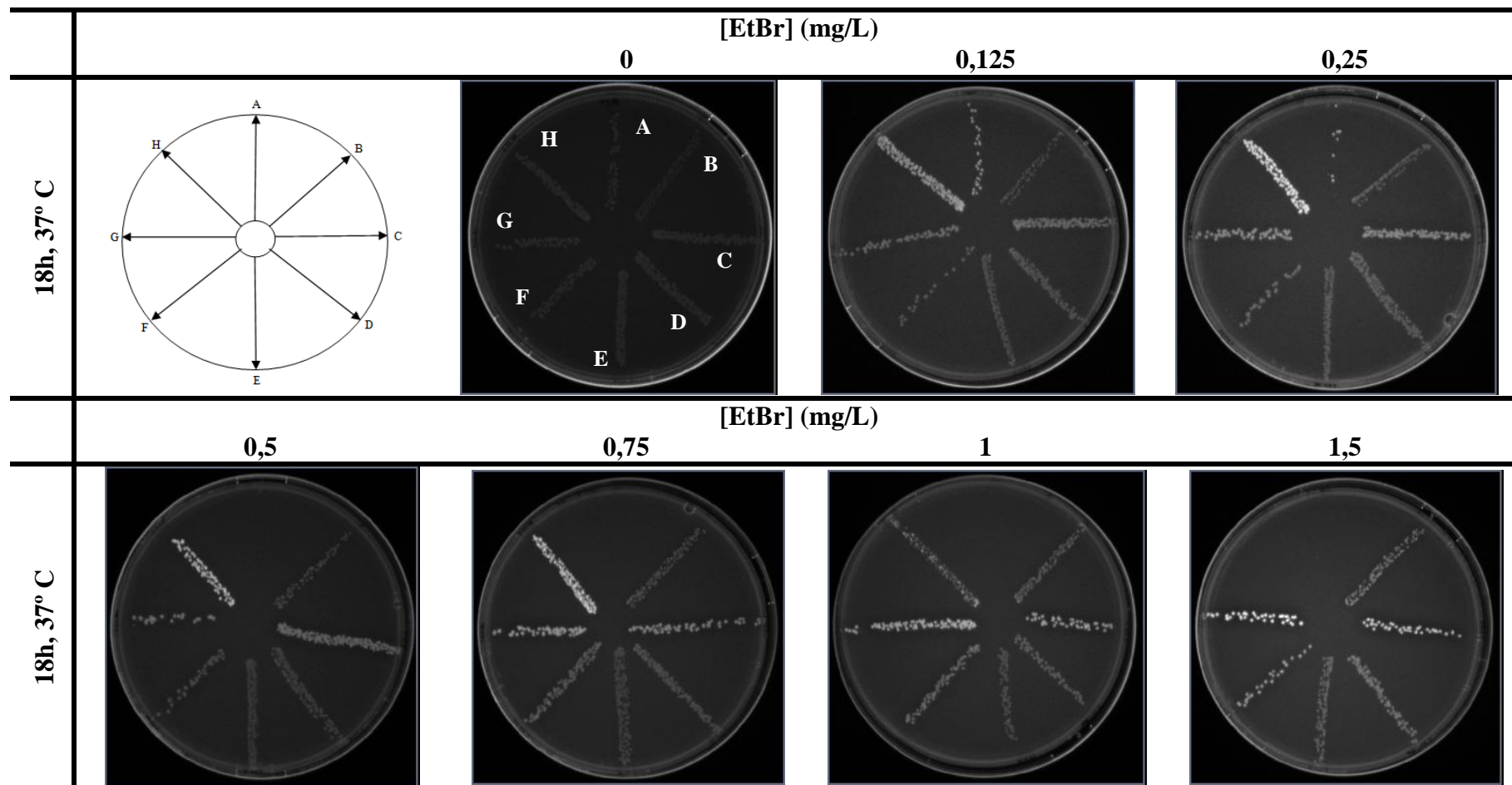


Figura 6. Resultados exemplificativos do método de “Cartwheel”. A: ATCC12228; B: ATCC12228_EtBr16; C: FMV-101; D: FMV-102; E: FMV-103; F: FMV-104; G: FMV-106; H: FMV-109.

3.4.3 Isolados de *S. epidermidis* de colonização em humanos

Dos 112 isolados testados através do método de “Cartwheel”, verificou-se que 35 emitiram fluorescência a 1,5 mg/L de EtBr ou não emitiram fluorescência até esta concentração, apresentando valores de CMI do EtBr entre os 16 e os 128 mg/L (Tabela 19, página 50). Verificou-se ainda que nove isolados emitiram fluorescência a 0,75 e 1 mg/L de EtBr, apresentando valores de CMI do EtBr entre os 16 e os 64 mg/L, enquanto os restantes 68 isolados emitiram fluorescência a 0,25 – 0,5 mg/L de EtBr, apresentando valores de CMI entre os 0,25 e os 8 mg/L de EtBr (Tabela 19).

3.5 Detecção dos genes plasmídicos *qacA/B* e *smr*

3.5.1 Genes *qacA/B*

3.5.1.1 Amplificação dos genes *qacA/B*

A detecção dos genes *qacA/B* foi feita para todos os isolados em estudo das duas colecções. Na colecção de *S. epidermidis* de infecção em animais de companhia foi detectada a presença dos genes *qacA/B* em sete isolados (Tabela 18) e na colecção de colonização em humanos estes genes foram detectados em 36 isolados (Tabela 19) - Figura 7.

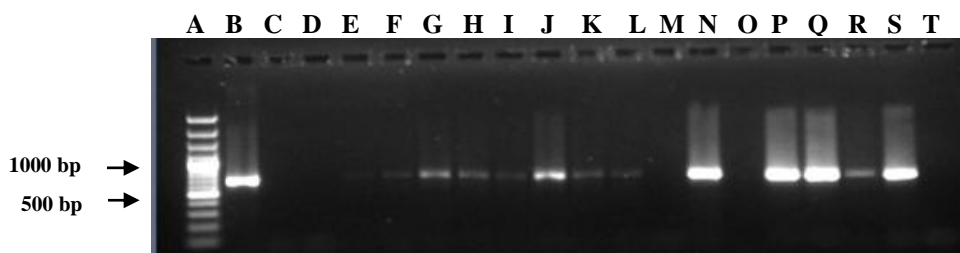


Figura 7. Análise dos produtos de amplificação dos genes *qacA/B* por electroforese em gel de agarose a 1,5% (p/v). A: Marcador GeneRuler 100 bp Plus (Fermentas). **B:** *S. aureus* SM39; **C:** *S. epidermidis* ATCC12228; **D:** Água MiliQ; **E:** FMV-1; **F:** FMV-23; **G:** FMV-87; **H:** FMV-91; **I:** FMV-101; **J:** FMV-118; **K:** FMV-120; **L:** FMV-124; **M:** FMV-125; **N:** FMV-126; **O:** FMV-127; **P:** FMV-129; **Q:** FMV-131; **R:** FMV-132; **S:** FMV-133; **T:** FMV-137.

3.5.1.2 Digestão com *AluI*

Todos os produtos de amplificação dos genes *qacA/B* foram submetidos ao processo de digestão com *AluI* para diferenciação destes dois genes (ver ponto 2.2.6, Materiais e Métodos). Na colecção de infecção em animais de companhia verificou-se que os sete produtos de amplificação correspondiam ao gene *qacA* (Tabela 18), enquanto na colecção de colonização, 35 dos isolados possuíam o gene *qacA* e apenas um (FMV-91) possuía o gene *qacB* (Figura 8, Tabela 19).

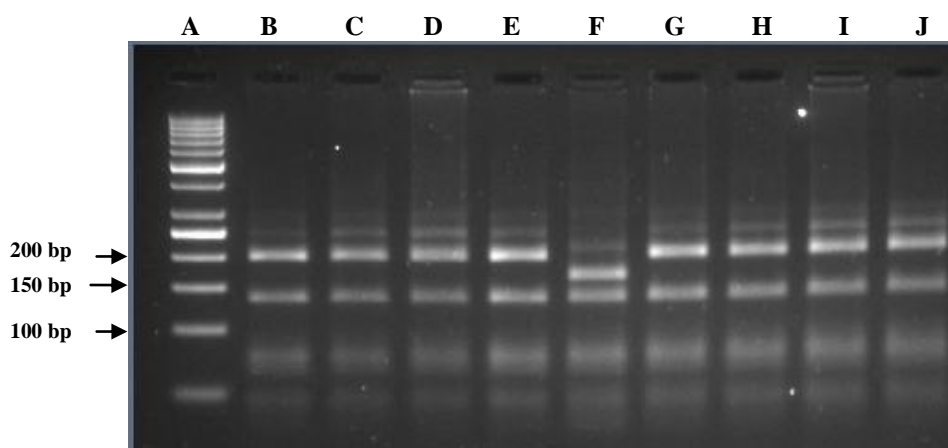


Figura 8. Análise dos produtos de digestão dos fragmentos de amplificação *qacA/B* com *AluI* em gel de agarose Metaphor a 3% (p/v). **A:** Marcador Gene Ruler 50 bp; **B:** *S. aureus* SM39; **C:** FMV-1; **D:** FMV-23; **E:** FMV-87; **F:** FMV-91; **G:** FMV-97; **H:** FMV-101; **I:** FMV-120; **J:** FMV-124.

3.5.2 Gene *smr*

A detecção do gene *smr* foi feita para todos os isolados das duas colecções e foram considerados positivos para a presença do gene *smr*, os produtos de PCR com amplificação de um fragmento de cerca de 285 pb (Figura 9).

Na colecção de infecção em animais de companhia detectou-se a presença do gene *smr* em dois isolados, FMV-2 e FMV-13 (Tabela 18), enquanto nos isolados de colonização em humanos este gene foi detectado em nove isolados: FMV-28, FMV-29, FMV-52, FMV-53, FMV-67, FMV-79, FMV-83, FMV-106 e FMV-137 (Tabela 19).

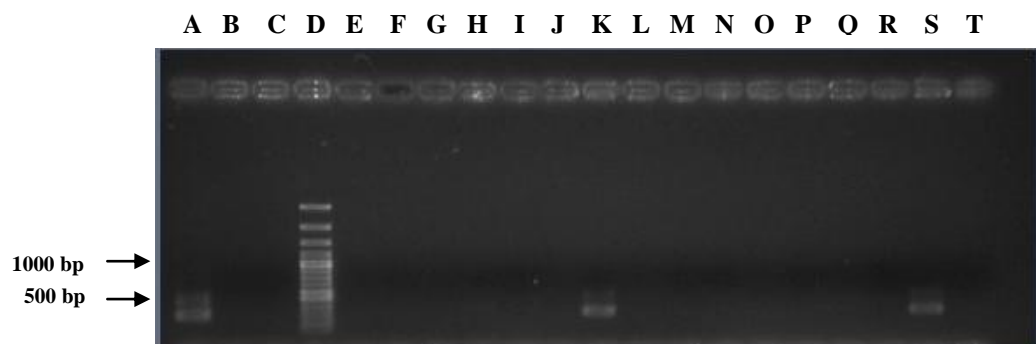


Figura 9. Análise dos produtos de PCR do gene *smr* por electroforese em gel de agarose a 1,5% (p/v). **A:** *S. aureus* SM52; **B:** *S. epidermidis* ATCC12228; **C:** Água MiliQ; **D:** Marcador GeneRuler 100 bp Plus (Fermentas); **E:** FMV-1; **F:** FMV-3; **G:** FMV-5; **H:** FMV-8; **I:** FMV-10; **J:** FMV-11; **K:** FMV-13; **L:** FMV-14; **M:** FMV-15; **N:** FMV-22; **O:** FMV-23; **P:** FMV-24; **Q:** FMV-25; **R:** FMV-27; **S:** FMV-28; **T:** FMV-32.

A Tabela 18 resume os resultados obtidos nos pontos 3.4 e 3.5 deste capítulo para os isolados de *S. epidermidis* de infecção em animais de companhia.

Tabela 18. Detecção de actividade de efluxo aumentada e presença de diferentes genes para isolados de infecção em animais.

Isolado	[EtBr] “Cartwheel” (mg/L)	CMI EtBr (mg/L)	Presença dos genes <i>qacA/B</i> , <i>smr</i>	Presença do gene <i>mecA</i>
FMV-1	> 1,5	64	<i>qacA</i>	-
FMV-2	1	32	<i>smr</i>	-
FMV-3	0,5	1	-	+
FMV-5	0,5	1	-	-
FMV-6	0,25	2	-	+
FMV-8	0,5	1	-	-
FMV-10	0,25	1	-	-
FMV-11	0,5	1	-	-
FMV-12	0,25	2	-	-
FMV-13	0,75	16	<i>smr</i>	-
FMV-14	> 1,5	64	<i>qacA</i>	+
FMV-15	> 1,5	64	<i>qacA</i>	+
FMV-16	> 1,5	128	<i>qacA</i>	+
FMV-17	> 1,5	128	<i>qacA</i>	+
FMV-18	> 1,5	64	<i>qacA</i>	+
FMV-19	> 1,5	64	<i>qacA</i>	-
FMV-20	0,25	2	-	+

(-): Não foi detectada a presença dos genes *qacA/B*, *smr* ou *mecA*. (+): Confirmada a presença do gene *mecA*.

A Tabela 19 resume os resultados obtidos nos pontos 3.4 e 3.5 deste capítulo para os isolados de *S. epidermidis* de colonização em humanos.

Tabela 19. Detecção de actividade de efluxo aumentada e presença de diferentes genes para isolados de colonização em humanos.

Isolado	[EtBr] “Cartwheel” (mg/L)	CMI EtBr (mg/L)	Presença dos genes <i>qacA/B, smr</i>	Presença do gene <i>mecA</i>
FMV – 22	0,25	0,5	-	+
FMV – 23	> 1,5	64	<i>qacA</i>	+
FMV – 24	0,25	1	-	+
FMV – 25 ^(j)	0,25	2	-	+
FMV – 26 ^(j)	0,25	0,5	-	-
FMV – 27 ^(k)	> 1,5	32	<i>qacA</i>	+
FMV – 28 ^(k)	> 1,5	64	<i>qacA, smr</i>	+
FMV – 29	1,5	32	<i>smr</i>	-
FMV – 30	0,25	0,5	-	+
FMV – 31	>1,5	32	<i>qacA</i>	+
FMV – 32 ⁽ⁱ⁾	0,25	2	-	+
FMV – 33 ⁽ⁱ⁾	> 1,5	32	<i>qacA</i>	+
FMV – 34	0,25	2	-	+
FMV – 35	0,25	2	-	-
FMV – 36	0,25	1	-	-
FMV – 37	0,25	1	-	-
FMV – 38	0,5	0,5	-	-
FMV – 39	0,5	1	-	-
FMV – 40	0,5	0,5	-	-
FMV – 41	0,25	0,5	-	-
FMV – 42	0,25	2	-	+
FMV – 45	0,5	1	-	-
FMV – 46	> 1,5	128	<i>qacA</i>	+
FMV – 47	>1,5	64	<i>qacA</i>	-
FMV – 48	0,25	0,5	-	-
FMV – 49	0,5	0,5	-	-
FMV – 50 ^(m)	0,5	4	-	-
FMV – 51 ^(m)	0,25	1	-	+
FMV – 52	> 1,5	32	<i>smr</i>	+
FMV – 53	> 1,5	16	<i>smr</i>	+
FMV – 54	> 1,5	16	<i>qacA</i>	-
FMV – 55	0,5	1	-	-
FMV – 57	0,25	1	-	+
FMV – 58	0,5	2	-	+
FMV – 59	0,25	2	-	-
FMV – 60	> 1,5	128	<i>qacA</i>	+
FMV – 61	0,25	0,5	-	+
FMV – 62	> 1,5	32	<i>qacA</i>	+
FMV – 63	> 1,5	32	<i>qacA</i>	+
FMV – 64	0,25	1	-	+
FMV – 65	0,25	0,5	-	-
FMV – 66	0,5	1	-	+
FMV – 67	> 1,5	16	<i>smr</i>	+
FMV – 68 ^(a)	0,25	0,5	-	+
FMV – 69 ^(a)	0,5	1	-	-
FMV – 70	0,5	4	-	-
FMV – 71 ^(b)	0,25	0,5	-	+

(a, b, i, j, k, m): isolados pertencentes ao mesmo indivíduo; (-): Não foi detectada a presença dos genes *qacA/B, smr* ou *mecA*. (+): Confirmada a presença do gene *mecA*.

Tabela 19. (continuação).

Isolado	[EtBr] “Cartwheel” (mg/L)	CMI EtBr (mg/L)	Presença dos genes <i>qacA/B, smr</i>	Presença do gene <i>mecA</i>
FMV – 72 ^(b)	0,25	0,25	-	-
FMV – 73	0,25	1	-	-
FMV – 74	0,25	2	-	+
FMV – 75	0,25	0,5	-	+
FMV – 76	0,25	4	-	-
FMV – 77	> 1,5	128	<i>qacA</i>	-
FMV – 78	0,25	1	-	+
FMV – 79	1,5	4	<i>smr</i>	+
FMV – 80	0,25	1	-	+
FMV – 81	0,25	2	-	+
FMV – 82	0,5	8	<i>qacA</i>	-
FMV – 83	1,5	32	<i>smr</i>	+
FMV – 84	0,5	1	-	+
FMV – 85	0,5	0,5	-	-
FMV – 86	0,5	0,5	-	-
FMV – 87	> 1,5	32	<i>qacA</i>	+
FMV – 88	> 1,5	32	<i>qacA</i>	+
FMV – 89 ^(c)	0,5	0,5	-	-
FMV – 90 ^(c)	0,5	0,5	-	+
FMV – 91 ^(d)	> 1,5	64	<i>qacB</i>	+
FMV – 92 ^(d)	0,5	2	-	-
FMV – 93	> 1,5	64	<i>qacA</i>	+
FMV – 94	0,5	2	-	+
FMV – 96	0,5	1	-	+
FMV – 97 ^(e)	1,5	128	<i>qacA</i>	+
FMV – 98 ^(e)	0,5	0,5	-	-
FMV – 99 ^(f)	0,25	0,5	-	+
FMV-100 ^(f)	0,5	0,25	-	-
FMV-101	1	32	<i>qacA</i>	+
FMV-102	> 1,5	64	<i>qacA</i>	+
FMV-103	> 1,5	128	<i>qacA</i>	+
FMV-104	> 1,5	128	<i>qacA</i>	+
FMV-105	0,25	0,5	-	-
FMV-106	0,75	32	<i>qacA, smr</i>	-
FMV-107	1,5	64	<i>qacA</i>	-
FMV-108	0,25	0,5	-	-
FMV-109	0,5	1	-	+
FMV-110	0,5	2	-	-
FMV-111	0,25	0,5	-	-
FMV-112	0,5	1	-	-
FMV-113	0,25	0,5	-	-
FMV-114	0,5	1	-	+
FMV-115 ^(l)	1	64	<i>qacA</i>	+
FMV-116 ^(l)	> 1,5	128	<i>qacA</i>	-
FMV-117	0,25	0,5	-	-
FMV-118	1	64	<i>qacA</i>	+
FMV-119	0,25	0,5	-	-
FMV-120	1	64	<i>qacA</i>	+
FMV-121	0,25	0,5	-	+
FMV-122	0,75	32	-	-
FMV-123 ^(g)	0,25	1	-	+

(b – g, l): isolados pertencentes ao mesmo indivíduo; (-): Não foi detectada a presença dos genes *qacA/B*, *smr* ou *mecA*. (+): Confirmada a presença do gene *mecA*.

Tabela 19. (continuação).

Isolado	[EtBr] “Cartwheel” (mg/L)	CMI EtBr (mg/L)	Presença dos genes <i>qacA/B, smr</i>	Presença do gene <i>mecA</i>
FMV-124 ^(g)	0,75	16	<i>qacA</i>	-
FMV-125	0,75	16	-	+
FMV-126	1,5	64	<i>qacA</i>	+
FMV-127	1,5	64	<i>qacA</i>	+
FMV-128	0,25	0,25	-	+
FMV-129	> 1,5	32	<i>qacA</i>	+
FMV-130	0,25	0,5	-	+
FMV-131	> 1,5	64	<i>qacA</i>	+
FMV-132	1,5	32	<i>qacA</i>	+
FMV-133	> 1,5	64	<i>qacA</i>	+
FMV-134	0,25	2	-	+
FMV-135 ^(h)	1	64	<i>qacA</i>	+
FMV-136 ^(h)	0,25	0,5	-	-
FMV-137	1,5	32	<i>smr</i>	+

(g, h): isolados pertencentes ao mesmo indivíduo; (-): Não foi detectada a presença dos genes *qacA/B, smr* ou *mecA*. (+): Confirmada a presença do gene *mecA*.

3.6 Caracterização da actividade de efluxo por fluorometria em tempo-real

3.6.1 Estirpe controlo *S. epidermidis* ATCC12228

- **Ensaio de acumulação**

O primeiro ensaio realizado por fluorometria em tempo-real foi o ensaio de acumulação de EtBr na presença de concentrações crescentes deste composto na presença/ ausência de glucose para a estirpe de referência ATCC12228. Como referido no ponto 2.2.8 (Materiais e Métodos), este ensaio foi realizado a fim de avaliar o perfil de acumulação de EtBr das células bacterianas e determinar a concentração de EtBr para a qual o influxo e o efluxo deste composto estão em equilíbrio.

Neste ensaio, verificou-se que quanto maior a concentração de EtBr, maior a fluorescência detectada, indicando assim que houve acumulação de EtBr no interior das células bacterianas. A adição de glucose a 0,4%, fonte de energia, originou um aumento de fluorescência a todas as concentrações testadas, indicando uma maior acumulação de EtBr (Figura 10). Estes resultados indicam que a estirpe ATCC12228 possui actividade de efluxo residual. A concentração de equilíbrio de EtBr para esta estirpe foi de 0,25 mg/L (Figura 10).

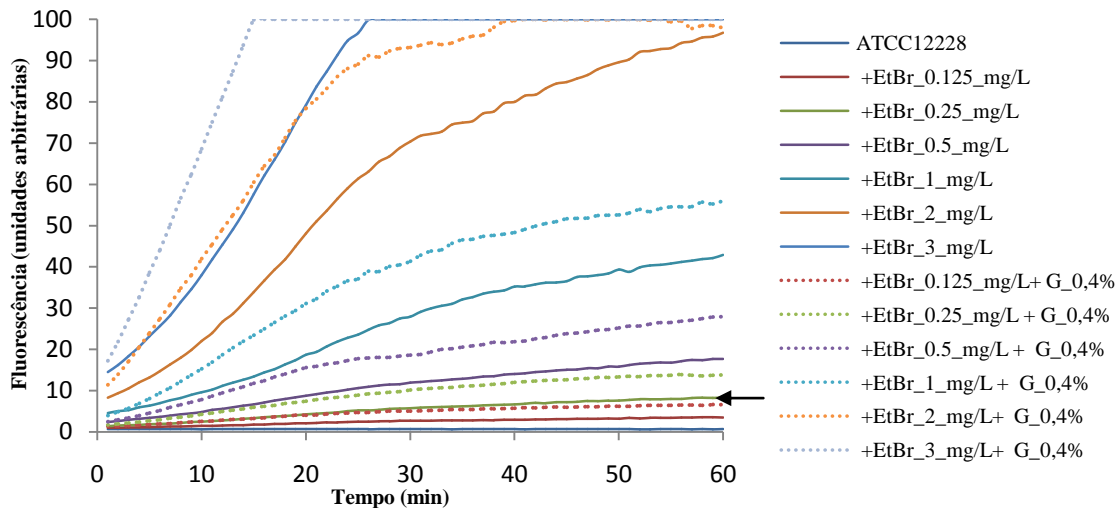


Figura 10. Ensaio de acumulação na presença de concentrações crescentes de EtBr para a estirpe ATCC12228. A seta indica a concentração de equilíbrio do EtBr para a estirpe ATCC12228; 0,25 mg/L; G: Glucose.

• **Ensaio de efluxo**

O ensaio de efluxo foi realizado para a estirpe ATCC12228 para verificar qual a actividade de efluxo das células bacterianas, após um primeiro passo de acumulação de EtBr, na presença de VER, um conhecido inibidor de efluxo em *S. aureus* [25, 29].

Através da Figura 11 verifica-se que a estirpe ATCC12228 não apresentou uma actividade de efluxo significativa, uma vez que, mesmo na presença de glucose, não se observou decréscimo da fluorescência ao longo do tempo, corroborando assim a presença de actividade de efluxo basal para esta estirpe.

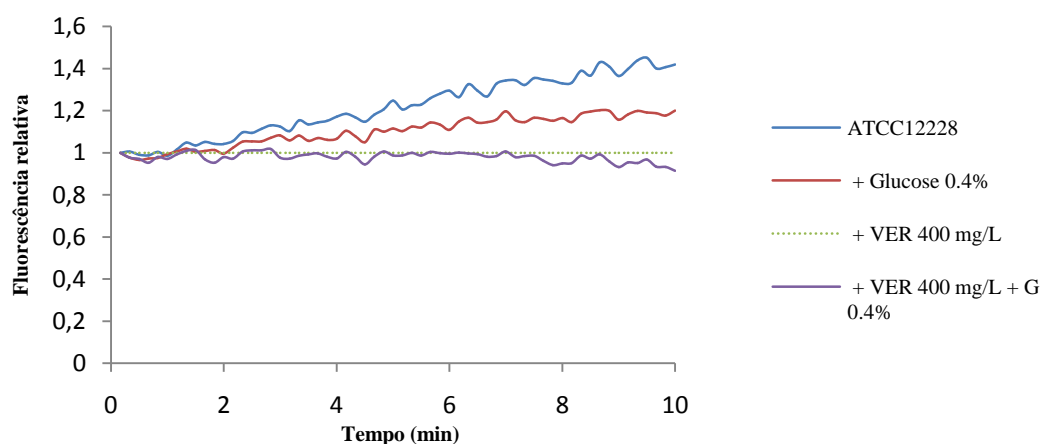


Figura 11. Ensaio de efluxo de EtBr para estirpe ATCC12228. G: Glucose; VER: Verapamil.

3.6.2 Isolados de *S. epidermidis* de infecção em animais de companhia

Dos 17 isolados que constituem esta colecção foram seleccionados para caracterização de actividade de efluxo os seguintes isolados: FMV-12 (*qacA/B*⁻ e *smr*⁻); FMV-13 (*smr*⁺); FMV-16, FMV-17, FMV-18 e FMV-19 (*qacA*⁺).

- **Ensaio de acumulação**

O isolado FMV-12 (*qacA/B*⁻ e *smr*⁻) apresentou um comportamento semelhante ao da estirpe ATCC12228 nos ensaios de acumulação, tanto na ausência como na presença de glucose a 0,4% (Figura 12). Como tal, este isolado apresentou uma actividade de efluxo residual, sendo a sua concentração de equilíbrio de 0,25 mg/L.

O isolado FMV-13 (*smr*⁺) apresentou um comportamento distinto, não se verificando um aumento tão acentuado da fluorescência, sendo a concentração de equilíbrio de EtBr de 0,5 mg/L (Figura 12). Na presença de glucose, verificou-se um decréscimo de fluorescência, e por conseguinte, de acumulação intracelular de EtBr (Figura 12). Estes resultados sugerem que o isolado FMV-13 (*smr*⁺) possui uma actividade de efluxo aumentada.

Os isolados FMV-16, FMV-17, FMV-18 e FMV-19 (*qacA*⁺) apresentaram comportamentos diferentes, tanto em relação à estirpe ATCC12228, como entre eles. Nestes isolados, a concentração de equilíbrio de EtBr foi de 0,5 mg/L (Figura 12). No entanto, os isolados FMV-16 e FMV-19 apresentaram um aumento da fluorescência a partir de 2 mg/L de EtBr, comparativamente com os isolados FMV-17 e FMV-18, em que este aumento não se verifica (Figura 12). Tal como no isolado FMV-13 (*smr*⁺), na presença de glucose 0,4% verificou-se um decréscimo de fluorescência, e por conseguinte, de acumulação intracelular de EtBr (Figura 12). Estes resultados sugerem que os isolados FMV-16, FMV-17, FMV-18 e FMV-19 (*qacA*⁺) possuem uma actividade de efluxo aumentada.

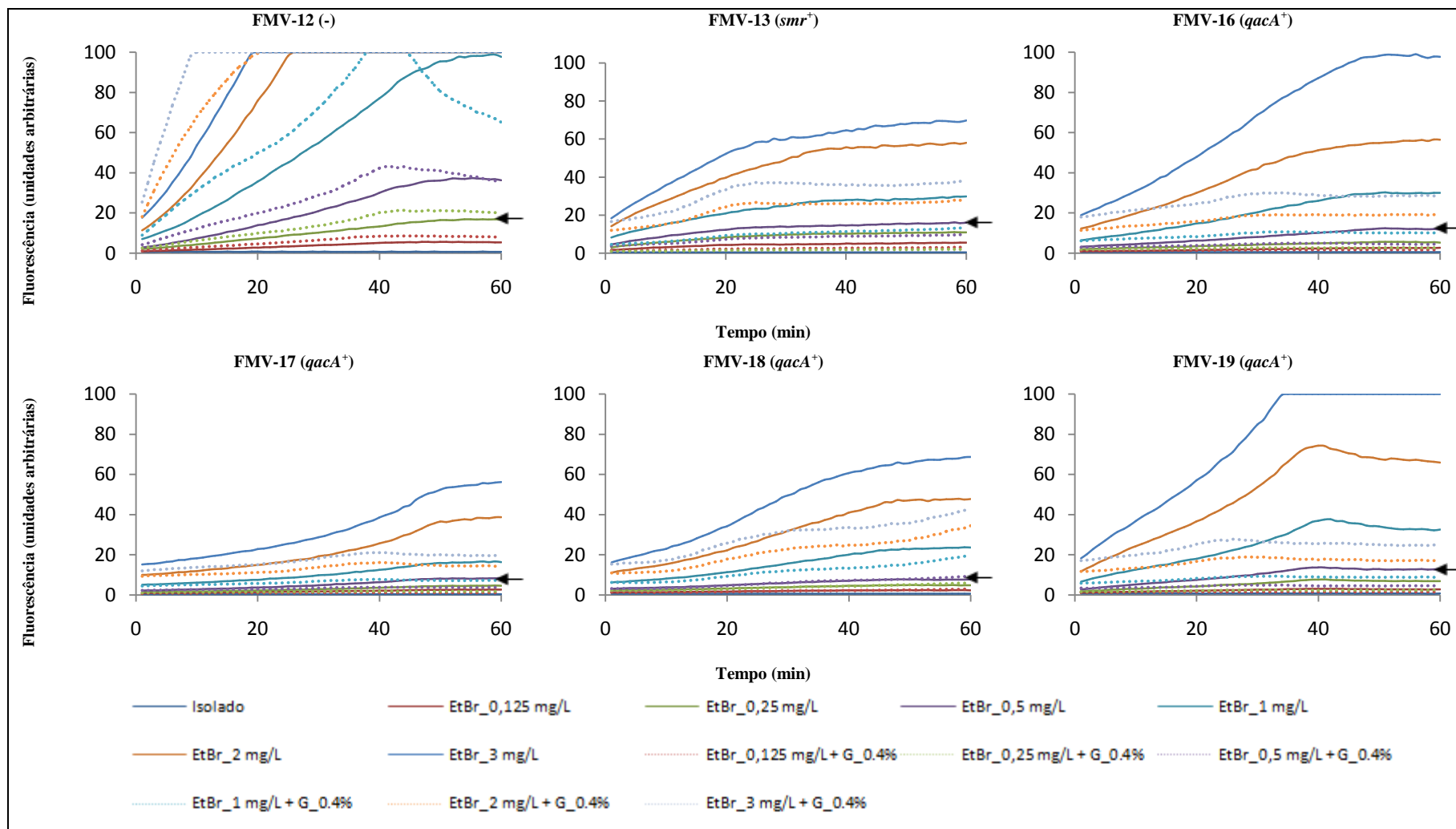


Figura 12. Ensaios de acumulação na presença de concentrações crescentes de EtBr de *S. epidermidis* isolados de infecção em animais. As setas indicam a concentração de equilíbrio do EtBr para os isolados em estudo: FMV-12: 0,25 mg/L; FMV-13, FMV-16, FMV-17, FMV-18 e FMV-19: 0,5 mg/L.

Resumindo, a estirpe ATCC12228 e o isolado FMV-12 apresentaram uma actividade de efluxo residual, enquanto os isolados FMV-13, FMV-16, FMV-17, FMV-18 e FMV-19 apresentaram uma actividade de efluxo aumentada.

- **Ensaio de efluxo**

A actividade de efluxo dos isolados seleccionados foi de seguida avaliada através de ensaios de efluxo de EtBr, que permitem detectar a extrusão deste composto das células bacterianas em tempo-real (Figura 13). Estes ensaios são efectuados após incubação em condições que promovem a acumulação de EtBr no interior das células (concentração de equilíbrio de EtBr e VER).

O isolado FMV-12 (*qacA/B*⁻ e *smr*⁻) apresentou o mesmo comportamento que a estirpe de referência, isto é, uma actividade de efluxo residual (Figura 13).

Os isolados FMV-13, FMV-16, FMV-17, FMV-18 e FMV-19 demonstraram um comportamento distinto do da estirpe ATCC12228 e do isolado FMV-12, apresentando uma actividade de efluxo aumentada (Figura 13). Verificou-se ainda que os isolados com o sistema de efluxo QacA têm uma actividade de efluxo superior ao isolado com o sistema de efluxo Smr (FMV-13). No entanto, os isolados FMV-16, FMV-17, FMV-18 e FMV-19 (*qacA*⁺) apresentaram um comportamento diferente entre si (Figura 13), verificando-se que o isolado FMV-19 possui uma actividade de efluxo superior à dos restantes isolados com QacA, na presença de glucose.

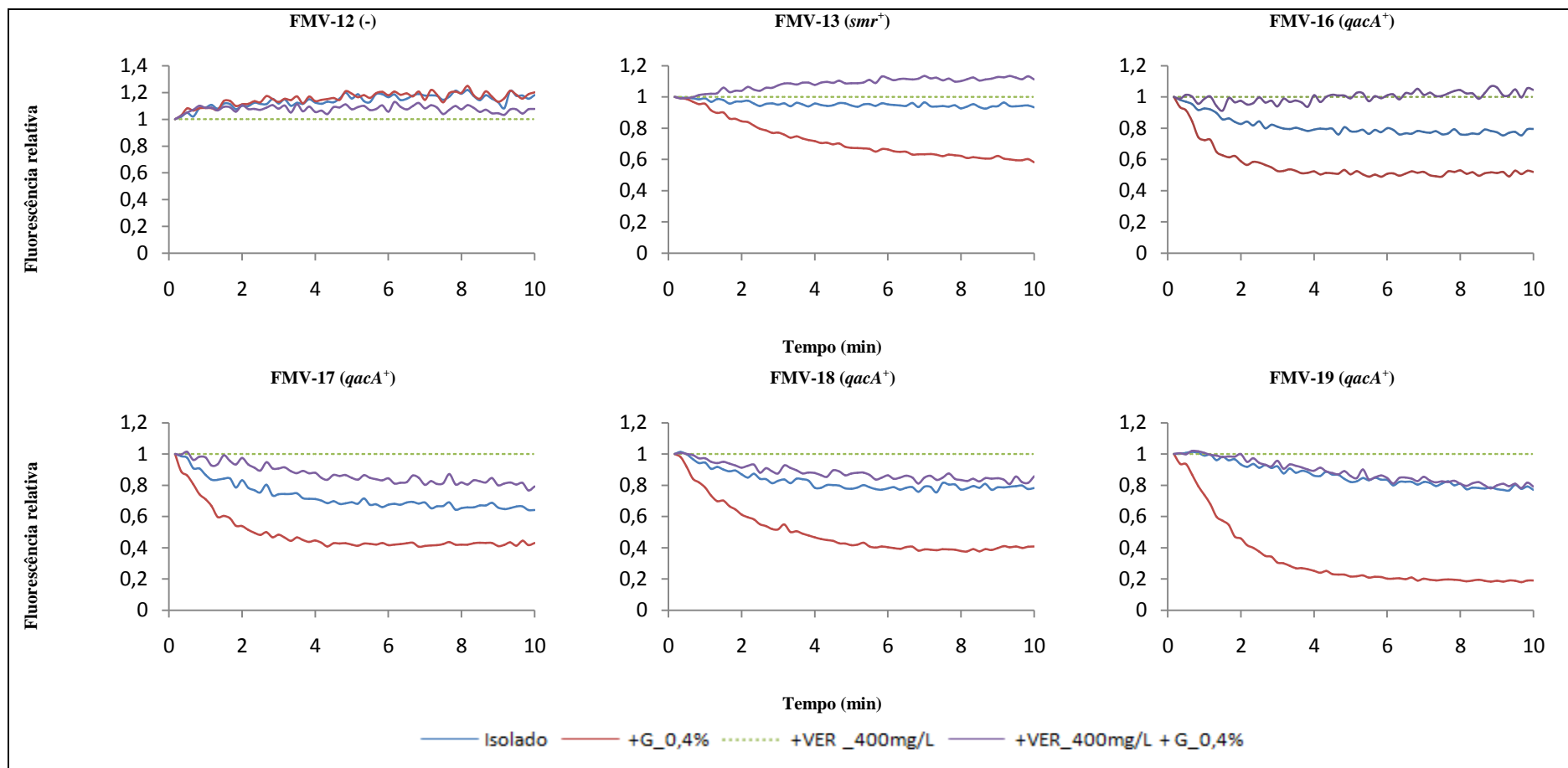


Figura 13. Ensaio de efluxo de *S. epidermidis* isolados de infecção em animais. G: Glucose; VER: Verapamil. Condição de efluxo máximo: presença de glucose.

3.6.3 Isolados de *S. epidermidis* de colonização em humanos

Dos 112 isolados que constituem esta colecção foram seleccionados para caracterização de actividade de efluxo os seguintes isolados: FMV-36 (*qacA/B*⁻ e *smr*⁻); FMV-28 (*qacA*⁺ e *smr*⁺); FMV-60 (*qacA*⁺); FMV-91 (*qacB*⁺); FMV-137 (*smr*⁺).

- **Ensaio de acumulação**

O isolado FMV-36 apresentou um comportamento semelhante ao da estirpe ATCC12228 tanto na ausência como na presença de glucose a 0,4% (Figura 14). Como tal, este isolado apresenta uma actividade de efluxo residual, sendo a sua concentração de equilíbrio de 0,25 mg/L de EtBr (Figura 14).

Os isolados FMV-28 (*qacA*⁺ e *smr*⁺), FMV-60 (*qacA*⁺) e FMV-91 (*qacB*⁺) apresentaram comportamentos diferentes em relação à estirpe ATCC12228. Para estes isolados, observou-se uma fraca acumulação de EtBr ao longo do ensaio, sendo atingidos valores de fluorescência muito baixos à maior concentração de EtBr testada (3 mg/L), indicando uma actividade de efluxo significativa. A concentração de equilíbrio para estes isolados foi de 1 mg/L (Figura 14).

No isolado FMV-137 (*smr*⁺), a acumulação de EtBr foi ligeiramente superior à dos restantes isolados (*qacA/B*⁺) sendo a concentração de equilíbrio de EtBr de 0,5 mg/L (Figura 14). Na presença de glucose, todos os isolados à excepção de FMV-36, apresentaram uma redução na acumulação de EtBr.

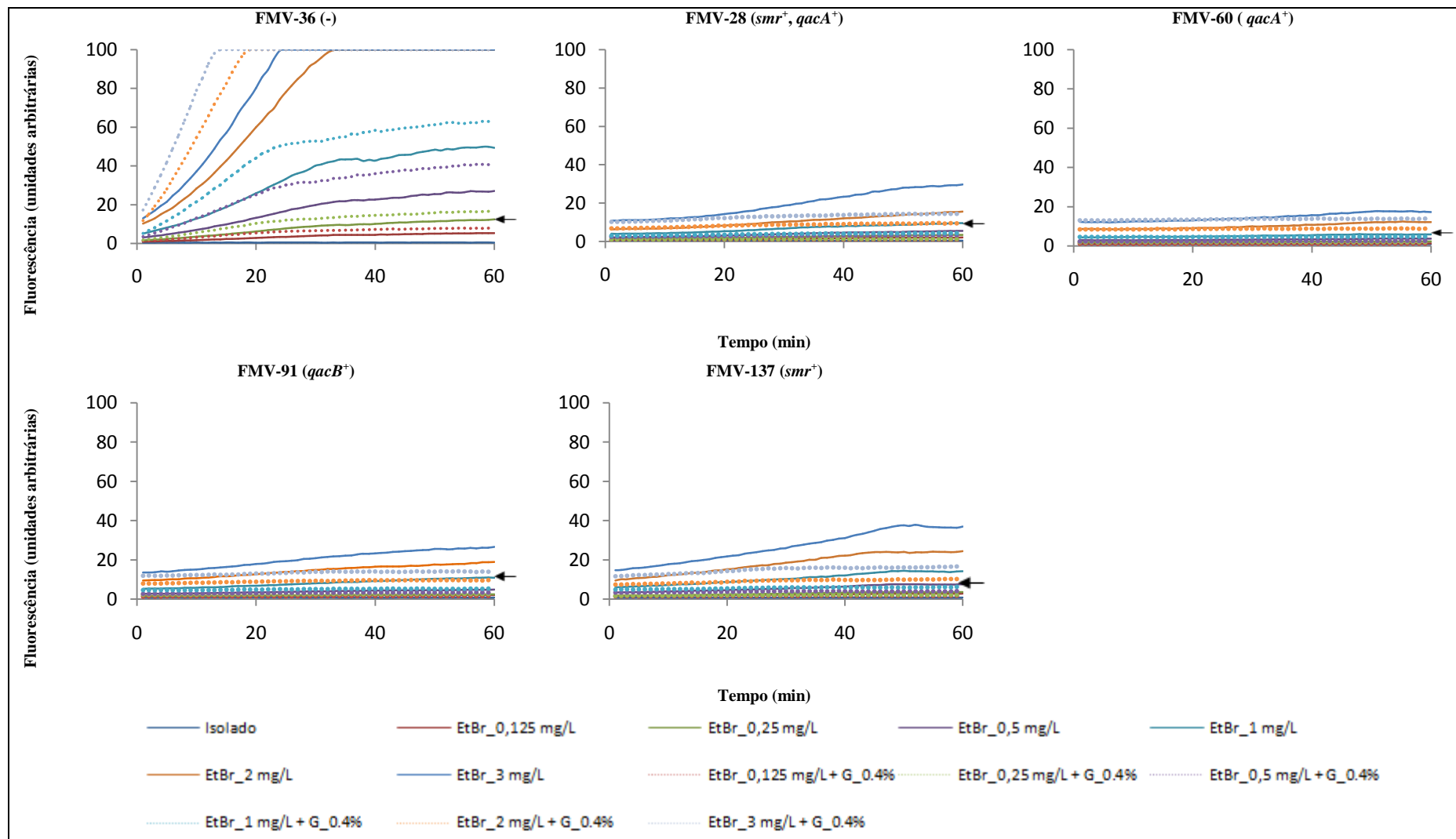


Figura 14. Ensaios de acumulação na presença de concentrações crescentes de EtBr de *S. epidermidis* isolados de colonização em humanos. As setas indicam a concentração de equilíbrio do EtBr para os isolados em estudo: FMV-36:0,25 mg/L; FMV-28, FMV-60 e FMV-91:1 mg/L; FMV-137:0,5 mg/L. G: Glucose.

- **Ensaio de efluxo**

Como no ensaio de acumulação, o isolado FMV-36 (*qacA/B*⁻ e *smr*⁻) apresentou um comportamento semelhante à estirpe de referência ATCC12228, exibindo actividade de efluxo residual (Figura 15).

Os isolados FMV-60 (*qacA*⁺), FMV-91 (*qacB*⁺) e FMV-137 (*smr*⁺) possuem actividade de efluxo detectável, observando-se uma perda de fluorescência nos primeiros minutos de ensaio (Figura 15). Destes isolados, verificou-se que o isolado FVM-137 apresentou uma maior actividade de efluxo.

Para o isolado FMV-28 (*qacA*⁺ e *smr*⁺), não se observou actividade de efluxo significativa (Figura 15). Este resultado não era o esperado, uma vez que este isolado possui simultaneamente os genes *qacA* e *smr*.

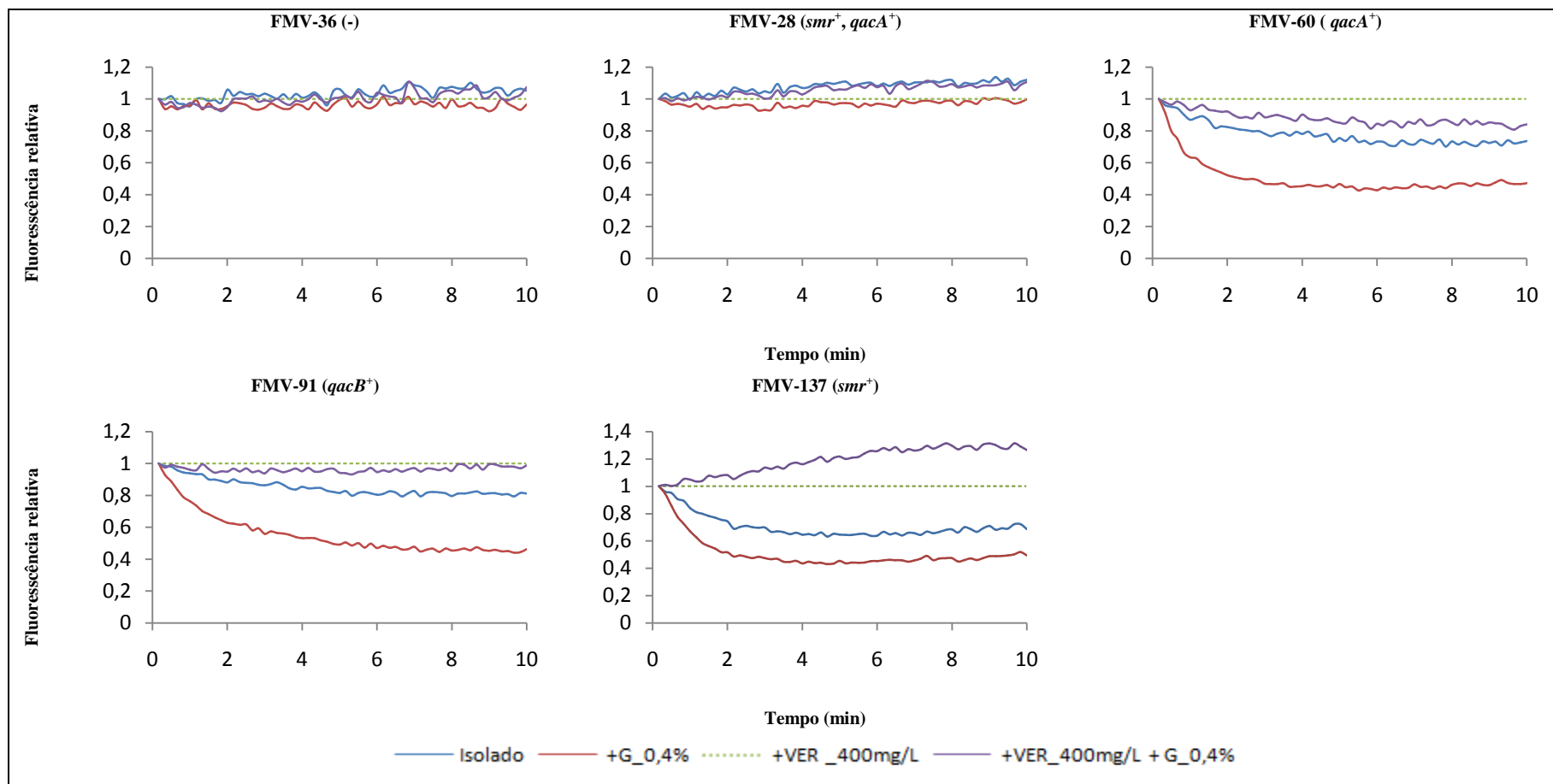


Figura 15. Ensaio de efluxo de *S. epidermidis* isolados de colonização em humanos. G: Glucose; VER: Verapamil. Condição de efluxo máximo: presença de glucose.

4 Discussão e Conclusões

As bactérias da espécie *S. epidermidis* colonizam a pele e mucosas tanto de seres humanos como de animais, estando associadas a infecções oportunistas em indivíduos e animais imunocomprometidos ou que tenham sido sujeitos a algum procedimento cirúrgico que envolva o uso de catéteres, implantes prostéticos ou outros dispositivos médicos [8, 39, 140]. Em animais de companhia, estas bactérias são agentes de infecções do aparelho auditivo ou do tracto urinário, podendo ainda causar infecções cutâneas [8, 95]. Para além do potencial patogénico, *S. epidermidis* e outros estafilococos não produtores de coagulase têm sido, cada vez mais, considerados reservatórios de genes de resistência, particularmente estirpes que colonizam animais de companhia, de produção ou mesmo animais selvagens [37, 75, 132]. Foram já identificados em *S. epidermidis* vários genes que conferem resistência a classes específicas de antibióticos, por exemplo tetraciclinas (*tet(K)* e *tet(L)*); aminoglicosídeos, como gentamicina, canamicina e tobramicina (*aacA-aphD*); macrólidos (*mph(C)*); lincosamidas (*lnu(A)*) [132, 133] ou ácido fusídico (*fusB* e *fusC*) [17,18]. Para além destes, foram descritos para *S. epidermidis* e outros estafilococos, outros genes que codificam para bombas de efluxo, nativas ou codificadas em plasmídeos, como é o caso de QacA/B, Smr, QacG, QacH, QacJ, FexA, entre outras [109, 118, 132], capazes de conferir resistência a uma ou várias classes de antibióticos e/ou a outros compostos antimicrobianos. Os sistemas de efluxo codificados em plasmídeos tornam-se particularmente importantes no contexto da resistência aos compostos antimicrobianos, uma vez que estes plasmídeos podem ser transferidos intra- ou inter-espécies, podendo transportar também outros determinantes de resistência e/ou de virulência [9, 115].

Nos últimos anos, vários estudos têm demonstrado uma elevada prevalência dos sistemas de efluxo QacA/B em isolados de *Staphylococcus* spp. [7, 28, 118]. Um destes estudos, realizado na Unidade de Cuidados Intensivos do Hospital de Aberdeen, Reino Unido, demonstrou uma maior prevalência dos sistemas QacA/B em *S. epidermidis* em comparação com isolados de *S. aureus* [56]. Este e outros estudos demonstraram também que a presença destes sistemas de efluxo está relacionada com fenótipos de multirresistência (MDR) em *S. epidermidis*, estando também associada a uma

diminuição de susceptibilidade para alguns biocidas, nomeadamente para a clorhexidina [56, 109].

Neste trabalho foram estudadas duas colecções de *S. epidermidis*, uma de isolados recolhidos de locais de infecção em animais de companhia, nomeadamente cães e gatos; e uma colecção de isolados de colonização nasal em profissionais e estudantes de Medicina Veterinária. Embora se saiba que os animais de companhia são reservatórios de bactérias resistentes a compostos antimicrobianos [37, 116] e que tanto os animais, como os próprios profissionais de veterinária são bastante expostos a estes compostos, [41, 116], são ainda relativamente escassos os estudos que exploram a relação entre a resistência em estafilococos isolados de animais ou de humanos em contacto próximo com estes e a presença/ausência de determinantes de efluxo. Assim, neste trabalho pretendeu-se determinar o perfil de susceptibilidade aos antibióticos destas duas colecções de *S. epidermidis*, estudar a presença de genes que codificam para as bombas de efluxo plasmídicas QacA/B e Smr e relacionar a presença destes genes com a capacidade de efluxo das estirpes em estudo e o seu perfil de resistência aos antibióticos.

4.1 Perfil de resistência a antibióticos dos isolados de *S. epidermidis*

O perfil de susceptibilidade aos antibióticos das duas colecções de isolados foi testado para 14 classes de antibióticos (Tabela 12 – Materiais e Métodos).

Na colecção de *S. epidermidis* provenientes de locais de infecção em animais de companhia verificou-se uma elevada frequência de resistência aos antibióticos β -lactâmicos, macrólidos, tetraciclinas, ácido fusídico e às fluoroquinolonas, enquanto na colecção de *S. epidermidis* de colonização em profissionais e estudantes de veterinária se verificou uma elevada prevalência de resistência aos β -lactâmicos, macrólidos, ácido fusídico, aminoglicosídeos e fluoroquinolonas - Tabela 20.

Tabela 20. Frequência de resistência dos isolados de *S. epidermidis* de infecção em animais de e de colonização em humanos.

Classe	Antibiótico	Número de isolados resistentes (%)	
		Isolados de infecção em animais (n=17)	Isolados de colonização em humanos (n=112)
β-lactâmicos	FOX	8 (47,1%)	57 (50,9%)
Macrólidos	ERY	8 (47,1%)	57 (50,9%)
Tetraciclina	TET	7 (41,2%)	26 (23,2%)
Fusidano	FUS	7 (41,2%)	51 (45,5%)
Fluoroquinolonas	NOR	6 (35,3%)	28 (25%)
	CIP	4 (23,5%)	25 (22,3%)
	MXF	1 (5,9%)	13 (11,6%)
Aminoglicosídeos	TOB	4 (23,5%)	29 (25,9%)
	GEN	3 (17,6%)	17 (15,2%)
Lincosamidas	CLI¹	4 (23,5%)	19 (17%)
	CLI	-	19 (17%)
Trimetoprim/Sulfonamidas	TMP	2 (11,8%)	4 (3,6%)
	SXT	2 (11,8%)	3 (2,7%)
Rifamicinas	RIF	-	5 (4,5%)
Fenicóis	CHL	-	2 (1,8%)
Ácidos pseudomónicos	MUP	1 (5,9%)	1 (0,9%)

(-): Os isolados não apresentaram resistência para o antibiótico em estudo. FOX: cefoxitina; ERY: eritomicina; TET: tetraciclina; FUS: ácido fusídico; NOR: norfloxacin; CIP: ciprofloxacina; MXF: moxifloxacina; TOB: tobramicina; GEN: gentamicina; CLI¹: Resistência indutível à clindamicina; CLI: clindamicina; TMP: trimetoprim; SXT: trimetoprim-sulfametoxazole; RIF: rifampicina; CHL: cloranfenicol; MUP: mupirocina.

As duas colecções de *S. epidermidis* estudadas nesta Dissertação incluíam um número significativo de estirpes resistentes aos β -lactâmicos, em resultado de estudos anteriores no âmbito dos quais foram recolhidas. Assim, enquanto a primeira colecção consistia em *S. epidermidis* recolhidos de locais de infecção em cães e gatos [37], eventualmente sujeitos a pressão selectiva por terapêutica prévia, os isolados de *S. epidermidis* da colecção de colonização foram previamente recolhidos por colegas da Faculdade de Medicina Veterinária no âmbito do primeiro estudo realizado em Portugal com o objectivo de avaliar a prevalência de colonização por estafilococos resistentes à meticilina em indivíduos com contacto próximo de animais, nomeadamente médicos veterinários, enfermeiros, auxiliares e estudantes de Medicina Veterinária [111].

Num estudo realizado com *Staphylococcus* provenientes de animais de companhia internados numa clínica veterinária (10 isolados), de zangãos do ambiente da clínica (58 isolados) e de profissionais veterinários dessa mesma clínica (4 isolados), verificou-

se que *S. epidermidis* era o estafilococo mais comum, observando-se ainda a elevada frequência de estirpes MRSE, correspondendo a quatro isolados de infecção, 14 isolados do ambiente e três isolados de colonização em profissionais veterinários [131]. Um estudo recentemente realizado com *Staphylococcus* provenientes de colonização de animais e habitantes de uma quinta na Áustria [76], detectou uma estirpe MRSE em 15 estafilococos não produtores de coagulase resistentes à meticilina [76]. Um outro estudo, focado em *S. epidermidis* provenientes de colonização de animais de produção e agricultores, demonstrou que a colonização por MRSE era de 67% nos animais e de 51% nos trabalhadores das explorações estudadas [5]. Finalmente, um outro estudo sobre a prevalência de MRSE como agente de infecção em animais de companhia (um gato, um cavalo e dez cães) verificou que 11 dos 12 *S. epidermidis* isolados correspondiam a MRSE [84].

Num outro estudo realizado num hospital da China com três grupos de indivíduos (120 doentes, 150 profissionais de saúde – médicos/enfermeiros - e 250 indivíduos da comunidade), observou-se que dos 150 profissionais de saúde, 92 estavam colonizados por *S. epidermidis*, 45 dos quais (48,9%) MRSE [40]. Entre os 250 indivíduos da comunidade, 112 estavam colonizados por *S. epidermidis*, 43 (38,4%) dos quais correspondiam a MRSE [40]. Um estudo anterior, realizado na Faculdade de Medicina de Kitakyushu, no Japão, isolou 213 *Staphylococcus* spp. em 90 estudantes, dos quais 139 correspondiam a *S. epidermidis*, entre os quais 59 MRSE [88].

No presente estudo, a resistência aos β -lactâmicos foi analisada pelo método de difusão em disco e pesquisa do gene *mecA*, tendo-se detectado discrepâncias entre a presença deste gene e a resistência fenotípica à cefoxitina para 11 isolados de colonização (Tabelas 16 e 19).

Segundo as recomendações EUCAST, os halos de inibição devem ser lidos após um período de incubação de 18 horas, enquanto as recomendações do “Clinical and Laboratory Standards Institute” (CLSI) ditam uma extensão deste período para as 24 horas de incubação [23]. Deste modo, as leituras dos halos de inibição da cefoxitina foram realizadas após as 18 e as 24 horas de incubação, tendo-se verificado que em alguns casos, a extensão do período de incubação era de facto importante para detectar

fenotipicamente a resistência à cefoxitina. No entanto, para os 11 isolados referidos, o halo de inibição mantinha-se superior a 24 mm, valor limite estabelecido para a susceptibilidade à cefoxitina em *S. epidermidis* nas normas EUCAST 2016. Na realidade, os halos de inibição para a cefoxitina destes isolados variavam entre 25 e 32 mm (Tabela A2). No entanto, a actualização já em 2017 das normas EUCAST reconsidera este valor, estabelecendo como novo limite para susceptibilidade, um halo igual ou superior a 28 mm [44]. Se considerarmos este novo valor, cinco destes isolados seriam categorizados como fenotipicamente resistentes, o que é um bom indicador da necessidade desta actualização. Os restantes 6 isolados, apesar de possuírem o gene *mecA*, continuam a ser fenotipicamente classificados como MSSE. No entanto, estes apresentaram halos de inibição díspares, realçando-se que no caso de FMV-127 este halo (32 mm) foi determinado em TSA, o que implica alguma cautela na sua interpretação e que o isolado FMV-130 não apresentava halo de inibição para a oxacilina (Tabela A2).

No âmbito da comparação entre métodos genotípicos e fenotípicos na determinação da resistência à metilina em estafilococos não produtores de coagulase, Palazzo e Darini realizaram um estudo envolvendo 151 isolados, a maioria dos quais (99 isolados) *S. epidermidis* [97]. A resistência à metilina foi testada pela determinação da presença do gene *mecA* e pelo método de difusão em disco para a cefoxitina e para a oxacilina [97]. Dos 99 *S. epidermidis*, 5 isolados, apesar de possuírem o gene *mecA*, eram susceptíveis tanto à cefoxitina como à oxacilina, verificando-se assim uma discrepância [97], tal como no nosso trabalho. Esta discrepância entre os resultados fenotípicos e a presença do gene *mecA* pode ser justificada pela expressão variável deste gene [45, 112].

Embora vários estudos tenham demonstrado que a cefoxitina é um bom marcador de susceptibilidade para a classe dos β -lactâmicos em *Staphylococcus* spp. [3, 58, 108], o conjunto dos nossos resultados indica a necessidade de algum cuidado na utilização do teste de susceptibilidade como único indicador de resistência aos β -lactâmicos em *S. epidermidis*, mesmo que a utilização de disco de antibiótico seja considerado mais fiável que a determinação de CMI [43, 44]. Assim, a pesquisa do gene *mecA* será o método mais fiável para a detecção de estirpes MRSE.

Ainda em relação aos β -lactâmicos, existe uma elevada percentagem de isolados MSSE com halos de inibição para a penicilina e para a ampicilina abaixo dos 26 mm (valor anteriormente considerado para definição de resistência, EUCAST 2012), o que sugere a produção de β -lactamases nestes isolados.

O método de difusão em disco foi realizado em meio MHA, como recomendado pela EUCAST [43] e pela CLSI [23], com excepção de seis isolados (um de infecção e cinco de colonização), em que este teste foi realizado em meio TSA, uma vez que estes isolados não cresciam em MHA. Embora não tenham sido encontrados relatos na literatura sobre a ausência de crescimento de *S. epidermidis* em meio MHA, uma possível explicação para esta observação será a necessidade de alguns nutrientes específicos, para o crescimento desses isolados, ausentes em MHA. De facto, relativamente ao meio MHA, TSA tem na sua composição cloreto de sódio, que tem como função manter o equilíbrio osmótico e triptona, uma fonte de nitrogénio orgânico, tornando-o um meio altamente nutritivo [62].

Para além da resistência aos β -lactâmicos, verificou-se também elevada prevalência de resistência aos macrólidos (eritromicina) e ao ácido fusídico, nas duas colecções de isolados. Relativamente a *S. epidermidis* relacionados com infecções em animais de companhia, McManus e colegas determinaram a prevalência de resistência a diferentes antibióticos em animais internados num hospital veterinário [84], verificando uma elevada frequência de resistência, nomeadamente ao ácido fusídico, fluoroquinolonas e rifampicina [84]. Vários outros estudos realizados em isolados clínicos humanos de *S. epidermidis* detectaram igualmente uma elevada frequência de estirpes resistentes a outras classes de antibióticos, nomeadamente ácido fusídico, eritromicina, clindamicina ou gentamicina [21, 52, 83]. Estudos em *S. epidermidis* de colonização em humanos, incluindo humanos em contacto próximo com animais, demonstram que nestes isolados ocorre também uma elevada frequência de resistência a macrólidos, lincosamidas, tetraciclina, ácido fusídico e trimetoprim-sulfametoxazole [5, 40, 76, 131].

No conjunto, embora a origem e dimensão das duas colecções, em particular a pequena dimensão da colecção de isolados de infecção, não permita comparações directas, é possível verificar a existência de uma fração importante de bactérias resistentes ou

multirresistentes aos antibióticos entre *S. epidermidis* recolhidos tanto de locais de infecção como de colonização.

Em termos de multirresistência e considerando como multirresistentes (MDR) os isolados resistentes a três ou mais classes de antibióticos [120], na colecção de infecção em animais de companhia, foram detectados 7 isolados com perfil MDR (Tabela 15, Resultados), enquanto na colecção de colonização em humanos se detectaram 54 isolados MDR (Tabela 16, Resultados). Em relação a esta última colecção, analisando a distribuição de isolados MDR por ocupação, verifica-se que os médicos veterinários são a classe de indivíduos com maior frequência de isolados MDR, contrariamente aos estudantes de Medicina Veterinária, que possuem maior frequência de isolados não-MDR (Figura 16).

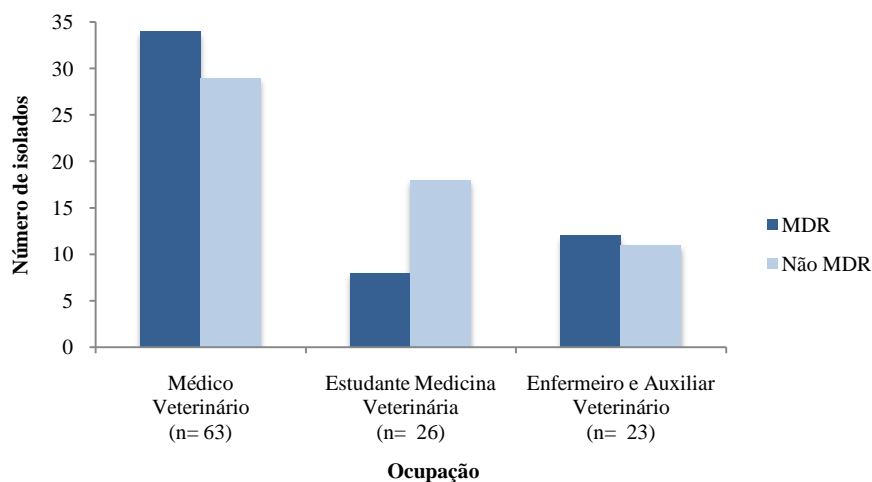


Figura 16. Frequência de MDR/não-MDR nos isolados *S. epidermidis* de colonização em humanos.

Tal como referido anteriormente, em alguns casos foram recolhidas duas amostras do mesmo indivíduo, notando-se que em muitos destes, o mesmo indivíduo estava colonizado por estirpes de *S. epidermidis* MDR e não-MDR (Tabela A2).

4.2 Actividade de efluxo dos isolados *S. epidermidis*

A caracterização da actividade de efluxo teve como principal objectivo determinar quais os isolados que apresentavam actividade de efluxo acrescida, distinguindo-os daqueles com actividade basal. Para tal recorreu-se a dois procedimentos: o método de “Cartwheel” e a determinação da CMI do EtBr.

Na colecção de *S. epidermidis* de infecção em animais de companhia, a aplicação destes dois procedimentos determinou que metade (9/17) dos isolados possuíam actividade de efluxo acrescida, enquanto os restantes isolados possuíam um nível de efluxo basal (Tabela 18, Resultados). Estes ensaios foram também realizados na colecção *S. epidermidis* de colonização em profissionais e estudantes de Medicina Veterinária, verificando-se que cerca de um terço (45/112) dos isolados possuíam actividade de efluxo aumentada (Tabela 19, Resultados).

Todos os *S. epidermidis* das duas colecções foram testados para a presença de genes localizados em plasmídeos que codificam para bombas de efluxo, nomeadamente, *qacA/B* e *smr*. Na colecção de 17 isolados de infecção foram detectados sete com o gene *qacA* e dois com o gene *smr* (Tabela 18, Resultados); enquanto na colecção de 112 isolados de colonização detectou-se o gene *qacA* em 33 isolados, o gene *smr* em sete isolados, a presença simultânea dos genes *qacA* e *smr* em dois isolados e o gene *qacB* em um isolado. A presença simultânea de *qacA* e *smr* já foi descrita em *S. epidermidis*, apesar de ser pouco frequente [109]. Relacionando a presença de actividade de efluxo aumentada com a presença/ausência dos determinantes *qacA/B* e *smr*, pode-se estabelecer que, em *S. epidermidis*, um isolado com actividade de efluxo aumentada pode ser detectado fenotipicamente se preencher um dos seguintes critérios: um valor de CMI para o EtBr igual ou superior a 8 mg/L e/ou emissão de fluorescência a uma concentração de EtBr igual ou superior a 0,75 mg/L no método de “Cartwheel”. Assim, nestas duas colecções todos os isolados que possuíam uma actividade de efluxo aumentada, possuíam pelo menos um destes genes plasmídicos, à excepção de dois isolados, FMV-122 e FMV-125 (Tabela 19, Resultados). No caso destes dois isolados, a actividade de efluxo detectada poderá ter origem na presença de outros determinantes plasmídicos que codificam para bombas de efluxo como *qacG*, *qacH* e *qacJ* [28, 129]

ou na sobreexpressão de genes nativos que codificam para bombas de efluxo, como os genes *nor* [63, Costa *et al.*, manuscrito em preparação].

Estes resultados levam a concluir que a bomba de efluxo QacA é a mais prevalente tanto nos isolados de infecção como nos isolados de colonização (Tabelas 18 e 19, Resultados). Em termos de colonização, os veterinários apresentaram maior prevalência da bomba de efluxo QacA em relação aos outros grupos, assim como em relação a outras bombas de efluxo (Figura 17). Para os indivíduos dos quais se recolheram dois isolados de *S. epidermidis*, estes apresentavam, de um modo geral, um perfil diferente para os genes pesquisados.

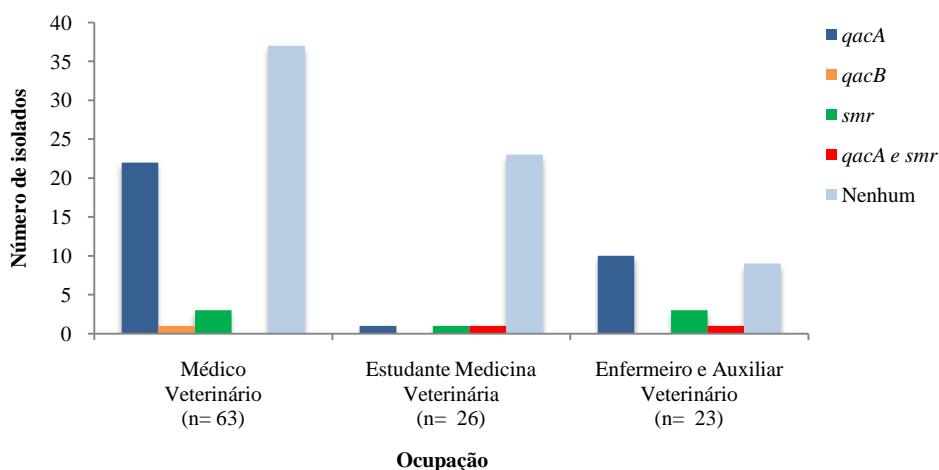


Figura 17. Presença dos genes *qacA*, *qacB* e *smr* nos isolados *S. epidermidis* de colonização em humanos.

De acordo com alguns estudos realizados em isolados clínicos tanto de *S. aureus* como de estafilococos não produtores de coagulase (incluindo *S. epidermidis*), os genes que codificam para os sistemas de efluxo QacA/B são mais frequentes, comparativamente com o gene *smr* [57, 82, 117]. Em relação aos genes *qacA* e *qacB*, é de realçar que a distinção entre ambos só é possível através da digestão com *AluI* ou outras enzimas, como realizado neste trabalho, ou por sequenciação, o que muitas vezes não é feito, podendo resultar numa sobrevalorização da frequência de *qacA* na literatura.

As CMI do EtBr foram determinadas para as duas colecções e os resultados obtidos quer para isolados de infecção, quer para os de colonização demonstraram que aqueles com a bomba de efluxo Smr apresentam valores mais baixos (4 – 64 mg/L), quando comparados com os isolados com QacA (8 – 128 mg/L) (Tabelas 18 e 19, Resultados). Curiosamente, os dois isolados com estas duas bombas de efluxo apresentaram CMIs de EtBr de 32 ou 64 mg/L, o que sugere que a presença simultânea destas duas bombas não confere um nível de resistência acrescido a este substrato. A estirpe positiva para QacB apresentou um valor de CMI para o EtBr de 64 mg/L (Tabela 19, Resultados).

Apesar de não haver dados disponíveis na literatura para comparação em *S. epidermidis*, o facto dos isolados com o sistema QacA apresentarem gamas de CMI para o EtBr superiores às dos isolados com Smr está de acordo com resultados já publicados para *S. aureus* [31, 49, 98]. Por outro lado, apesar da CMI para o EtBr do único isolado com o sistema QacB se situar na média de CMIs encontradas para os isolados com QacA, tal não coincide com o já descrito por Furi e colegas em *S. aureus*, em que os isolados com QacB apresentam valores de CMI de EtBr superiores aos dos isolados com QacA, embora para um número também reduzido de isolados com QacB [49].

A actividade de efluxo foi caracterizada através do método de fluorometria para um conjunto de isolados seleccionados com base no seu genótipo. Este método permite avaliar a acumulação de EtBr no interior das células e posteriormente, o efluxo deste para fora das mesmas em tempo real [128].

Dos seis isolados seleccionados da colecção de infecção de *S. epidermidis* em animais de companhia (quatro *qacA*⁺, um *smr*⁺ e um *qacA/B*⁻ e *smr*⁻) verificou-se que os isolados com QacA possuíam uma maior actividade de efluxo, comparativamente ao isolado com Smr (Figura 13).

Dentro da colecção de *S. epidermidis* de colonização em humanos foram seleccionados cinco isolados para estes ensaios, em que um isolado possui actividade de efluxo basal (FMV-36, *qacA/B*⁻ e *smr*⁻) e os restantes exibiam maior actividade de efluxo: FMV-28 (*qacA*⁺ e *smr*⁺), FMV-60 (*qacA*⁺), FMV-91 (*qacB*⁺) e FMV-137 (*smr*⁺). Como se pode verificar nas Figuras 14 e 15 (Resultados) obtiveram-se os resultados esperados em todos os isolados, isto é, uma actividade de efluxo superior ao das estirpes de referência

ou de colonização sem estes sistemas. A única excepção foi FMV-28, para o qual não se detectou actividade significativa no ensaio de efluxo (Figura 15, Resultados). Uma vez que a sua CMI para o EtBr (64 mg/L) e o seu comportamento no ensaio de acumulação são compatíveis com uma actividade de efluxo aumentada, pode-se presumir que os resultados obtidos no ensaio de efluxo dever-se-ão a uma limitação técnica. Esta limitação pode reflectir uma incapacidade de detectar o efluxo de EtBr, o qual terá provavelmente ocorrido nos minutos iniciais do ensaio, logo após a adição de cultura ao tubo. Para testar esta hipótese seria necessário repetir o ensaio em condições que diminuíssem a taxa de efluxo, nomeadamente pela diminuição da temperatura de manipulação dos componentes do ensaio (arrefecimento da cultura após acumulação, centrifugação a temperatura mais baixa), de modo a diminuir esta actividade, o que eventualmente permitiria a sua detecção [30].

O conjunto de resultados obtidos com estas três metodologias (método de “Cartwheel”, CMI do EtBr e fluorometria em tempo-real) permitiu concluir que o método de “Cartwheel” é uma abordagem válida para uma selecção rápida de isolados de *S. epidermidis* com actividade de efluxo acrescida, já que estes emitiram fluorescência a concentrações de EtBr mais elevadas que os isolados com uma actividade de efluxo basal, o mesmo acontecendo em relação às CMI do EtBr, mais elevadas nos isolados com uma actividade de efluxo aumentada. Confirma-se assim o potencial destas abordagens para *S. epidermidis*, tal como foi descrito para *S. aureus* [33, 80, 98]. Para além disso, a fluorometria em tempo-real é uma abordagem útil para uma caracterização mais completa da actividade de efluxo em *S. epidermidis*.

4.3 Sistemas de efluxo plasmídicos e perfil de resistência a antibióticos

A utilização de compostos antimicrobianos tem um papel essencial tanto no tratamento de infecções como na prevenção das mesmas, uma vez que engloba antibióticos, desinfectantes, antissépticos e preservantes [85, 89]. Os desinfectantes e antissépticos são utilizados tanto em hospitais como em clínicas veterinárias, a fim de controlar e prevenir infecções, inibindo o crescimento bacteriano [116]. A aplicação destes agentes antimicrobianos em medicina humana e animal, bem como na produção animal, pode

levar ao aparecimento e disseminação de bactérias resistentes, colocando os profissionais destas actividades em grupos de risco [116]. Um dos mecanismos utilizados pelas células bacterianas para se protegerem dos efeitos tóxicos destes compostos é a utilização de bombas de efluxo MDR, que permitem a exportação de vários substratos, impedindo assim que estes exerçam a sua função [20, 105]. Como referido anteriormente (ponto 4.1), a maioria dos isolados *S. epidermidis* estudados apresentaram fenótipo de multirresistência aos antibióticos. Embora os antibióticos não sejam substratos dos sistemas de efluxo analisados neste trabalho - QacA, QacB e Smr - estes sistemas poderão contribuir para o desenvolvimento de fenótipos MDR. A presença e sobreexpressão de sistemas de efluxo podem potenciar o aparecimento de fenótipos MDR através de diferentes vias: (i) no caso de bombas MDR, a sua sobreexpressão pode conduzir à resistência cruzada a outros substratos da mesma bomba (por exemplo, antibióticos); (ii) pela co-selecção de outros determinantes de resistência localizados no mesmo plasmídeo onde se encontra o determinante do sistema de efluxo; (iii) pela vantagem selectiva conferida por estes sistemas, que poderão permitir à célula sobreviver até ao aparecimento de mecanismos adicionais de resistência (por exemplo, mutação ou aquisição de genes adicionais por transferência horizontal) [115]. Uma vez que sistemas de efluxo estudados, QacA/B ou Smr não têm a capacidade de expelir antibióticos, o seu impacto no aparecimento de fenótipos MDR deverá ocorrer sobretudo pelas duas últimas vias mencionadas, isto é, pela co-selecção de outros determinantes plasmídicos ou pela vantagem selectiva. De facto, alguns estudos já demonstraram a vantagem selectiva de estirpes com estes sistemas em *S. aureus* [31, 49, 84]. Assim, foi analisada a possível relação entre a presença dos sistemas QacA/B e Smr e o perfil de multiresistência a antibióticos.

Para a colecção de infecção em animais de companhia, quatro dos sete isolados com o sistema QacA apresentaram fenótipo MDR (Tabela 21). Na colecção de colonização, 23 dos 33 isolados com QacA e três dos sete isolados com Smr apresentavam fenótipo MDR. Dos dois isolados com presença simultânea de *qacA* e *smr*, apenas um exibiu fenótipo MDR enquanto o único isolado com *qacB* apresentava também fenótipo MDR.

Tabela 21. Presença dos genes *qacA/B* e *smr* e fenótipo MDR dos isolados *S. epidermidis*.

Colecção de isolados	Genes plasmídicos que codificam bombas de efluxo				Fenótipo MDR			
	<i>qacA</i>	<i>qacB</i>	<i>smr</i>	<i>qacA</i> e <i>smr</i>	<i>qacA</i>	<i>qacB</i>	<i>smr</i>	<i>qacA</i> e <i>smr</i>
Infecção em animais (n=17)	7	-	2	-	4	-	-	-
Colonização em humanos (n=112)	33	1	7	2	23	1	3	1

(-): Não foi detectada a presença destes genes.

Como se pode observar na Figura 18, a presença dos sistemas QacA/B ou Smr aparece associada a fenótipos MDR, a maior parte dos quais envolvendo resistência simultânea a β -lactâmicos, macrólidos, tetraciclina e ácido fusídico (Tabelas 15 e 16).

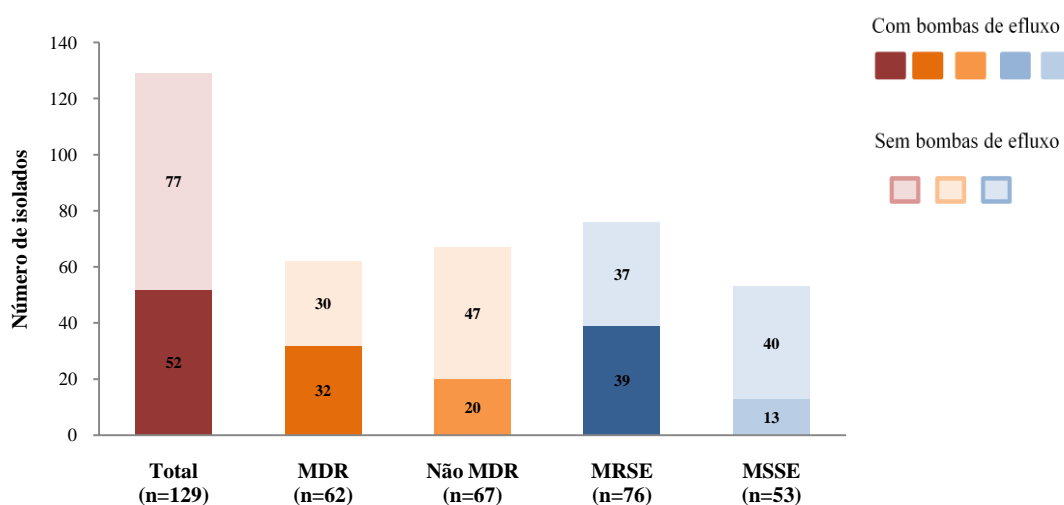


Figura 18. Presença/ausência de bombas de efluxo e perfil MDR ou MRSE/MSSE dos isolados *S. epidermidis* estudados nas duas colecções. BE: Bomba de efluxo. MDR: isolados com fenótipo MDR.

A resistência aos β -lactâmicos (MRSE) está associada à aquisição do elemento *SCCmec*, logo poderá aparecer associada à presença dos sistemas QacA/B e Smr apenas como resultado de uma maior capacidade de sobrevivência conferida por estes sistemas de efluxo. Para a maioria dos restantes antibióticos envolvidos nos fenótipos MDR

observados, a resistência poderá estar directamente associada a determinantes localizados no mesmo plasmídeo onde se encontram os genes *qacA/B* ou *smr* (Tabela 1, Introdução). Embora os dados obtidos sugiram esta relação, seriam necessários mais estudos para a sua confirmação, nomeadamente, a análise genética de outros determinantes de resistência presentes nos plasmídeos destes isolados e o estudo da variação dos fenótipos associados a cada plasmídeo, pela sua cura ou transferência para outras estirpes [27, 31, 116].

4.4 Conclusões gerais

Os resultados obtidos nesta Dissertação contribuíram para um melhor conhecimento das estirpes *S. epidermidis* responsáveis por infecção em animais de companhia ou colonização em profissionais e estudantes de Medicina Veterinária, permitindo determinar o seu perfil de resistência a antibióticos bem como de presença de genes plasmídicos que codificam para bombas de efluxo e actividade de efluxo relacionada.

Quanto ao perfil de susceptibilidade a antibióticos verificou-se uma elevada frequência de resistência aos antibióticos β -lactâmicos, macrólidos, ácido fusídico e fluoroquinolonas em ambas as colecções de *S. epidermidis* estudadas. Quanto à presença dos genes plasmídicos *qacA/B* e *smr*, concluiu-se que estes ocorrem com elevada frequência entre os isolados de *S. epidermidis* de infecção em animais de companhia (9/17), comparativamente com os isolados de colonização em profissionais e estudantes de veterinária (43/112). Dos sistemas de efluxo estudados verificou-se que QacA é o mais frequente e está associado a uma maior actividade de efluxo, comparativamente com o sistema Smr, em qualquer uma das colecções estudadas. Verificou-se também que estes sistemas de efluxo, particularmente QacA, aparecem associados a fenótipos MDR, sugerindo que a presença de genes plasmídicos que codificam para bombas de efluxo pode contribuir para uma maior frequência de resistência a compostos antimicrobianos.

No grupo de isolados de *S. epidermidis* de colonização em profissionais e estudantes de veterinária, verificou-se que os profissionais com maior contacto com os animais

(médicos, auxiliares e enfermeiros veterinários) são a população com maior frequência de isolados de *S. epidermidis* multirresistentes assim como dos determinantes *qacA/B* e *smr*. A determinação dos factores que poderão explicar estas observações implicará estudos mais alargados e abrangentes, que possam definir as vias de transmissão de estirpes resistentes entre animais e os profissionais de saúde veterinária. A determinação destas vias ganha cada vez maior relevância, dado o preocupante aumento de resistência aos antibióticos e a acumulação de dados que apontam para a importância da componente animal/veterinária na emergência e disseminação de bactérias resistentes. Os dados apresentados nesta Dissertação suportam a importância de se acompanhar e caracterizar a resistência aos compostos antimicrobianos nas vertentes humana e animal e a necessidade de se abordar este tema numa perspectiva mais abrangente, segundo o conceito OneHealth.

No futuro seria importante estudar os efeitos das bombas identificadas nesta Dissertação na resistência a biocidas com relevância na prática clínica/veterinária, determinando as suas CMI's. Seria também relevante caracterizar os plasmídeos encontrados nos isolados *S. epidermidis* das duas colecções, nomeadamente ao nível do seu tamanho e outros determinantes de resistência que possam transportar, incluindo outros genes plasmídicos que codificam para bombas de efluxo (QacG, QacJ e QacH) e para resistência a outros antimicrobianos. Esta análise deverá ser complementada com informação da linhagem genética destes isolados, a determinar por métodos de tipagem molecular como perfis de macrorestrição por electroforese em gel de campo pulsado (PFGE) ou “multilocus sequence typing” (MLST).

Além do estudo das bombas de efluxo plasmídicas, seria também importante estudar a expressão das bombas de efluxo nativas de *S. epidermidis*, para as quais ainda não existe tanta informação como para *S. aureus*, de modo a definir a sua contribuição para os fenótipos MDR observados.

Estas e outras abordagens deverão permitir compreender melhor o papel dos sistemas de efluxo no desenvolvimento de resistência aos antimicrobianos em *S. epidermidis*, como ponto de partida para o desenho de abordagens que permitam minimizar o impacto destas resistências neste importante agente de colonização e infecção.

5 Referências Bibliográficas

1. Alam MM, Ishino M, Kobayashi N. Analysis of genomic diversity and evolution of the low-level antiseptic resistance gene *smr* in *Staphylococcus aureus*. *Microb Drug Resist.* 2003; 9(1): S1-S7.
2. Alexopoulou K, Foka A, Petinaki E, Jelastopulu E, Dimitracopoulos G, Spiliopoulou I. Comparison of two commercial with PCR restriction fragment length polymorphism of the *tuf* gene in the identification of coagulase-negative staphylococci. *Lett Appl Microbiol.* 2006;43(4): 450-4.
3. Alipour F, Ahmadi M, Javadi S. Evaluation of different methods to detect methicillin resistance in *Staphylococcus aureus* (MRSA). *J Infect Public Health.* 2014;7(3): 186-91.
4. Anthonisen IL, Sunde M, Steinum TM, Sidhu MS, Sorum H. Organization of the antiseptic resistance gene *qacA* and *Tn552*-Related β -lactamase genes in multidrug-resistant *Staphylococcus haemolyticus* strains of animal and human origins. *Antimicrob Agents Chemother.* 2002; 46(11): 3606-12.
5. Argudín MA, Vanderhaeghen W, Vandendriessche S, Vandecandelaere I, André FX, Denis O, *et al.* Antimicrobial resistance and population structure of *Staphylococcus epidermidis* recovered from animals and humans. *Vet Microbiol.* 2015; 178(1-2): 105-113.
6. Barroso H, Silvestre AM, Taveira N. *Microbiologia Médica*, Volume 1, p. 228-254. Lisboa: Lidel ; 2014.
7. Bay DC, Rommens KL, Turner RJ. Small multidrug resistance proteins: a multidrug transporter family that continues to grow. *Biochim Biophys Acta.* 2008; 1778(9): 1814-38.
8. Becker K, Heilmann C, Peters G. Coagulase-negative staphylococci. *Clin Microbiol Rev.* 2014; 27(4): 870-926.
9. Bennet PM. Plasmid encoded antibiotic resistance: acquisition and transfer of antibiotic resistance genes in bacteria. *Br J Pharmacol.* 2008; 153(1): S347-S357.
10. Bjorland J, Sunde M, Waage S. Plasmid-borne *smr* gene causes resistance to Quaternary Ammonium Compounds in bovine *Staphylococcus aureus*. *J Clin Microbiol.* 2001; 39(11): 3999-4004.
11. Bjorland J, Steinum T, Sunde M, Waage S, Heir E. Novel plasmid-borne gene *qacJ* mediates resistance to quaternary ammonium compounds in equine *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus simulans*, and *Staphylococcus intermedius*. *Antimicrob Agents Chemother.* 2003; 47: 3046-52.
12. Bjorland J, Steinum T, Kvitle B, Waage S, Sunde M, Heir E. Widespread distribution of disinfectant resistance genes among staphylococci of bovine and caprine origin in Norway. *J Clin Microb.* 2005; 43: 4363-8.

13. Bjorland J, Steinum T, Sunde M, Waage S, Sviland S, Oppegaard H, Heir E. Deletion of pT181-like sequence in an *smr*-encoding mosaic plasmid harboured by a persistent bovine *Staphylococcus warneri* strain. *J Antimicrob Chemother.* 2006;57(1): 46-51.
14. Bjorland J, Bratlie MS, Steinum T. The *smr* gene resides on a novel plasmid pSP187 identified in a *Staphylococcus pasteurii* isolate recovered from unpasteurized milk. *Plasmid.* 2007; 57(2): 145-55.
15. Blanco P, Amado SH, Calderan JAR, Corona F, Lira F, Rico MA, *et al.* Bacterial efflux pumps: much more than antibiotic resistance determinants. *Microorganisms.* 2016; 4(1): 14-33.
16. Brown MH, Skurray RA. Staphylococcal multidrug efflux protein QacA. *J Mol Microbiol Biotechnol.* 2001; 4(1): 163-70.
17. Castanheira M, Watters AA, Bell JM, Turnidge JD, Jones RN. Fusidic acid resistance rates and prevalence of resistance mechanisms among *Staphylococcus* spp. isolated in North America and Australia, 2007-2008. *Antimicrob Agents Chemother.* 2010; 54(9): 3614-7.
18. Castanheira M, Watters AA, Mendes RE, Farrell DJ, Jones RN. Occurrence and molecular characterization of fusidic acid resistance mechanisms among *Staphylococcus* spp. from European countries 2008 *Antimicrob Agents Chemother.* 2010; 65(7): 1353-8.
19. Centers for Disease Control and Prevention. One Health Basis. Clifton Road Atlanta, GA, USA: 2016. Available from: <https://www.cdc.gov/onehealth/basics/index.html>.
20. Chambers H, DeLeo F. Waves of resistance: *Staphylococcus aureus* in the antibiotic era. *Nat Rev Microbiol.* 2009; 7(9): 629-41.
21. Chen HS, Chang YC, Tsai JC, Hung WC, Lin YT, You SJ, *et al.* New Structure of phage-related islands carrying *fusB* and a virulence gene in fusidic acid-resistant *Staphylococcus epidermidis*. *Antimicrob Agents Chemother.* 2013; 57(11):5737-9.
22. Cherify S, Byl B, Nonhoff C, Denis O, Hallin M. Comparative epidemiology of *Staphylococcus epidermidis* isolates from patients with catheter-related bacteremia and from healthy volunteers. *J Clin Microbiol.* 2013; 51(5): 1541-7.
23. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing: Twenty-Sixth Informational Supplement M100-S26. Clinical and Laboratory Wayne, PA: CLSI; 2016.
24. Costa SS, Ntokou E, Martins A, Viveiros M, Pournaras S, Couto I, *et al.* Identification of the plasmid-encoded *qacA* efflux pump gene in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) strain HPV107, a representative of the MRSA Iberian clone. *Int J Antimicrob Agents.* 2010; 36(6): 557-61.

25. Costa SS, Falcão C, Viveiros M, Machado D, Martins M, Melo-Cristino J, *et al.* Exploring the contribution of efflux on the resistance to fluoroquinolones in clinical isolates of *Staphylococcus aureus*. *BMC Microbiol.* 2011; 11: 241-53.
26. Costa SS. Efflux pump activity in drug resistance of *Staphylococcus aureus* [PhD Tesis]. Universidade Nova de Lisboa – Instituto de Higiene e Medicina Tropical; 2013.
27. Costa SS, Mourato C, Viveiros M, Melo-Cristino J, Amaral L, Couto I. Description of plasmid psM52, harboring the gene for Smr efflux pump, and its involvement in resistance to biocides in MRSA strain. *Int J Antimicrob Agents.* 2013; 41: 490-2.
28. Costa SS, Viveiros M, Amaral L, Couto I. Multidrug efflux pumps in *Staphylococcus aureus*: an Update. *Open Microbiol J.* 2013; 7(1): 59-71.
29. Costa SS, Junqueira E, Palma C, Viveiros M, Melo-Cristino J, Amaral L, *et al.* Resistance to antimicrobials mediated by efflux pumps in *Staphylococcus aureus*. *Antibiotics.* 2013; 2(1): 83-99.
30. Costa SS, Viveiros M, Rosato AE, Melo-Cristino J, Couto I. Impact of efflux in the development of multidrug resistance phenotypes in *Staphylococcus aureus*. *BMC Microbiol.* 2015; 15: 232-48.
31. Costa SS, Palma C, Kadlec K, Fessler A, Viveiros M, Melo-Cristino J, *et al.* Plasmid-borne antimicrobial resistance of *Staphylococcus aureus* isolated in a hospital in Lisbon, Portugal. *Microb Drug Resist.* 2016; 22(8): 617-26.
32. Couto I, Pereira S, Miragaia M, Sanches IS, De Lencastre H. Identification of clinical staphylococcal isolates from humans by Internal Transcribed Spacer PCR. *J Clin Microbiol.* 2001; 39(9): 3099-103.
33. Couto I, Costa SS, Viveiros M, Martins M, Amaral L. Efflux-mediated response of *Staphylococcus aureus* exposed to ethidium bromide. *J Antimicrob Chemother.* 2008; 62(3): 504-13.
34. Couto N, Belas A, Tilley P, Couto I, Gama LT, Kadlec K, *et al.* Biocide and antimicrobial susceptibility of methicillin-resistant staphylococcal isolates from horses. *Vet Microbiol.* 2013; 166: 299-303.
35. Couto N, Belas N, Couto I, Perreten V, Pomba C. Genetic relatedness, antimicrobial and biocide susceptibility comparative analysis of methicillin-resistant and -susceptible *Staphylococcus pseudintermedius* from Portugal. *Microb Drug Resist.* 2014; 20(4): 364-71.
36. Couto N, Belas A, Kadlec K, Schwarz S, Pomba C. Clonal diversity, virulence patterns and antimicrobial and biocide susceptibility among human, animal and environmental MRSA in Portugal. *J Antimicrob Chemother.* 2015; 70: 2483-7.
37. Couto N, Monchique C, Belas A, Marques C, Gama LT, Pomba C. Trends and molecular mechanisms of antimicrobial resistance in clinical staphylococci isolated

- from companion animals over a 16 year period. *J Antimicrob Chemother.* 2016; 71: 1479-87.
38. Davies J, Davies D. Origins and evolution of antibiotic resistance. *Microbiol Mol Biol Rev.* 2010; 74(3): 417-33.
 39. Deplano A, Vandendriessche S, Nonhoff C, Dodémont M, Roisin S, Denis O. National surveillance of *Staphylococcus epidermidis* recovered from bloodstream infections in Belgian hospitals. *J Antimicrob Chemother.* 2016; 71(7): 1815-9.
 40. Du X, Yuanjin Z, Song Y, LiT, Luo T, Sun G, *et al.* Molecular analysis of *Staphylococcus epidermidis* strains isolated from community and hospital environments in China. *PLoS One.* 2013; 8(5): e62742.
 41. El-Azizi M, Farag N, Khardori N. Efficacy of selected biocides in the decontamination of common nosocomial bacterial pathogens in biofilm and planktonic forms. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis.* 2016; 47: 60-71.
 42. European Centre for Disease Prevention and Control. Point prevalence survey of healthcare- associated infections and antimicrobial use in European acute care hospitals. Stockholm: ECDC; 2013.
 43. European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST). Breakpoint tables for interpretation of MICs and zone diameters Version 6.0. Suíça: Basel; 2016.
 44. European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST). Breakpoint tables for interpretation of MICs and zone diameters Version 7.0. Suíça: Basel; 2017.
 45. Ferreira RB, Iorio NL, Malvar KL, Nunes AP, Fonseca LS, Bastos CC, *et al.* Coagulase-negative staphylococci: comparison of phenotypic and genotypic oxacillin susceptibility tests and evaluation of the agar screening test by using different concentrations of oxacillin. *J Clin Microbiol.* 2003; 41(8): 3609-14.
 46. Fey P. *Staphylococcus epidermidis*: methods and protocols. Omaha, NE: Humana Press; 2014.
 47. Floyd J, Smith K, Kumar S, Floyd J, Varela M. LmrS is a multidrug efflux pump of the major facilitator superfamily from *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob Agents Chemother.* 2010; 54(12): 5406–12.
 48. Fournier B, Aras R, Hooper D. Expression of the multidrug resistance transporter NorA from *Staphylococcus aureus* is modified by a two-component regulatory system. *J Bacteriol.* 2000; 182(3): 664–71.
 49. Furi L, Ciusa ML, Knight D, Lorenzo VD, Tocci N, Cirasola; *et al.* Evaluation of reduced susceptibility to quaternary ammonium compounds and bisbiguadines in clinical isolates and laboratory-generated mutants of *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob Agents Chemother.* 2013; 57(8): 3488-97.

50. Grinius LL, Goldberg EB. Bacterial multidrug resistance is due to a single membrane protein which functions as a drug pump. *J Biol Chem.* 1994; 269: 29998-30004.
51. Grkovic S, Brown M, Roberts N, Paulsen I, Skurray R. QacR is a repressor protein that regulates expression of the *Staphylococcus aureus* multidrug efflux pump QacA. *J Biol Chem.* 1998; 273 (29): 18665-73.
52. Hammad T, Hellmark B, Nilsson-Augustinsson A, Söderquiste B. Antibiotic susceptibility among *Staphylococcus epidermidis* isolated from prosthetic joint infections, with focus on doxycycline. *APMIS.* 2015; 123: 1055-60.
53. Hartman B, Tomasz A. Low-affinity penicillin-binding protein associated with β -lactam resistance in *Staphylococcus aureus*. *J Bacteriol.* 1984; 158: 513-6.
54. Heir E, Sundheim G, Holck AL. The *Staphylococcus qacH* gene product: a new member of the SMR family encoding multidrug resistance. *FEMS Microbiol Lett.* 1998; 163: 49-56.
55. Heir E, Sundheim G, Holck AL. The *qacG* gene on plasmid pST94 confers resistance to quaternary ammonium compounds in staphylococci isolates from food industry. *J Appl Microbiol.* 1999; 86: 378-88.
56. Hijazi K, Mukhopadhyaya I, Abbott F, Milne K, Al-Jabri Z, Oggioni M, *et al.* Susceptibility to chlorhexidine amongst multidrug-resistant clinical isolates of *Staphylococcus epidermidis* from bloodstream infections. *Int J Antimicrob Agents.* 2016; 48(1): 86-90.
57. Ho CM, Li CY, Ho MW, Lin CY, Liu SH, Lu JJ. High rate of *qacA*- and *qacB*-positive methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates from chlorhexidine-impregnated catheter-related bloodstream infections. *Antimicrob Agents Chemother.* 2012; 56(11): 5693-7.
58. Horna G, Astocondor L, Jacobs J, Garcia C. Evaluación de métodos fenotípicos para la detección de *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina. *Rev Esp Quimioter.* 2015; 28(2): 98-100.
59. Huang J, O'Toole P, Shen W, Aluriene-Madsen H., Jiang X, Lobo N, *et al.* (2004). Novel chromosomally encoded multidrug efflux transporter MdeA in *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob Agents Chemother.* 2004; 48(3): 909-17.
60. Ito T, Katayama Y, Hiramatsu K. Cloning and nucleotide sequence determination of the entire *mec* DNA of pre-methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* N315. *Antimicrob Agents Chemother.* 1999; 43: 1449-58.
61. Jensen M, Webster J, Strauss N. Rapid identification of bacteria on the basis of polymerase chain reaction-amplified ribosomal DNA spacer polymorphisms. *J Appl Environ Microbiol.* 1993; 59(4): 945-52.
62. Jorgensen JH, Pfaller M, Carroll KC, Funke G, Landry ML, Richter SS, *et al.*

Manual of Clinical Microbiology. 11th ed. Washington DC; 2015. Available from DOI:10.1128/9781555817381.

63. Juárez-Verdayes M, Parra-Ortega B, Hernández-Rodríguez C, Betanzos-Cabrera G, Rodríguez-Martínez S, Cancino-Díaz M, *et al.* Identification and expression of *nor* efflux family genes in *Staphylococcus epidermidis* that act against gatifloxacin. *Microb Pathog.* 2012; 52(6): 318-25.
64. Kaatz G, Seo S. Inducible NorA-mediated multidrug resistance in *Staphylococcus aureus*. *J Antimicrob Chemother.* 1995; 39(12): 2650-5.
65. Kaatz G, Maleese F, Seo S. Multidrug resistance in *Staphylococcus aureus* due to overexpression of a novel Multidrug and Toxin Extrusion (MATE). *J Antimicrob Chemother.* 2005; 49(5): 1857-64.
66. Katayama Y, Ito T, Hiramatsu K. A new class of genetic element, staphylococcal cassette chromosome *mec*, encodes methicillin resistance in *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob Agents Chemother.* 2000; 44: 1549-55.
67. Kohanski M, Dwyer D, Collins J. How antibiotics kill bacteria: from targets to networks. *Nat Rev Microbiol.* 2010; 8(6): 423-35.
68. Kosmidis C, Schindler B, Jacinto P, Patel D, Bains K, Seo S, *et al.* Expression of multidrug resistance efflux pump genes in clinical and environmental isolates of *Staphylococcus aureus*. *Int J Antimicrob Agents.* 2012; 40(3): 204-9.
69. Kumar A, Schweizer H. Bacterial resistance to antibiotics: active efflux and reduced uptake. *Adv Drug Deliv Rev.* 2005; 57(10): 1486-513.
70. Kumaraswami M, Schman J, Seo S, Kaatz G, Brennan R. Structural and biochemical characterization of MepR, a multidrug binding transcription regulator of the *Staphylococcus aureus* multidrug efflux pump MepA. *Nucleic Acids Res.* 2009; 37 (4), pp. 1211–1224.
71. Lambert P. Bacterial resistance to antibiotics: modified target sites. *Adv Drug Deliv Rev.* 2005; 57(10): 1471-85.
72. Leelaporn A, Paulsen IT, Tennet JM, LittlejohnbTG, Skurray RA. Multidrug resistance to antiseptics and disinfectants in coagulase-negative staphylococci. *J Med Microbiol.* 1994; 40: 214-20.
73. Leelaporn A, Firth N, Paulsen IT, Hettiaratchi A, Surray RA. Multidrug resistance plasmid pSK108 from coagulase-negative staphylococci; relationships to *Staphylococcus aureus qacC* plasmids. *Plasmid.* 1995; 34:62-7.
74. Littlejohn TG, DiBerardino D, Messerotti LJ, Spiers SJ, Surray RA. Structure and evolution of a family of genes coding antiseptic and disinfectant resistance in *Staphylococcus aureus*. *Gene.* 1991; 101: 59-66.
75. Lloyd HD. Reservoirs of antimicrobial resistance in pet animals. *Clin Infect Dis.*

2007; 45(S2): S148-S152.

76. Loncaric I, Kunzel F, Klang A, Wagner R, Licka T, Grünert T, *et al.* (2016). Carriage of methicillin-resistant staphylococci between humans and animals on a small farm. *Vet Dermatol.* 2016; 27(3): 191-4.
77. Longtin J, Seach C, Siebert K, McGeer A, Simor A, Longtin Y, Low DE, Melano RG. Distribution of antiseptic resistance genes *qacA*, *qacB*, and *smr* in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolated in Toronto, Canada, from 2005 to 2009. *Antimicrob Agents Chemother.* 2011; 55: 2999-3001.
78. Luong T, Newell S, Lee C. *mgr*: a novel global regulator in *Staphylococcus aureus*. *J Bacterio.* 2003; 185(13): 3703-10.
79. Maillard JY. Bacterial target sites for biocide action. *J Appl Microbiol.* 2002; 92: 16S-27S.
80. Martins M, Viveiros M, Couto I, Costa SS, Pacheco T, Fanning S, *et al.* Identification of efflux pump-mediated multidrug-resistant bacteria by the ethidium bromide-agar Cartwheel method. *In Vivo.* 2011; 25(2): 171-8.
81. Martins M, McCusker M, Viveiros M, Couto I, Fanning, S., Pagès, J, *et al.* A simple method for assessment of MDR bacteria for over-expressed efflux pumps. *Open Microbiol J.* 2013; 7: 72-82.
82. Mayer S, Boos M, Beyer A, Fluit AC, Schmitz FJ. Distribution of the antiseptic resistance genes *qacA*, *qacB* and *qacC* in 497 methicillin-resistance and – susceptible European isolates of *Staphylococcus aureus*. *J Antimicrob Chemother.* 2001; 47: 896-7.
83. McLaws F, Chopra I, O’Neill A. High prevalence of resistance to fusidic acid in clinical isolates of *Staphylococcus epidermidis*. *J Antimicrob Chemother.* 2008; 61: 1040-3.
84. McManus BA, Coleman DC, Deasy EC, Brennan GI, O’Connell B, Monecke S, *et al.* Comparative genotypes, staphylococcal cassette chromosome *mec* (SCC*mec*) genes and antimicrobial resistance amongst *Staphylococcus epidermidis* and *Staphylococcus haemolyticus* isolates from infections in humans and companion animals. *PLoS One.* 2015; 10(9):1-18.
85. Meyer B, Cookson B. Does microbial resistance or adaptation to biocides create a hazard in infection prevention and control? *J Hosp Infect.* 2010; 76: 200-5.
86. Mitchell B, Brown M, Skurray R. QacA multidrug efflux pump from *Staphylococcus aureus*: comparative analysis of resistance to diamidines, biguanidines, and guanylhydrazones. *Antimicrob Agents Chemother.* 1998; 42(2): 475-7.
87. Mitchell B, Paulsen I, Brown M, Skurray R. Bioenergetics of the staphylococcal multidrug export protein QacA. *J Biol Chem.* 1999; 274(6): 3541-8.

88. Miyamoto H, Imamura K, Kojima A, Takenaka H, Hara N, Ikenouchi A, *et al.* Survey nasal colonization by, and assessment of a novel multiplex PCR method for detection of biofilm-forming methicillin-resistant staphylococci in healthy medical students. *J Hosp Infect.* 2003; 53: 215-23.
89. Morente EO, Fernández-Fuentes MA, Burgos MJG, Abriouel H, Pulido RP, Gálvez A. Biocide tolerance in bacteria. *Int J Food Microbiol.* 2013; 162: 13-25.
90. Narui K, Noguchi N, Wakasugi K, Sasatsu M. Cloning and characterization of a novel chromosomal drug efflux gene in *Staphylococcus aureus*. *Biol Pharm Bull.* 2002; 25(12): 1533-39.
91. Nikaido H. Multidrug resistance in bacteria. *Annu Rev Biochem.* 2010; 2: 119-46.
92. Noguchi N, Hase M, Kitta M, Sasatsu M, Deguchi K, Kono M. Antiseptic susceptibility and distribution of antiseptic-resistance genes in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *FEMS Microbiol Lett.* 1999; 172(2): 247-53.
93. O'Neil J. Review on Antimicrobial Resistance. Tackling Drug-Resistant Infections Globally: final report and recommendations, 2016.
94. Otter JA, Patel A, Cliff PR, Halligan EP, Tosas O, Edgeworth JD. Selection for *qacA* carriage in CC22, but no CC30, methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* bloodstream infection isolates during a successful institutional infection control programme. *J Antimicrob Chemother.* 2013; 68: 992-8.
95. Otto M. *Staphylococcus epidermidis* – the “accidental” pathogen. *Nat Rev Microbiol.* 2009; 7(8): 555-67.
96. Paixão L, Rodrigues L, Couto I, Martins M, Fernandes P, Carvalho C, *et al.* Fluorometric determination of ethidium bromide efflux kinetics in *Escherichia coli*. *Journal of biological engineering.* 2009; 3: 18-31.
97. Palazzo I, Darini A. Evaluation of methods for detecting oxacillin resistance in coagulase-negative staphylococci including cefoxitin disc diffusion. *FEMS Microbiol Lett.* 2006; 257(2): 299-305.
98. Patel D, Kosmidis C, Seo S, Kaatz G. Ethidium bromide MIC screening for enhanced efflux pump gene expression or efflux activity in *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob Agents Chemother.* 2010; 54(12): 5070-3.
99. Paulsen IT, Brown MH, Littlejohn T, Mitchell B, Skurray RA. Multidrug resistance proteins QacA and QacB from *Staphylococcus aureus*: membrane topology and identification of residues involved in substrate specificity. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1996; 93: 3630-5.
100. Paulsen IT, Brown MH, Skurray RA. Characterization of the earliest known *Staphylococcus aureus* plasmid encoding a multidrug efflux system. *J Bacteriol.* 1998; 180(13): 3477-9.

101. Peacock S, Paterson G. Mechanisms of methicillin resistance in *Staphylococcus aureus*. *Annu Rev Biochem*. 2015; 84(1): 577-601.
102. Petinaki E, Arvaniti A, Dimitracopoulos G, Spiliopoulou I. Detection of *mecA*, *mecR1* and *mecI* genes among clinical isolates of methicillin-resistant staphylococci by combined polymerase chain reactions. *J Antimicrob Chemother*. 2001; 47: 297-304.
103. Piddock L. Clinically relevant chromosomally encoded multidrug resistance efflux pumps in bacteria. *Clin Microbiol Rev*. 2006; 19(2): 382-402.
104. Poole K. Mechanisms of bacterial biocide and antibiotic resistance. *J Appl Microbiol*. 2002; 92: 55S-64S.
105. Poole K. Efflux-mediated antimicrobial resistance. *J Antimicrob Chemother*. 2005; 56: 20-51.
106. Poole K. Efflux pumps as antimicrobial resistance mechanisms. *Ann Med*. 2007; 39(3): 162-76.
107. Poole K. Bacterial multidrug efflux pumps serve other functions. *Microbe*. 2008; 3: 179-85.
108. Pourmand M, Hassanzadeh S, Mashhadi R, Askari E. Comparison of four diagnostic methods for detection of methicillin resistant *Staphylococcus aureus*. *Iran J Microbiol*. 2014; 6(5): 341-4.
109. Prag G, Falk-Brynildsen K, Jacobsson S, Hellmark B, Unemo M, Söderquist B. Decreased susceptibility to chlorhexidine and prevalence of disinfectant resistance genes among clinical isolates of *Staphylococcus epidermidis*. *APMIS*. 2014; 122(10): 961-7.
110. Raad I, Alrahwani A, Rolston K. *Staphylococcus epidermidis*: emerging resistance and need for alternative agents. *Clin Infect Dis*. 1998; 26: 1182-7.
111. Rodrigues A. Colonização nasal por staphylococci metilina-resistente em portadores humanos saudáveis em contacto diário com animais: frequência e estudo de seguimento [MSc Thesis]. Dissertação de Mestrado Integrado em Medicina Veterinária. Faculdade de Medicina Veterinária - Universidade de Lisboa, 2015.
112. Sakoulas G, Gold HS, Venkataraman L, Degirolami PC, Eliopoulos GM, Qian Q. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: comparison of susceptibility testing methods and analysis of *mecA*-positive susceptible strains. *J Clin Microbiol*. 2001; 39(11): 3946-51.
113. Sasatsu M, Sima K, Shibata Y, Kono M. Nucleotide sequence of a gene that encodes resistance to ethidium bromide from a transferable plasmid in *Staphylococcus aureus*. *Nucleic Acids Res*. 1989; 17: 10103.
114. Schwarz S, Cardoso M, Blobel H. Plasmid-mediated chloramphenicol resistance

- in *Staphylococcus hyicus*. *J Gen Microbiol*. 1989; 135: 3329-36.
115. Schwarz S, Feßler A, Hauschild T, Kehrenberg C, Kadlec K. Plasmid-mediated resistance to protein biosynthesis inhibitors in staphylococci. *Ann N Y Acad Sci*. 2011; 1241(1): 82-103.
 116. Schwarz S, Loeffler A, Kadlec K. Bacterial resistance to antimicrobial agents and its impact on veterinary and human medicine. *Vet Dermatol*. 2016 Aug. DOI: 10.1111/vde.12362. [Epub ahead of print]
 117. Shi GS, Boost M, Cho P. Prevalence of antiseptic-resistance genes in staphylococci isolated from orthokeratology lens and spectacle wearers in Hong Kong. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2015; 56(5): 3069-74.
 118. Skovgaard S, Larsen M, Nielsen L, Skov R, Wong C, Westh H *et al*. Recently introduced *qacA/B* genes in *Staphylococcus epidermidis* do not increase chlorhexidine MIC/MBC. *J Antimicrob Chemother*. 2013; 68(10): 2226-33.
 119. Sousa MA De, Sanches IS, Ferro ML, De Lencastre H. Epidemiological study of staphylococcal colonization and cross-infection in two West African Hospitals. *Microb Drug Resist*. 2000; 6(2): 133-41.
 120. Tenover FC. Mechanisms of antimicrobial resistance in bacteria. *Am J Med*. 2006; 119(6):S3-10.
 121. Tennent JM, Lyon BR, Gillespie MT, May JW, Skurray RA. Cloning and expression of *Staphylococcus aureus* plasmid-mediated quaternary ammonium resistance in *Escherichia coli*. *Antimicrob Agents Chemother*. 1985; 27: 79-83.
 122. Truong-Bolduc Q, Dunman P, Strahilevitz J, Projan S, Hooper D. MgrA is a multiple regulator of two new efflux pumps in *Staphylococcus aureus*. *J Bacteriol*. 2005; 187(7): 2395-405.
 123. Truong-Bolduc Q, Strahilevitz J, Hooper D. NorC, a new efflux pump regulated by MgrA of *Staphylococcus aureus*. *J Antimicrob Chemother*, 2006; 50(3): 1104-7.
 124. Truong-Bolduc Q, Hooper D. The transcriptional regulators NorG and MgrA modulate resistance to both quinolones and β -lactams in *Staphylococcus aureus*. *J Bacteriol*. 2007; 189(8): 2996-3005.
 125. Truong-Bolduc Q, Dunman P, Eidem T, Hooper D. Transcriptional profiling analysis of the global regulator NorG, a GntR-like protein of *Staphylococcus aureus*. *J Bacteriol*. 2011; 193(22): 6207-14.
 126. Vali L, Davies SE, Lai LLG, Dave J, Amyes SGB. Frequency of biocide resistance genes, antibiotic resistance and the effect of chlorhexidine exposure on clinical methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates. *J Antimicrob Chemother*. 2008; 61:524-32.
 127. Viveiros M, Martins A, Paixão L, Rodrigues L, Martins M, Couto I, *et al*.

- Demonstration of intrinsic efflux activity of *Escherichia coli* K-12 AG100 by an automated ethidium bromide method. *Int J Antimicrob Agents*. 2008; 31(5): 458-62.
128. Viveiros M, Rodrigues L, Martins M, Couto I, Spengler G, Martins A, *et al.* Evaluation of efflux activity of bacteria by a semi-automated fluorometric system. In: Gillespie SH, McHugh TD, editors. Antibiotic resistance protocols. 1st ed. Totowa, NJ: Humana Press; 2010.
 129. Wassenaar T, Ussery D, Nielsen L, Ingmer H. Review and phylogenetic analysis of *qac* genes that reduce susceptibility to quaternary ammonium compounds in *Staphylococcus* species. *Eur J Microbiol Immunol*. 2015; 5(1): 44-61.
 130. Webber M, Piddock L. The importance of efflux pumps in bacterial antibiotic resistance. *J Antimicrob Chemother*. 2003; 51(1): 9-11.
 131. Weiß S, Kadlec K, Feßler AT, Schwarz S. Identification and characterization of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus haemolyticus* and *Staphylococcus pettenkoferi* from a small animal clinic. *Veterinary Microbiology*. 2013; 167: 680-5.
 132. Wendlandt S, Feßler A, Monecke S, Ehrlich R, Schwarz S, Kadlec K. The diversity of antimicrobial resistance genes among staphylococci of animal origin. *Int J Med Microbiol*. 2013; 303(6-7): 338-49.
 133. Wendlandt S, Shen J, Kadlec K, Wang Y, Li B, Zhang W, *et al.* Multidrug resistance genes in staphylococci from animals that confer resistance to critically and highly important antimicrobial agents in human medicine. *Trends Microbiol*. 2015; 23(1): 44-54.
 134. World Health Organization. Antimicrobial resistance. Geneva: Bulletin of the World Health Organization. 2014. 437 p. Report No:61.
 135. Yamada Y, Hideka K, Shiota S, Kuroda T, Tsuchiya T. Gene cloning and characterization of SdrM, a chromosomally-encoded multidrug efflux pump, from *Staphylococcus aureus*. *Biol Pharm Bull*. 2006; 29(3): 554-6.
 136. Yamada Y, Shiota S, Mizushima T, Kuroda T, Tsuchiya T. Functional gene cloning and characterization of MdeA, a multidrug efflux pump from *Staphylococcus aureus*. *Biol Pharm Bull*. 2006; 29(4): 801-4.
 137. Ye HF, Zhang MO, Donoghue M, Boost M. Are *qacG*, *qacH* and *qacJ* genes transferring from food isolates to carriage isolates of staphylococci? *J Hosp Infect*. 2012; 80(1): 95-6.
 138. Yoshida H, Bogaki M, Nakamura S, Ubukata K, Konno M. Nucleotide sequence and characterization of the *Staphylococcus aureus norA* gene, which confers resistance to quinolones. *J Bacteriol*. 1990; 172(12): 6942-9.
 139. Zhang Y, Ren S, Li H, Wang Y, Fu G, Yang J, *et al.* Genome-based analysis of virulence genes in a non-biofilm-forming *Staphylococcus epidermidis* strain (ATCC

12228). *Mol Microbiol.* 2003; 49(6): 1577-93.

- 140.** Ziebuhr W, Henning S, Eckart M, Kranzler H, Batzilla C, Kozitskava S. Nosocomial infections by *Staphylococcus epidermidis* : how a commensal bacterium turns into a pathogen. *Int J Antimicrob Agents.* 2006; 28(1): S14-S20.

Anexos

Tabela A1. Halos de inibição (mm) para diferentes antibióticos dos isolados *S. epidermidis* de infecção em animais.

Isolados	Antibióticos															
	PEN		AMP		OXA ⁽¹⁾		FOX ⁽¹⁾		ERY		CLI		CIP		NOR	
	Halo	Fenótipo	Halo	Fenótipo	Halo	Fenótipo	Halo	Fenótipo	Halo	Fenótipo	Halo	Fenótipo	Halo	Fenótipo	Halo	Fenótipo
FMV – 1	38	(A)	40	(A)	24	(A)	35	S	32	S	34	S	36	S	34	S
FMV – 2	17	(A)	20	(A)	28	(A)	34	S	6	R	28	S	30	S	30	S
FMV – 3	6	(A)	6	(A)	6	(A)	21	R	32	S	32	S	20	S	15	R
FMV – 5	38	(A)	40	(A)	24	(A)	30	S	34	S	34	S	36	S	34	S
FMV – 6	20	(A)	22	(A)	21	(A)	21	R	36	S	38	S	38	S	36	S
FMV – 8	17	(A)	20	(A)	21	(A)	34	S	32	S	28	S	32	S	30	S
FMV – 10	14	(A)	17	(A)	6	(A)	21	R	6	R	30 (D)	R ⁽¹⁾	6	R	6	R
FMV – 11	19	(A)	24	(A)	24	(A)	34	S	30	S	30	S	34	S	34	S
FMV – 12	20	(A)	27	(A)	30	(A)	38	S	30	S	28	S	30	S	15	R
FMV – 13	40	(A)	38	(A)	26	(A)	34	S	32	S	28	S	36	S	34	S
FMV – 14	6	(A)	12	(A)	6	(A)	18	R	6	R	34 (D)	R ⁽¹⁾	19	R	13	R
FMV – 15	25	(A)	26	(A)	13	(A)	23	R	16	R	32	S	36	S	34	S
FMV – 16	13	(A)	14	(A)	6	(A)	12	R	6	R	30 (D)	R ⁽¹⁾	15	R	11	R
FMV – 17	27	(A)	26	(A)	13	(A)	15	R	30	S	30	S	34	S	32	S
FMV – 18	13	(A)	15	(A)	6	(A)	13	R	6	R	28 (D)	R ⁽¹⁾	19	R	12	R
FMV – 19	39	(A)	40	(A)	28	(A)	34	S	6	R	30	S	34	S	34	S

PEN: penicilina; AMP: ampicilina; OXA: oxacilina; FOX: cefoxitina; ERY: eritomicina; CLI: clindamicina; CIP: ciprofloxacina; NOR: norfloxacin. S: sensível; **R**: resistente; **R**⁽¹⁾: Resistência indutível à clindamicina; (A): Valores de “breakpoint” não padronizados; (1): Leitura dos halos de inibição após 18h e 24h de incubação.

Tabela A1. (continuação).

Isolados	Antibióticos															
	MXF		GEN		KAN		TOB		QDT		TET		TGC		LZD	
	Halo	Fenótipo	Halo	Fenótipo	Halo	Fenótipo	Halo	Fenótipo	Halo	Fenótipo	Halo	Fenótipo	Halo	Fenótipo	Halo	Fenótipo
FMV – 1	36	S	30	S	28	(A)	28	S	36	S	32	S	25	S	26	S
FMV – 2	30	S	26	S	26	(A)	26	S	27	S	24	S	22	S	24	S
FMV – 3	28	S	26	S	6	(A)	6	R	28	S	28	S	26	S	24	S
FMV – 5	36	S	32	S	28	(A)	30	S	28	S	28	S	24	S	28	S
FMV – 6	38	S	36	S	34	(A)	36	S	31	S	12	R	26	S	34	S
FMV – 8	34	S	28	S	26	(A)	28	S	25	S	26	S	24	S	24	S
FMV – 10	19	R	30	S	30	(A)	32	S	28	S	25	S	26	S	26	S
FMV – 11	38	S	32	S	28	(A)	28	S	24	S	24	S	24	S	26	S
FMV – 12	32	S	32	S	30	(A)	32	S	30	S	12	R	26	S	30	S
FMV – 13	36	S	28	S	28	(A)	28	S	26	S	28	S	25	S	28	S
FMV – 14	25	S	14	R	6	(A)	18	R	26	S	18	R	27	S	28	S
FMV – 15	36	S	28	S	30	(A)	28	S	26	S	28	S	26	S	28	S
FMV – 16	24	S	17	R	11	(A)	20	R	29	S	16	R	25	S	30	S
FMV – 17	34	S	30	S	28	(A)	30	S	28	S	26	S	21	S	30	S
FMV – 18	24	S	14	R	9	(A)	19	R	30	S	6	R	20	S	30	S
FMV – 19	38	S	30	S	28	(A)	28	S	30	S	8	R	24	S	30	S

MXF: moxifloxacina; GEN: gentamicina; KAN: canamicina; TOB: tobramicina; QDT: quinopristina/ dalfopristina; TET: tetraciclina; TGC; tigeciclina; LZD: linezolida. S: sensível; **R**: resistente; (A): Valores de “breakpoint” não padronizados.

Tabela A1. (continuação).

Isolados	Antibióticos															
	CHL		FFC		FUS		MUP		NIT		RIF		TMP		SXT	
	Halo	Fenótipo	Halo	Fenótipo	Halo	Fenótipo	Halo	Fenótipo	Halo	Fenótipo	Halo	Fenótipo	Halo	Fenótipo	Halo	Fenótipo
FMV – 1	28	S	28	(A)	30	S	42	S	30	S	40	S	32	S	26	S
FMV – 2	26	S	24	(A)	6	R	38	S	23	S	36	S	24	S	25	S
FMV – 3	24	S	29	(A)	28	S	40	S	30	S	40	S	6	R	12	R
FMV – 5	28	S	28	(A)	32	S	38	S	28	S	36	S	32	S	26	S
FMV – 6	32	S	30	(A)	40	S	42	S	34	S	44	S	30	S	34	S
FMV – 8	24	S	28	(A)	28	S	38	S	28	S	37	S	32	S	30	S
FMV – 10	26	S	28	(A)	14	R	44	S	28	S	34	S	30	S	26	S
FMV – 11	26	S	30	(A)	26	S	38	S	28	S	36	S	28	S	26	S
FMV – 12	30	S	30	(A)	32	S	28	R	42	S	32	S	30	S	42	S
FMV – 13	26	S	27	(A)	10	R	38	S	26	S	36	S	29	S	28	S
FMV – 14	24	S	30	(A)	14	R	40	S	28	S	36	S	30	S	30	S
FMV – 15	36	S	29	(A)	30	S	40	S	28	S	36	S	32	S	28	S
FMV – 16	29	S	26	(A)	15	R	42	S	29	S	38	S	26	S	30	S
FMV – 17	28	S	24	(A)	34	S	42	S	28	S	38	S	25	S	26	S
FMV – 18	29	S	24	(A)	15	R	42	S	32	S	38	S	28	S	30	S
FMV – 19	30	S	28	(A)	34	S	40	S	30	S	36	S	6	R	12	R

CHL: cloranfenicol; FFC: florfenicol; FUS: ácido fusídico; MUP: mupirocina; NIT: nitrofurantoína; RIF: rifampicina; TMP: trimetoprim; SXT: trimetoprim-sulfametoxazole. S: sensível; R: resistente; (A): Valores de “breakpoint” não padronizados.

Tabela A2. Halos de inibição (mm) para diferentes antibióticos dos isolados *S. epidermidis* de colonização em humanos.

Isolados	Antibióticos															
	PEN		AMP		OXA ⁽¹⁾		FOX ⁽¹⁾		ERY		CLI		CIP		NOR	
	Halo	Fenótipo	Halo	Fenótipo	Halo	Fenótipo	Halo	Fenótipo	Halo	Fenótipo	Halo	Fenótipo	Halo	Fenótipo	Halo	Fenótipo
FMV – 22	17	(A)	20	(A)	19	(A)	22	R	36	S	34	S	34	S	34	S
FMV – 23	15	(A)	18	(A)	18	(A)	22	R	36	S	36	S	36	S	36	S
FMV – 24	18	(A)	22	(A)	22	(A)	21	R	32	S	36	S	6	R	6	R
FMV – 25 ^(j)	32	(A)	32	(A)	32	(A)	26	S	14	R	40	S	40	S	38	S
FMV – 26 ^(j)	18	(A)	20	(A)	28	(A)	34	S	36	S	34	S	34	S	34	S
FMV – 27 ^(k)	12	(A)	16	(A)	12	(A)	24	R	11	R	28 (D)	R ⁽¹⁾	20	S	15	R
FMV – 28 ^(k)	6	(A)	14	(A)	6	(A)	22	R	38	S	34	S	38	S	38	S
FMV – 29	38	(A)	38	(A)	32	(A)	34	S	34	S	34	S	40	S	38	S
FMV – 30	11	(A)	12	(A)	12	(A)	21	R	38	S	34	S	36	S	34	S
FMV – 31	16	(A)	19	(A)	17	(A)	22	R	18	R	6	S	18	R	16	R
FMV – 32 ⁽ⁱ⁾	20	(A)	22	(A)	24	(A)	25	S	14	R	15	S	40	S	38	S
FMV – 34	13	(A)	17	(A)	22	(A)	24	R	10	R	30	S	24	S	20	S
FMV – 35	24	(A)	26	(A)	30	(A)	34	S	10	R	34	S	36	S	34	S
FMV – 36	22	(A)	28	(A)	30	(A)	36	S	18	R	35	S	38	S	34	S
FMV – 37	18	(A)	20	(A)	26	(A)	34	S	6	R	28	S	30	S	30	S
FMV – 38	23	(A)	22	(A)	28	(A)	36	S	6	R	30	S	36	S	32	S
FMV – 39	26	(A)	30	(A)	34	(A)	36	S	16	R	35	S	40	S	40	S
FMV – 40	21	(A)	25	(A)	30	(A)	40	S	34	S	30	S	30	S	30	S
FMV – 41	17	(A)	21	(A)	26	(A)	36	S	30	S	28	S	30	S	30	S
FMV – 42	23	(A)	22	(A)	26	(A)	24	R	14	R	34	S	30	S	24	S
FMV – 46	24	(A)	30	(A)	24	(A)	30	S	28	S	36	S	38	S	36	S
FMV – 47	40	(A)	38	(A)	30	(A)	32	S	6	R	32	S	34	S	34	S
FMV – 48	24	(A)	24	(A)	30	(A)	36	S	38	S	38	S	38	S	38	S
FMV – 49	24	(A)	24	(A)	28	(A)	36	S	13	R	34	S	36	S	36	S

PEN: penicilina; AMP: ampicilina; OXA: oxacilina; FOX: cefoxitina; ERY: eritomicina; CLI: clindamicina; CIP: ciprofloxacina; NOR: norfloxacin. S: sensível; **R**: resistente; **R**⁽¹⁾: Resistência indutível à clindamicina; (A): Valores de “breakpoint” não padronizados; (1): Leitura dos halos de inibição após 18h e 24h de incubação; (j), (k) e (i): isolados *S. epidermidis* que pertencem ao mesmo indivíduo.

Tabela A2. (continuação).

Isolados	Antibióticos															
	PEN		AMP		OXA ⁽¹⁾		FOX ⁽¹⁾		ERY		CLI		CIP		NOR	
	Halo	Fenótipo	Halo	Fenótipo	Halo	Fenótipo	Halo	Fenótipo	Halo	Fenótipo	Halo	Fenótipo	Halo	Fenótipo	Halo	Fenótipo
FMV – 50 ^(m)	22	(A)	24	(A)	30	(A)	34	S	14	R	34	S	32	S	28	S
FMV – 51 ^(m)	20	(A)	22	(A)	22	(A)	24	R	18	R	16	R	38	S	38	S
FMV – 52	18	(A)	14	(A)	14	(A)	24	R	38	S	36	S	14	R	14	R
FMV – 53	18	(A)	24	(A)	20	(A)	22	R	40	S	34	S	6	R	6	R
FMV – 54	24	(A)	30	(A)	20	(A)	34	S	38	S	40	S	36	S	38	S
FMV – 55	40	(A)	40	(A)	30	(A)	36	S	28	S	24	S	30	S	28	S
FMV – 57	14	(A)	16	(A)	20	(A)	24	R	6	R	28	S	32	S	32	S
FMV – 58	18	(A)	20	(A)	20	(A)	24	R	14	R	34	S	34	S	34	S
FMV – 59	42	(A)	36	(A)	32	(A)	32	S	6	R	26 (D)	R ⁽¹⁾	32	S	30	S
FMV – 60	6	(A)	15	(A)	14	(A)	22	R	34	S	32	S	34	S	32	S
FMV – 61	19	(A)	20	(A)	18	(A)	23	R	34	S	34	S	36	S	36	S
FMV – 62	12	(A)	18	(A)	6	(A)	22	R	6	R	27 (D)	R ⁽¹⁾	18	R	15	R
FMV – 63	12	(A)	18	(A)	9	(A)	22	R	6	R	25 (D)	R ⁽¹⁾	18	R	12	R
FMV – 64	14	(A)	16	(A)	20	(A)	24	R	24	S	30	S	36	S	34	S
FMV – 65	40	(A)	42	(A)	32	(A)	36	S	6	R	30	S	36	S	34	S
FMV – 66	16	(A)	20	(A)	6	(A)	22	R	38	S	36	S	6	R	6	R
FMV – 67	10	(A)	18	(A)	6	(A)	22	R	6	R	6	R	20	S	16	R
FMV – 69 ^(a)	22	(A)	26	(A)	30	(A)	36	S	34	S	36	S	36	S	34	S
FMV – 70	22	(A)	24	(A)	26	(A)	35	S	12	R	34 (D)	R ⁽¹⁾	32	S	28	S
FMV – 71 ^(b)	6	(A)	18	(A)	18	(A)	22	R	32	S	34	S	16	R	10	R
FMV – 72 ^(b)	40	(A)	38	(A)	30	(A)	34	S	36	S	10	R	36	S	36	S
FMV – 73	24	(A)	28	(A)	24	(A)	34	S	36	S	34	S	36	S	36	S
FMV – 74	16	(A)	26	(A)	24	(A)	28	S	12	R	34 (D)	R ⁽¹⁾	40	S	38	S
FMV – 75	6	(A)	6	(A)	10	(A)	22	R	32	S	32	S	32	S	28	S
FMV – 76	17	(A)	24	(A)	28	(A)	34	S	6	R	28	S	30	S	28	S
FMV – 77	22	(A)	34	(A)	30	(A)	36	S	6	R	26 (D)	R ⁽¹⁾	34	S	32	S

PEN: penicilina; AMP: ampicilina; OXA: oxacilina; FOX: cefoxitina; ERY: eritomicina; CLI: clindamicina; CIP: ciprofloxacina; NOR: norfloxacina. S: sensível; R: resistente; R⁽¹⁾: Resistência indutível à clindamicina; (A): Valores de “breakpoint” não padronizados; (1): Leitura dos halos de inibição após 18h e 24h de incubação; (a), (b) e (m): isolados *S. epidermidis* que pertencem ao mesmo indivíduo.

Tabela A2. (continuação).

Isolados	Antibióticos															
	PEN		AMP		OXA ⁽¹⁾		FOX ⁽¹⁾		ERY		CLI		CIP		NOR	
	Halo	Fenótipo	Halo	Fenótipo	Halo	Fenótipo	Halo	Fenótipo	Halo	Fenótipo	Halo	Fenótipo	Halo	Fenótipo	Halo	Fenótipo
FMV-78	17	(A)	20	(A)	15	(A)	24	R	32	S	14	R	36	S	34	S
FMV-79	14	(A)	18	(A)	16	(A)	24	R	34	S	34	S	36	S	36	S
FMV-80	6	(A)	10	(A)	6	(A)	20	R	34	S	10	R	36	S	34	S
FMV-81	16	(A)	20	(A)	18	(A)	22	R	12	R	15	R	26	S	20	S
FMV-82	20	(A)	24	(A)	28	(A)	36	S	36	S	34	S	30	S	30	S
FMV-83	15	(A)	20	(A)	20	(A)	24	R	38	S	6	R	10	R	6	R
FMV-84	15	(A)	18	(A)	15	(A)	20	R	11	R	34	S	36	S	32	S
FMV-85	23	(A)	26	(A)	28	(A)	36	S	34	S	36	S	38	S	38	S
FMV-86	26	(A)	28	(A)	30	(A)	36	S	38	S	36	S	38	S	36	S
FMV-87	6	(A)	6	(A)	6	(A)	18	R	34	S	30	S	6	R	6	R
FMV-88	12	(A)	17	(A)	18	(A)	22	R	6	R	36 (D)	R ⁽¹⁾	21	S	16	R
FMV-89 ^(c)	26	(A)	28	(A)	30	(A)	36	S	36	S	34	S	36	S	34	S
FMV-90 ^(c)	19	(A)	22	(A)	22	(A)	30	S	38	S	34	S	40	S	40	S
FMV-91 ^(d)	15	(A)	19	(A)	18	(A)	24	R	6	R	36 (D)	R ⁽¹⁾	38	S	36	S
FMV-92 ^(d)	22	(A)	26	(A)	28	(A)	34	S	36	S	36	S	30	S	28	S
FMV-93	15	(A)	18	(A)	16	(A)	22	R	6	R	30 (D)	R ⁽¹⁾	6	R	6	R
FMV-94	18	(A)	24	(A)	28	(A)	30	S	11	R	40 (D)	R ⁽¹⁾	36	S	36	S
FMV-96	17	(A)	19	(A)	16	(A)	24	R	12	R	32	S	6	R	6	R
FMV-97 ^(e)	6	(A)	14	(A)	10	(A)	18	R	6	R	25 (D)	R ⁽¹⁾	15	R	12	R
FMV-98 ^(e)	24	(A)	28	(A)	28	(A)	36	S	38	S	36	S	38	S	40	S
FMV-99 ^(f)	13	(A)	15	(A)	12	(A)	21	R	32	S	30	S	6	R	6	R
FMV-100 ^(f)	42	(A)	42	(A)		(A)	38	S	6	R	16	R	36	S	36	S
FMV-101	6	(A)	12	(A)	6	(A)	19	R	6	R	22 (D)	R ⁽¹⁾	18	R	15	R
FMV-102	6	(A)	14	(A)	6	(A)	19	R	10	R	6	R	36	S	36	S
FMV-103	14	(A)	16	(A)	15	(A)	24	R	36	S	36	S	38	S	36	S
FMV-104	15	(A)	16	(A)	6	(A)	19	R	6	R	6	R	6	R	6	R
FMV-105	18	(A)	21	(A)	26	(A)	34	S	34	S	30	S	36	S	34	S

PEN: penicilina; AMP: ampicilina; OXA: oxacilina; FOX: cefoxitina; ERY: eritomicina; CLI: clindamicina; CIP: ciprofloxacina; NOR: norfloxacina. S: sensível; R: resistente; R⁽¹⁾: Resistência indutível à clindamicina; (A): Valores de “breakpoint” não padronizados; (1): Leitura dos halos de inibição após 18h e 24h de incubação; (c) a (f): isolados *S. epidermidis* que pertencem ao mesmo indivíduo.

Tabela A2. (continuação).

Isolados	Antibióticos															
	PEN		AMP		OXA ⁽¹⁾		FOX ⁽¹⁾		ERY		CLI		CIP		NOR	
	Halo	Fenótipo	Halo	Fenótipo	Halo	Fenótipo	Halo	Fenótipo	Halo	Fenótipo	Halo	Fenótipo	Halo	Fenótipo	Halo	Fenótipo
FMV-106	38	(A)	40	(A)	32	(A)	38	S	16	R	32	S	36	S	36	S
FMV-107	18	(A)	20	(A)	30	(A)	34	S	22	R	32	S	34	S	34	S
FMV-108	16	(A)	20	(A)	28	(A)	34	S	30	S	30	S	32	S	32	S
FMV-109	20	(A)	23	(A)	19	(A)	26	S	12	R	34 (D)	R ⁽¹⁾	38	S	34	S
FMV-110	22	(A)	25	(A)	28	(A)	36	S	6	R	21 (D)	R ⁽¹⁾	28	S	28	S
FMV-111	22	(A)	22	(A)	28	(A)	36	S	6	R	21 (D)	R ⁽¹⁾	28	S	28	S
FMV-112	24	(A)	26	(A)	30	(A)	40	S	6	R	26(D)	R ⁽¹⁾	36	S	32	S
FMV-113	42	(A)	40	(A)	30	(A)	36	S	6	R	34	S	34	S	34	S
FMV-114	13	(A)	16	(A)	11	(A)	24	R	32	S	30	S	34	S	34	S
FMV-115 ^(l)	12	(A)	18	(A)	16	(A)	25	S	20	R	30	S	36	S	36	S
FMV-116 ^(l)	18	(A)	23	(A)	22	(A)	34	S	6	R	30	S	36	S	34	S
FMV-117	17	(A)	21	(A)	26	(A)	34	S	6	R	30	S	32	S	32	S
FMV-118	10	(A)	17	(A)	14	(A)	21	R	34	S	32	S	32	S	30	S
FMV-119	16	(A)	19	(A)	26	(A)	32	S	28	S	28	S	30	S	28	S
FMV-120	26	(A)	26	(A)	18	(A)	25	S	34	S	34	S	34	S	32	S
FMV-121	6	(A)	14	(A)	12	(A)	20	R	30	S	28	S	16	R	12	R
FMV-123 ^(g)	21	(A)	22	(A)	15	(A)	20	R	30	S	30	S	34	S	34	S
FMV-124 ^(g)	34	(A)	36	(A)	24	(A)	34	S	13	R	32	S	34	S	32	S
FMV-125	15	(A)	18	(A)	15	(A)	22	R	34	S	32	S	16	R	13	R
FMV-126	24	(A)	26	(A)	16	(A)	22	R	11	R	30	S	34	S	32	S
FMV-128	6	(A)	18	(A)	15	(A)	23	R	30	S	30	S	18	R	12	R
FMV-129	6	(A)	11	(A)	6	(A)	19	R	6	R	16 (D)	R ⁽¹⁾	18	R	12	R
FMV-130	15	(A)	20	(A)	6	(A)	30	S	6	R	6	R	6	R	6	R
FMV-131	16	(A)	17	(A)	16	(A)	24	R	36	S	34	S	36	S	36	S
FMV-132	6	(A)	6	(A)	6	(A)	16	R	6	R	27 (D)	R ⁽¹⁾	16	R	10	R

PEN: penicilina; AMP: ampicilina; OXA: oxacilina; FOX: cefoxitina; ERY: eritomicina; CLI: clindamicina; CIP: ciprofloxacina; NOR: norfloxacina. S: sensível; R: resistente; R⁽¹⁾: Resistência indutível à clindamicina; (A): Valores de “breakpoint” não padronizados; (1): Leitura dos halos de inibição após 18h e 24h de incubação; (l) e (g): isolados *S. epidermidis* que pertencem ao mesmo indivíduo.

Tabela A2. (continuação).

Isolados	Antibióticos															
	PEN		AMP		OXA ⁽¹⁾		FOX ⁽¹⁾		ERY		CLI		CIP		NOR	
	Halo	Fenótipo	Halo	Fenótipo	Halo	Fenótipo	Halo	Fenótipo	Halo	Fenótipo	Halo	Fenótipo	Halo	Fenótipo	Halo	Fenótipo
FMV-133	6	(A)	6	(A)	6	(A)	18	R	30	S	12	R	32	S	32	S
FMV-134	12	(A)	18	(A)	19	(A)	24	R	9	R	10	R	32	S	30	S
FMV-135^(h)	6	(A)	16	(A)	6	(A)	19	R	6	R	22 (D)	R ⁽¹⁾	19	R	14	R
FMV-136^(h)	18	(A)	24	(A)	26	(A)	34	S	30	S	30	S	34	S	36	S
FMV-137	6	(A)	15	(A)	13	(A)	21	R	30	S	30	S	20	S	17	S

PEN: penicilina; AMP: ampicilina; OXA: oxacilina; FOX: cefoxitina; ERY: eritomicina; CLI: clindamicina; CIP: ciprofloxacina; NOR: norfloxacin. S: sensível; **R**: resistente; **R**⁽¹⁾: Resistência indutível à clindamicina; (A): Valores de “breakpoint” não padronizados; (1): Leitura dos halos de inibição após 18h e 24h de incubação; (h): isolados *S. epidermidis* que pertencem ao mesmo indivíduo.

Tabela A2. (continuação).

Isolados	Antibióticos															
	MXF		GEN		KAN		TOB		QDT		TET		TGC		LZD	
	Halo	Fenótipo	Halo	Fenótipo	Halo	Fenótipo	Halo	Fenótipo	Halo	Fenótipo	Halo	Fenótipo	Halo	Fenótipo	Halo	Fenótipo
FMV – 22	38	S	14	R	6	(A)	17	R	28	S	30	S	23	S	32	S
FMV – 23	38	S	32	S	30	(A)	32	S	30	S	8	R	22	S	36	S
FMV – 24	20	R	32	S	32	(A)	32	S	30	S	30	S	21	S	34	S
FMV – 25 ^(j)	44	S	36	S	26	(A)	18	R	32	S	6	R	25	S	40	S
FMV – 26 ^(j)	36	S	32	S	32	(A)	30	S	25	S	32	S	28	S	30	S
FMV – 27 ^(k)	26	S	12	R	6	(A)	20	R	30	S	18	R	22	S	36	S
FMV – 28 ^(k)	38	S	36	S	26	(A)	18	R	30	S	30	S	24	S	34	S
FMV – 29	38	S	34	S	30	(A)	32	S	27	S	32	S	28	S	28	S
FMV – 30	38	S	32	S	32	(A)	32	S	30	S	30	S	20	S	36	S
FMV – 31	24	S	34	S	32	(A)	34	S	30	S	36	S	26	S	34	S
FMV – 32 ⁽ⁱ⁾	40	S	38	S	36	(A)	36	S	28	S	30	S	24	S	34	S
FMV – 34	34	S	34	S	20	(A)	15	R	26	S	6	R	20	S	24	S
FMV – 35	38	S	32	S	32	(A)	32	S	30	S	32	S	24	S	36	S
FMV – 36	40	S	34	S	32	(A)	34	S	30	S	36	S	26	S	32	S
FMV – 37	34	S	28	S	28	(A)	28	S	28	S	24	S	22	S	26	S
FMV – 38	36	S	30	S	30	(A)	32	S	27	S	28	S	22	S	34	S
FMV – 39	40	S	36	S	34	(A)	34	S	30	S	32	S	26	S	38	S
FMV – 40	34	S	26	S	26	(A)	26	S	30	S	30	S	24	S	30	S
FMV – 41	32	S	28	S	26	(A)	26	S	28	S	26	S	29	S	28	S
FMV – 42	38	S	36	S	36	(A)	36	S	30	S	6	R	26	S	40	S
FMV – 46	40	S	38	S	38	(A)	38	S	34	S	38	S	26	S	34	S
FMV – 47	34	S	34	S	32	(A)	34	S	28	S	32	S	24	S	32	S
FMV – 48	36	S	32	S	32	(A)	32	S	31	S	36	S	24	S	32	S
FMV – 49	38	S	34	S	32	(A)	32	S	32	S	30	S	22	S	36	S

MXF: moxifloxacina; GEN: gentamicina; KAN: canamicina; TOB: tobramicina; QDT: quinopristina/ dalfopristina; TET: tetraciclina; TGC; tigeciclina; LZD: linezolida. S: sensível; R: resistente; (A): Valores de “breakpoint” não padronizados; (j), (k) e (i): isolados *S. epidermidis* que pertencem ao mesmo indivíduo.

Tabela A2. (continuação).

Isolados	Antibióticos															
	MXF		GEN		KAN		TOB		QDT		TET		TGC		LZD	
	Halo	Fenótipo	Halo	Fenótipo	Halo	Fenótipo	Halo	Fenótipo	Halo	Fenótipo	Halo	Fenótipo	Halo	Fenótipo	Halo	Fenótipo
FMV – 50 ^(m)	36	S	34	S	32	(A)	32	S	30	S	36	S	24	S	34	S
FMV – 51 ^(m)	38	S	36	S	34	(A)	34	S	30	S	24	S	24	S	38	S
FMV – 52	36	S	38	S	34	(A)	36	S	36	S	40	S	30	S	36	S
FMV – 53	20	R	34	S	34	(A)	34	S	32	S	40	S	26	S	38	S
FMV – 54	38	S	34	S	34	(A)	34	S	30	S	10	R	22	S	34	S
FMV – 55	34	S	30	S	30	(A)	30	S	24	S	24	S	24	S	28	S
FMV – 57	36	S	30	S	30	(A)	30	S	28	S	6	R	20	S	30	S
FMV – 58	36	S	34	S	34	(A)	34	S	30	S	30	S	24	S	36	S
FMV – 59	36	S	34	S	32	(A)	32	S	30	S	18	R	24	S	36	S
FMV – 60	32	S	32	S	22	(A)	16	R	30	S	26	S	26	S	34	S
FMV – 61	38	S	30	S	30	(A)	30	S	30	S	30	S	22	S	32	S
FMV – 62	25	S	6	R	6	(A)	20	R	30	S	18	R	26	S	34	S
FMV – 63	25	S	6	R	6	(A)	16	R	30	S	18	R	27	S	32	S
FMV – 64	36	S	30	S	30	(A)	32	S	28	S	30	S	26	S	28	S
FMV – 65	38	S	34	S	32	(A)	32	S	30	S	30	S	26	S	34	S
FMV – 66	20	R	34	S	32	(A)	34	S	30	S	36	S	30	S	34	S
FMV – 67	24	S	28	S	30	(A)	30	S	30	S	30	S	26	S	34	S
FMV – 69 ^(a)	32	S	32	S	32	(A)	32	S	30	S	36	S	26	S	32	S
FMV – 70	34	S	32	S	24	(A)	16	R	30	S	32	S	24	S	34	S
FMV – 71 ^(b)	26	S	32	S	32	(A)	34	S	30	S	32	S	25	S	34	S
FMV – 72 ^(b)	36	S	32	S	34	(A)	34	S	30	S	34	S	28	S	32	S
FMV – 73	40	S	32	S	30	(A)	34	S	30	S	30	S	24	S	34	S
FMV – 74	38	S	34	S	34	(A)	34	S	34	S	6	R	24	S	32	S
FMV – 75	36	S	34	S	32	(A)	34	S	30	S	30	S	26	S	32	S
FMV – 76	32	S	26	S	26	(A)	28	S	28	S	26	S	22	S	26	S
FMV – 77	40	S	32	S	30	(A)	32	S	30	S	28	S	26	S	32	S

MXF: moxifloxacina; GEN: gentamicina; KAN: canamicina; TOB: tobramicina; QDT: quinopristina/ dalfopristina; TET: tetraciclina; TGC; tigeciclina; LZD: linezolida. S: sensível; R: resistente; (A): Valores de “breakpoint” não padronizados; (a), (b) e (m): isolados *S. epidermidis* que pertencem ao mesmo indivíduo.

Tabela A2. (continuação).

Isolados	Antibióticos															
	MXF		GEN		KAN		TOB		QDT		TET		TGC		LZD	
	Halo	Fenótipo	Halo	Fenótipo	Halo	Fenótipo	Halo	Fenótipo	Halo	Fenótipo	Halo	Fenótipo	Halo	Fenótipo	Halo	Fenótipo
FMV-78	36	S	28	S	28	(A)	30	S	24	S	28	S	24	S	30	S
FMV-79	38	S	16	R	6	(A)	20	R	30	S	20	R	26	S	32	S
FMV-80	38	S	28	S	26	(A)	30	S	28	S	30	S	28	S	32	S
FMV-81	34	S	34	S	24	(A)	18	R	30	S	6	R	28	S	34	S
FMV-82	36	S	32	S	30	(A)	32	S	32	S	32	S	29	S	32	S
FMV-83	22	R	36	S	36	(A)	38	S	26	S	36	S	30	S	32	S
FMV-84	38	S	30	S	28	(A)	32	S	28	S	6	R	25	S	30	S
FMV-85	40	S	36	S	32	(A)	36	S	30	S	30	S	28	S	32	S
FMV-86	38	S	36	S	36	(A)	36	S	32	S	36	S	34	S	36	S
FMV-87	20	R	6	R	6	(A)	6	R	28	S	28	S	26	S	32	S
FMV-88	22	R	18	R	14	(A)	22	S	30	S	18	R	30	S	34	S
FMV-89 ^(c)	40	S	32	S	32	(A)	32	S	30	S	34	S	30	S	34	S
FMV-90 ^(c)	40	S	32	S	28	(A)	32	S	30	S	30	S	28	S	32	S
FMV-91 ^(d)	40	S	34	S	32	(A)	36	S	30	S	36	S	30	S	36	S
FMV-92 ^(d)	34	S	32	S	32	(A)	32	S	30	S	34	S	30	S	34	S
FMV-93	22	R	30	S	28	(A)	30	S	28	S	28	S	24	S	28	S
FMV-94	36	S	34	S	26	(A)	12	R	32	S	6	R	30	S	34	S
FMV-96	19	R	30	S	30	(A)	32	S	28	S	27	S	27	S	33	S
FMV-97 ^(e)	24	S	15	R	10	(A)	20	R	28	S	17	R	26	S	28	S
FMV-98 ^(e)	42	S	36	S	28	(A)	22	S	32	S	38	S	30	S	33	S
FMV-99 ^(f)	19	R	30	S	30	(A)	30	S	30	S	30	S	28	S	30	S
FMV-100 ^(f)	36	S	32	S	32	(A)	32	S	28	S	34	S	30	S	34	S
FMV-101	25	S	15	R	6	(A)	19	R	30	S	18	R	29	S	32	S
FMV-102	38	S	16	R	6	(A)	15	R	30	S	30	S	28	S	34	S
FMV-103	38	S	30	S	22	(A)	12	R	30	S	32	S	28	S	34	S
FMV-104	20	R	10	R	6	(A)	15	R	32	S	6	R	29	S	36	S
FMV-105	34	S	30	S	30	(A)	30	S	30	S	30	S	25	S	28	S

MXF: moxifloxacina; GEN: gentamicina; KAN: canamicina; TOB: tobramicina; QDT: quinopristina/ dalfopristina; TET: tetraciclina; TGC; tigeciclina; LZD: linezolida. S: sensível; R: resistente; (A): Valores de “breakpoint” não padronizados; (c) a (f): isolados *S. epidermidis* que pertencem ao mesmo indivíduo.

Tabela A2. (continuação).

Isolados	Antibióticos															
	MXF		GEN		KAN		TOB		QDT		TET		TGC		LZD	
	Halo	Fenótipo	Halo	Fenótipo	Halo	Fenótipo	Halo	Fenótipo	Halo	Fenótipo	Halo	Fenótipo	Halo	Fenótipo	Halo	Fenótipo
FMV-106	38	S	34	S	32	(A)	34	S	30	S	34	S	30	S	34	S
FMV-107	36	S	30	S	30	(A)	32	S	28	S	30	S	26	S	28	S
FMV-108	36	S	30	S	30	(A)	30	S	30	S	30	S	28	S	30	S
FMV-109	38	S	30	S	22	(A)	15	R	30	S	28	S	27	S	32	S
FMV-110	36	S	34	S	34	(A)	34	S	30	S	34	S	28	S	34	S
FMV-111	32	S	28	S	28	(A)	28	S	26	S	28	S	24	S	26	S
FMV-112	40	S	34	S	34	(A)	36	S	30	S	36	S	32	S	34	S
FMV-113	34	S	28	S	30	(A)	30	S	30	S	32	S	28	S	28	S
FMV-114	34	S	16	R	6	(A)	18	R	28	S	26	S	24	S	30	S
FMV-115 ^(l)	36	S	30	S	22	(A)	14	R	32	S	26	S	26	S	32	S
FMV-116 ^(l)	34	S	28	S	22	(A)	16	R	26	S	26	S	24	S	28	S
FMV-117	34	S	28	S	28	(A)	28	S	30	S	26	S	25	S	28	S
FMV-118	32	S	30	S	30	(A)	30	S	34	S	6	R	23	S	30	S
FMV-119	32	S	26	S	26	(A)	26	S	26	S	26	S	28	S	26	S
FMV-120	36	S	30	S	28	(A)	30	S	34	S	26	S	24	S	30	S
FMV-121	22	R	30	S	30	(A)	30	S	30	S	6	R	23	S	30	S
FMV-123 ^(g)	34	S	30	S	28	(A)	30	S	28	S	30	S	26	S	28	S
FMV-124 ^(g)	34	S	28	S	26	(A)	26	S	30	S	32	S	25	S	30	S
FMV-125	24	S	30	S	30	(A)	30	S	24	S	28	S	26	S	28	S
FMV-126	34	S	28	S	28	(A)	28	S	26	S	28	S	26	S	28	S
FMV-128	24	S	30	S	28	(A)	30	S	30	S	18	R	23	S	30	S
FMV-129	24	S	12	R	6	(A)	17	R	30	S	16	R	28	S	30	S
FMV-130	20	R	34	S	32	(A)	34	S	29	S	30	S	30	S	30	S
FMV-131	36	S	30	S	20	(A)	14	R	32	S	30	S	26	S	32	S
FMV-132	22	R	10	R	6	(A)	18	R	28	S	13	R	24	S	28	S

MXF: moxifloxacina; GEN: gentamicina; KAN: canamicina; TOB: tobramicina; QDT: quinopristina/ dalfopristina; TET: tetraciclina; TGC; tigeciclina; LZD: linezolid. S: sensível; **R**: resistente; (A): Valores de “breakpoint” não padronizados; (l) e (g): isolados *S. epidermidis* que pertencem ao mesmo indivíduo.

Tabela A2. (continuação).

Isolados	Antibióticos															
	MXF		GEN		KAN		TOB		QDT		TET		TGC		LZD	
	Halo	Fenótipo	Halo	Fenótipo	Halo	Fenótipo	Halo	Fenótipo	Halo	Fenótipo	Halo	Fenótipo	Halo	Fenótipo	Halo	Fenótipo
FMV-133	34	S	28	S	22	(A)	16	R	26	S	24	S	23	S	30	S
FMV-134	38	S	30	S	30	(A)	30	S	26	S	26	S	26	S	28	S
FMV-135^(h)	26	S	6	R	6	(A)	15	R	30	S	16	R	28	S	32	S
FMV-136^(h)	38	S	32	S	30	(A)	32	S	30	S	32	S	28	S	28	S
FMV-137	26	S	30	S	28	(A)	28	S	30	S	30	S	26	S	30	S

MXF: moxifloxacina; GEN: gentamicina; KAN: canamicina; TOB: tobramicina; QDT: quinopristina/ dalfopristina; TET: tetraciclina; TGC: tigeciclina; LZD: linezolida. S: sensível; **R**: resistente; (A): Valores de “breakpoint” não padronizados; (h): isolados *S. epidermidis* que pertencem ao mesmo indivíduo.

Tabela A2. (continuação).

Isolados	Antibióticos															
	CHL		FFC		FUS		MUP		NIT		RIF		TMP		SXT	
	Halo	Fenótipo	Halo	Fenótipo	Halo	Fenótipo	Halo	Fenótipo	Halo	Fenótipo	Halo	Fenótipo	Halo	Fenótipo	Halo	Fenótipo
FMV – 22	34	S	28	(A)	14	R	46	S	32	(A)	44	S	28	S	31	S
FMV – 23	34	S	29	(A)	12	R	44	S	32	(A)	40	S	28	S	32	S
FMV – 24	34	S	27	(A)	36	S	48	S	32	(A)	40	S	28	S	32	S
FMV – 25 ^(j)	40	S	25	(A)	16	R	40	S	50	(A)	48	S	25	S	36	S
FMV – 26 ^(j)	32	S	28	(A)	34	S	40	S	28	(A)	40	S	34	S	36	S
FMV – 27 ^(k)	34	S	28	(A)	19	R	46	S	32	(A)	44	S	30	S	34	S
FMV – 28 ^(k)	34	S	28	(A)	11	R	46	S	32	(A)	42	S	30	S	32	S
FMV – 29	30	S	30	(A)	34	S	38	S	30	(A)	40	S	32	S	40	S
FMV – 30	34	S	24	(A)	40	S	46	S	32	(A)	22	R	26	S	34	S
FMV – 31	32	S	30	(A)	36	S	44	S	34	(A)	42	S	32	S	32	S
FMV – 32 ⁽ⁱ⁾	34	S	30	(A)	9	R	50	S	36	(A)	50	S	30	S	33	S
FMV – 34	22	S	26	(A)	6	R	32	S	28	(A)	42	S	28	S	28	S
FMV – 35	32	S	30	(A)	20	R	44	S	31	(A)	38	S	28	S	30	S
FMV – 36	34	S	28	(A)	36	S	46	S	32	(A)	42	S	28	S	34	S
FMV – 37	25	S	30	(A)	28	S	38	S	28	(A)	38	S	28	S	26	S
FMV – 38	34	S	28	(A)	10	R	44	S	29	(A)	40	S	30	S	32	S
FMV – 39	34	S	30	(A)	10	R	50	S	34	(A)	44	S	30	S	34	S
FMV – 40	28	S	26	(A)	13	R	42	S	30	(A)	38	S	28	S	30	S
FMV – 41	26	S	28	(A)	6	R	40	S	28	(A)	38	S	26	S	26	S
FMV – 42	36	S	30	(A)	10	R	50	S	38	(A)	46	S	30	S	34	S
FMV – 46	34	S	30	(A)	44	S	18	R	38	(A)	48	S	32	S	36	S
FMV – 47	30	S	28	(A)	12	R	46	S	32	(A)	38	S	26	S	42	S
FMV – 48	32	S	28	(A)	38	S	48	S	31	(A)	40	S	26	S	34	S
FMV – 49	36	S	30	(A)	12	R	48	S	34	(A)	44	S	30	S	32	S

CHL: cloranfenicol; FFC: florfenicol; FUS: ácido fusídico; MUP: mupirocina; NIT: nitrofurantoina; RIF: rifampicina; TMP: trimetoprim; SXT: trimetoprim-sulfametoxazole. S: sensível; **R**: resistente; (A): Valores de “breakpoint” não padronizados; (j), (k) e (i): isolados *S. epidermidis* que pertencem ao mesmo indivíduo.

Tabela A2. (continuação).

Isolados	Antibióticos															
	CHL		FFC		FUS		MUP		NIT		RIF		TMP		SXT	
	Halo	Fenótipo	Halo	Fenótipo	Halo	Fenótipo	Halo	Fenótipo	Halo	Fenótipo	Halo	Fenótipo	Halo	Fenótipo	Halo	Fenótipo
FMV – 50 ^(m)	34	S	24	(A)	38	S	42	S	34	(A)	44	S	32	S	40	S
FMV – 51 ^(m)	36	S	28	(A)	16	R	50	S	36	(A)	44	S	30	S	36	S
FMV – 52	38	S	30	(A)	44	S	50	S	38	(A)	36	S	34	S	38	S
FMV – 53	34	S	28	(A)	16	R	50	S	32	(A)	42	S	30	S	32	S
FMV – 54	36	S	28	(A)	36	S	48	S	34	(A)	44	S	27	S	30	S
FMV – 55	24	S	26	(A)	30	S	32	S	30	(A)	40	S	40	S	36	S
FMV – 57	22	S	26	(A)	28	S	36	S	40	(A)	30	S	28	S	26	S
FMV – 58	34	S	28	(A)	10	R	50	S	34	(A)	44	S	28	S	32	S
FMV – 59	32	S	26	(A)	36	S	46	S	32	(A)	40	S	32	S	34	S
FMV – 60	36	S	30	(A)	14	R	44	S	30	(A)	42	S	38	S	36	S
FMV – 61	32	S	30	(A)	36	S	44	S	30	(A)	40	S	6	R	6	R
FMV – 62	32	S	28	(A)	18	R	46	S	32	(A)	41	S	30	S	36	S
FMV – 63	34	S	29	(A)	18	R	46	S	30	(A)	38	S	31	S	32	S
FMV – 64	24	S	30	(A)	12	R	44	S	36	(A)	40	S	30	S	26	S
FMV – 65	32	S	28	(A)	34	S	44	S	32	(A)	40	S	32	S	40	S
FMV – 66	34	S	34	(A)	38	S	46	S	34	(A)	42	S	36	S	34	S
FMV – 67	28	S	25	(A)	34	S	44	S	32	(A)	42	S	32	S	30	S
FMV – 69 ^(a)	32	S	30	(A)	38	S	44	S	32	(A)	44	S	28	S	42	S
FMV – 70	32	S	28	(A)	36	S	40	S	40	(A)	30	S	32	S	38	S
FMV – 71 ^(b)	34	S	30	(A)	40	S	48	S	30	(A)	40	S	31	S	34	S
FMV – 72 ^(b)	34	S	30	(A)	34	S	48	S	34	(A)	46	S	30	S	42	S
FMV – 73	36	S	30	(A)	34	S	48	S	32	(A)	42	S	26	S	32	S
FMV – 74	34	S	32	(A)	11	R	48	S	34	(A)	18	R	30	S	30	S
FMV – 75	32	S	30	(A)	6	R	44	S	34	(A)	24	R	30	S	34	S
FMV – 76	24	S	28	(A)	28	S	40	S	24	(A)	38	S	28	S	28	S
FMV – 77	30	S	30	(A)	8	R	46	S	32	(A)	41	S	30	S	30	S

CHL: cloranfenicol; FFC: florfenicol; FUS: ácido fusídico; MUP: mupirocina; NIT: nitrofurantoína; RIF: rifampicina; TMP: trimetoprim; SXT: trimetoprim-sulfametoxazole. S: sensível; **R**: resistente; (A): Valores de “breakpoint” não padronizados; (a), (b) e (m): isolados *S. epidermidis* que pertencem ao mesmo indivíduo.

Tabela A2. (continuação).

Isolados	Antibióticos															
	CHL		FFC		FUS		MUP		NIT		RIF		TMP		SXT	
	Halo	Fenótipo	Halo	Fenótipo	Halo	Fenótipo	Halo	Fenótipo	Halo	Fenótipo	Halo	Fenótipo	Halo	Fenótipo	Halo	Fenótipo
FMV-78	30	S	30	(A)	32	S	40	S	28	(A)	38	S	30	S	30	S
FMV-79	34	S	34	(A)	34	S	44	S	30	(A)	38	S	32	S	30	S
FMV-80	30	S	28	(A)	11	R	42	S	32	(A)	26	S	28	S	30	S
FMV-81	32	S	34	(A)	6	R	44	S	32	(A)	42	S	32	S	30	S
FMV-82	34	S	34	(A)	14	R	40	S	30	(A)	42	S	42	S	37	S
FMV-83	33	S	34	(A)	40	S	44	S	40	(A)	48	S	35	S	36	S
FMV-84	29	S	32	(A)	10	R	40	S	34	(A)	37	S	34	S	30	S
FMV-85	35	S	36	(A)	38	S	44	S	34	(A)	46	S	38	S	36	S
FMV-86	36	S	38	(A)	40	S	50	S	34	(A)	38	S	36	S	42	S
FMV-87	30	S	28	(A)	10	R	44	S	28	(A)	40	S	6	R	6	R
FMV-88	34	S	34	(A)	19	R	48	S	32	(A)	42	S	34	S	36	S
FMV-89 ^(c)	32	S	34	(A)	36	S	44	S	30	(A)	42	S	36	S	42	S
FMV-90 ^(c)	30	S	30	(A)	36	S	46	S	24	(A)	42	S	30	S	30	S
FMV-91 ^(d)	34	S	36	(A)	40	S	48	S	34	(A)	42	S	34	S	34	S
FMV-92 ^(d)	32	S	34	(A)	38	S	44	S	40	(A)	42	S	42	S	36	S
FMV-93	28	S	30	(A)	34	S	44	S	24	(A)	36	S	26	S	26	S
FMV-94	34	S	34	(A)	16	R	50	S	40	(A)	44	S	32	S	34	S
FMV-96	30	S	31	(A)	16	R	42	S	30	(A)	37	S	31	S	30	S
FMV-97 ^(e)	30	S	30	(A)	13	R	40	S	30	(A)	40	S	30	S	30	S
FMV-98 ^(e)	33	S	34	(A)	38	S	44	S	32	(A)	44	S	38	S	42	S
FMV-99 ^(f)	30	S	30	(A)	34	S	40	S	28	(A)	40	S	26	S	30	S
FMV-100 ^(f)	32	S	32	(A)	10	R	44	S	32	(A)	42	S	42	S	42	S
FMV-101	30	S	34	(A)	15	R	44	S	32	(A)	40	S	32	S	32	S
FMV-102	32	S	34	(A)	10	R	46	S	34	(A)	40	S	44	S	40	S
FMV-103	30	S	36	(A)	6	R	48	S	36	(A)	18	R	46	S	40	S
FMV-104	32	S	32	(A)	6	R	48	S	34	(A)	42	S	6	R	6	R
FMV-105	28	S	30	(A)	30	S	44	S	32	(A)	42	S	30	S	38	S

CHL: cloranfenicol; FFC: florfenicol; FUS: ácido fusídico; MUP: mupirocina; NIT: nitrofurantoína; RIF: rifampicina; TMP: trimetoprim; SXT: trimetoprim-sulfametoxazole. S: sensível; **R**: resistente; (A): Valores de “breakpoint” não padronizados; (c) a (f): isolados *S. epidermidis* que pertencem ao mesmo indivíduo.

Tabela A2. (continuação).

Isolados	Antibióticos															
	CHL		FFC		FUS		MUP		NIT		RIF		TMP		SXT	
	Halo	Fenótipo	Halo	Fenótipo	Halo	Fenótipo	Halo	Fenótipo	Halo	Fenótipo	Halo	Fenótipo	Halo	Fenótipo	Halo	Fenótipo
FMV-106	30	S	32	(A)	38	S	46	S	32	(A)	40	S	40	S	42	S
FMV-107	28	S	30	(A)	6	R	36	S	30	(A)	40	S	30	S	30	S
FMV-108	30	S	30	(A)	32	S	44	S	30	(A)	40	S	28	S	30	S
FMV-109	32	S	34	(A)	34	S	46	S	30	(A)	42	S	30	S	30	S
FMV-110	30	S	30	(A)	34	S	48	S	33	(A)	42	S	40	S	34	S
FMV-111	28	S	28	(A)	28	S	36	S	28	(A)	36	S	30	S	30	S
FMV-112	32	S	34	(A)	6	R	46	S	34	(A)	46	S	34	S	32	S
FMV-113	30	S	30	(A)	30	S	42	S	28	(A)	38	S	30	S	36	S
FMV-114	28	S	30	(A)	30	S	42	S	28	(A)	42	S	30	S	30	S
FMV-115 ^(l)	30	S	34	(A)	12	R	44	S	36	(A)	44	S	34	S	30	S
FMV-116 ^(l)	26	S	28	(A)	30	S	40	S	28	(A)	38	S	28	S	26	S
FMV-117	30	S	30	(A)	34	S	44	S	30	(A)	40	S	32	S	30	S
FMV-118	30	S	30	(A)	32	S	44	S	28	(A)	38	S	30	S	28	S
FMV-119	26	S	26	(A)	28	S	40	S	26	(A)	38	S	26	S	34	S
FMV-120	30	S	30	(A)	32	S	42	S	28	(A)	38	S	30	S	28	S
FMV-121	28	S	30	(A)	10	R	40	S	30	(A)	42	S	28	S	30	S
FMV-123 ^(g)	10	R	30	(A)	32	S	40	S	28	(A)	38	S	30	S	28	S
FMV-124 ^(g)	30	S	32	(A)	32	S	44	S	30	(A)	40	S	32	S	36	S
FMV-125	28	S	30	(A)	32	S	34	S	25	(A)	35	S	32	S	30	S
FMV-126	30	S	32	(A)	6	R	38	S	26	(A)	36	S	28	S	28	S
FMV-128	9	R	30	(A)	10	R	40	S	28	(A)	36	S	28	S	28	S
FMV-129	32	S	30	(A)	18	R	40	S	30	(A)	40	S	32	S	30	S
FMV-130	30	S	30	(A)	36	S	40	S	34	(A)	44	S	32	S	32	S
FMV-131	30	S	32	(A)	34	S	40	S	32	(A)	40	S	6	R	22	S
FMV-132	28	S	26	(A)	13	R	34	S	26	(A)	36	S	28	S	28	S

CHL: cloranfenicol; FFC: florfenicol; FUS: ácido fusídico; MUP: mupirocina; NIT: nitrofurantoina; RIF: rifampicina; TMP: trimetoprim; SXT: trimetoprim-sulfametoxazole. S: sensível; R: resistente; (A): Valores de “breakpoint” não padronizados; (l) e (g): isolados *S. epidermidis* que pertencem ao mesmo indivíduo.

Tabela A2. (continuação).

Isolados	Antibióticos															
	CHL		FFC		FUS		MUP		NIT		RIF		TMP		SXT	
	Halo	Fenótipo	Halo	Fenótipo	Halo	Fenótipo	Halo	Fenótipo	Halo	Fenótipo	Halo	Fenótipo	Halo	Fenótipo	Halo	Fenótipo
FMV-133	28	S	28	(A)	30	S	42	S	30	(A)	38	S	36	S	34	S
FMV-134	30	S	30	(A)	9	R	42	S	30	(A)	40	S	30	S	28	S
FMV-135^(h)	30	S	32	(A)	16	R	42	S	30	(A)	40	S	30	S	34	S
FMV-136^(h)	25	S	26	(A)	28	S	44	S	30	(A)	40	S	30	S	32	S
FMV-137	28	S	32	(A)	32	S	42	S	28	(A)	40	S	32	S	30	S

CHL: cloranfenicol; FFC: florfenicol; FUS: ácido fusídico; MUP: mupirocina; NIT: nitrofurantoína; RIF: rifampicina; TMP: trimetoprim; SXT: trimetoprim-sulfametoxazole.
 S: sensível; **R**: resistente; (A): Valores de “breakpoint” não padronizados; (h): isolados *S. epidermidis* que pertencem ao mesmo indivíduo.

Tabela A3. Halos de inibição (mm) determinados em meio TSA.

Antibióticos		Isolados					
		FMV-20	FMV-33 ⁽ⁱ⁾	FMV-45	FMV-68 ^(a)	FMV-122	FMV-127
PEN	Halo	14	6	18	6	6	20
	Fenótipo	(A)	(A)	(A)	(A)	(A)	(A)
AMP	Halo	18	6	20	6	12	20
	Fenótipo	(A)	(A)	(A)	(A)	(A)	(A)
OXA ⁽¹⁾	Halo	24	6	28	6	6	26
	Fenótipo	(A)	(A)	(A)	(A)	(A)	(A)
FOX ⁽¹⁾	Halo	30	13	36	20	23	32
	Fenótipo	S	R	S	R	R	S
ERY	Halo	9	6	6	26	6	36
	Fenótipo	R	R	R	S	R	S
CLI	Halo	30	30 (D)	30 (D)	28	6	30
	Fenótipo	S	R ¹	R ¹	S	R	S
CIP	Halo	30	15	32	38	16	34
	Fenótipo	S	R	S	S	R	S
NOR	Halo	30	10	28	34	11	30
	Fenótipo	S	R	S	S	R	S
MXF	Halo	34	24	36	40	24	34
	Fenótipo	S	S	S	S	S	S
GEN	Halo	24	6	26	6	24	24
	Fenótipo	S	R	S	R	S	S
KAN	Halo	24	6	28	6	20	24
	Fenótipo	(A)	(A)	(A)	(A)	(A)	(A)
TOB	Halo	22	6	24	6	24	24
	Fenótipo	S	R	S	R	S	S
QDT	Halo	28	30	28	30	30	30
	Fenótipo	S	S	S	S	S	S
TET	Halo	6	14	30	28	30	32
	Fenótipo	R	R	S	S	S	S
TGC	Halo	22	26	24	25	24	28
	Fenótipo	S	S	S	S	S	S
LZD	Halo	30	28	28	30	30	30
	Fenótipo	S	S	S	S	S	S
CHL	Halo	30	24	28	30	28	28
	Fenótipo	S	S	S	S	S	S
FFC	Halo	30	26	28	30	28	32
	Fenótipo	(A)	(A)	(A)	(A)	(A)	(A)
FUS	Halo	10	15	32	35	36	11
	Fenótipo	R	R	S	S	S	R
MUP	Halo	40	40	40	45	44	42
	Fenótipo	S	S	S	S	S	S
NIT	Halo	28	30	30	30	30	32
	Fenótipo	(A)	(A)	(A)	(A)	(A)	(A)
RIF	Halo	40	40	40	25	40	40
	Fenótipo	S	S	S	R	S	S
TMP	Halo	24	20	20	29	30	38
	Fenótipo	S	S	S	S	S	S
SXT	Halo	20	20	19	24	26	30
	Fenótipo	S	S	S	S	S	S

S: Susceptível; R: resistente. R⁽¹⁾: Resistência indutível à clindamicina. (A) Valores de “breakpoint” não padronizados; (1): Leitura dos halos de inibição após 18h e 24h de incubação. (a) e (i): isolados *S. epidermidis* que pertencem ao mesmo indivíduo; PEN: penicilina; AMP: ampicilina; OXA: oxacilina; FOX: cefoxitina; ERY: eritromicina; CLI: clindamicina; CIP: ciprofloxacina; NOR: norfloxacina; MXF: moxifloxacina; GEN: gentamicina; KAN: canamicina; TOB: tobramicina; QDT: quinopristina/ dalfopristina; TET: tetraciclina; TGC: tigeciclina; LZD: linezolida; CHL: cloranfenicol; FUS: ácido fusídico; MUP: mupirocina; NIT: nitrofurantoína; RIF: rifampicina; TMP: trimetoprim; SXT: trimetoprim-sulfametoxazole.