UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE FÍSICA DE SÃO CARLOS

JESSICA BALEIRO OKADO

**Caracterização fenotípica e genotípica de *Staphylococcus aureus*
resistentes à meticilina (MRSA) isolados de sítios de infecção de pacientes
em um hospital de São Carlos**

São Carlos
2017

JESSICA BALEIRO OKADO

**Caracterização fenotípica e genotípica de *Staphylococcus aureus*
resistentes à meticilina (MRSA) isolados de sítios de infecção de pacientes
em um hospital de São Carlos**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Física do Instituto de Física de São Carlos da Universidade de São Paulo, para obtenção do título de Doutora em Ciências.

Área de concentração: Física Aplicada
Opção: Física Biomolecular
Orientador: Prof^a. Dr^a. Ilana Lopes
Baratella da Cunha Camargo

Versão Corrigida
(Versão original disponível na Unidade que aloja o Programa)

São Carlos
2017

AUTORIZO A REPRODUÇÃO E DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

Ficha catalográfica revisada pelo Serviço de Biblioteca e Informação do IFSC,
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

Okado, Jessica Baleiro

Caracterização fenotípica e genotípica de
Staphylococcus aureus resistentes à meticilina (MRSA)
isolados de sítios de infecção de pacientes em um
hospital de São Carlos / Jessica Baleiro Okado;
orientadora Ilana Lopes Baratella da Cunha Camargo -
versão corrigida -- São Carlos, 2017.

110 p.

Tese (Doutorado - Programa de Pós-Graduação em
Física Biomolecular) -- Instituto de Física de São
Carlos, Universidade de São Paulo, 2017.

1. MRSA. 2. Heteroresistência à daptomicina. 3.
hVISA. I. Camargo, Ilana Lopes Baratella da Cunha,
orient. II. Título.

A Deus, que faz tudo possível. A minha família e Felipe, com admiração e gratidão, por seu apoio sempre.

AGRADECIMENTOS

À Deus, pela vida e por me guiar no melhor caminho, mesmo quando não o percebo.

A minha família - pai, mãe, irmã - pelo apoio em todos estes anos: criação, ensinamentos, suporte financeiro e emocional.

À professora Ilana Camargo, por ter me aceitado como aluna e permitido a oportunidade do doutorado, troca de conhecimentos e pela persistência em mim e no projeto.

A Felipe, pela paciência nos momentos *workholic*; pelo apoio sempre; pelo amor para continuar.

Aos amigos, pelos momentos de descontração, companhia em noites de estudo e conselhos; pela paciência e por dividirem comigo suas histórias e aceitarem os amigos como são. Agradeço em especial à Caio Rímoli, Fernanda Fregolente, Isabela Oliveira, Marcela Nunes, Rafael Guariento, Ruan Neves, Simoni Bogni, Tamiris Rocha, Thiago Corsi.

À Professora Tereza Mendes, pela ajuda em momento de desespero e pelo bom conselho.

À Patrícia Matheus e Rafael Panhota, pela colaboração e paciência com os sequenciamentos.

A todos os funcionários do IFSC, da pós-graduação, biblioteca e gráfica, por tornarem possível o doutorado e a defesa, em especial as técnicas Derminda Isabel de Moraes, Simone Duarte, Renata Andricopulo e Susana Sculaccio.

À Nicoli Dabul, por toda ajuda, ensinamentos e momentos de descontração, lanchinhos, almoços.

À Rosineide Souza, pela companhia, pelos momentos de nascer e por do sol, por ensinar por exemplos como ser um ser humano elevado e dividir muito do laboratório.

Ao Professor Dr. Keiichi Hiramatsu, Lars Bogo, Profa. Dra. Elza Mamizuka e Dra. Lara, por cederem linhagens controles.

Aos colegas do Laboratório de Epidemiologia e Microbiologia Molecular (LEMiMo), pela paciência, convivência e troca de experiências: Alexandre Oliveira, Bruna Gardioli, Juliana Crusca, Larissa Varella, Letícia Carrasco, Nathalya Mesquita, Roberto Navais, Suelen Melo, Rafaela Fernandes.

A Ruan Neves por compartilhar seus conhecimentos em PCA e colaborar com análises por este método.

À Simoni Bogni pela ajuda técnica em experimentos de PFGE e Fernanda Fregolente pela colaboração com microdiluições.

Ao Instituto de Física de São Carlos (IFSC) e Universidade de São Paulo (USP) pelas instalações.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pelo financiamento.

“Os dias prósperos não vêm por acaso; nascem de muita fadiga e persistência. ”

Henry Ford

RESUMO

OKADO, J. B. **Caracterização fenotípica e genotípica de *Staphylococcus aureus* resistentes à meticilina (MRSA) isolados de sítios de infecção de pacientes em um hospital de São Carlos.** 2017. 110 p. Tese (Doutorado em Ciências) - Instituto de Física de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2017.

MRSA podem ser resistentes à maioria dos antimicrobianos por aquisição de elementos genéticos móveis ou mutações e algumas linhagens representam um grande desafio para o tratamento de suas infecções. Além disso, resistência heterogênea pode existir em taxas subestimadas e causar falha em tratamento. A investigação de disseminação de linhagens específicas de MRSA, adoção de medidas que diminuam a possibilidade de surtos e políticas que evitem uso excessivo de antibióticos são ações importantes que devem ser tomadas em hospitais. Este estudo objetivou caracterizar MRSA, de um hospital de São Carlos-SP, genotípica e fenotipicamente. No período de julho de 2011 a janeiro de 2012, foram isolados 34 *S. aureus* de diferentes pacientes, sendo que 27 (79,4%) foram identificados como MRSA. Tipagem por PFGE resultou em três pulsotipos e prevalência das linhagens ST105/ST5-SCCmecII. Beta hemólise e presença simultânea dos genes *seh/sei/sem/seo/sem/lukDE/hla/hlb/hlg* foram encontrados em 96,3% e 85% dos isolados, respectivamente, com nenhum isolado alta produção de biofilme, pelo método utilizado. Nos ensaios de sensibilidade, o isolado SCMSC29 foi caracterizado como *S. aureus* com resistência intermediária heterogênea à vancomicina (hVISA) e SCMSC29 e SCMSC35 como *S. aureus* não-sensíveis heterogêneos à daptomicina (hDNSSA), todos confirmados por análise de população. Na tentativa de elucidar os mecanismos de heterorresistência, foram realizados ensaios comparando os isolados heterogêneos com o sensível SCMSC31, relacionado por similaridade. O fenótipo hVISA e hDNSSA apresentado pelo isolado SCMSC29, aparenta estar relacionado com um aumento da expressão dos genes *graR*, *vraR*, *rpoB*, *mprF* e *dltA*, sutil aumento da espessura de parede celular, redução de autólise e uma mutação no gene *mprF* (T551A). O fenótipo hDNSSA de SCMSC35, pode estar associado a mutação encontrada nos genes *rpoB* (T622A), *mprF* (M347L, L720F) e aumento da espessura da parede celular. Apesar destes preocupantes fenótipos encontrados, alternativas de tratamento testadas (teicoplanina, linezolida, tetraciclina, tigeciclina, quinupristina-dalfopristina e tedizolida) foram ativas contra todos os isolados. Assim, hVISA e hDNSSA

foram encontrados entre isolados ST105/ST5-SCC*mecII*, que demonstraram mutações pontuais e tendência de espessamento de parede celular. O novo antimicrobiano tedizolida, ainda não utilizado no Brasil, possuiu alta eficiência para estes isolados, mostrada *in vitro* por ensaios de concentração inibitória mínima. A aparição dos perfis de heteroresistência é um achado preocupante e devem ser tomadas medidas para melhorar o diagnóstico deste fenótipo nos laboratórios clínicos além de se evitar disseminação. A adoção de programas de vigilância e a cautela no uso destes antibióticos são importantes para monitorar possível disseminação e para não haver seleção de clones resistentes e co-resistentes a vários outros antibióticos.

Palavras-chave: MRSA. Heteroresistência à daptomicina. hVISA.

ABSTRACT

OKADO, J.B. **Phenotypic characterization of Meticillin resistant *S. aureus* (MRSA) isolated from infection sites of patients from a São Carlos (SP) hospital.** 2017. 110 p. Tese (Doutorado em Ciências) - Instituto de Física de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2017.

MRSA may be resistant to most antimicrobials by the acquisition of mobile genetic elements or mutations and some strains represent a huge challenge for infection treatment. In addition, heterogeneous resistance may exist at underestimated rates and cause treatment failure. Actions such as research of specific MRSA strains spread, adoption of measures that reduce the possibility of outbreaks and policies that avoid excessive use of antibiotics are important and must be taken in hospitals. This study aimed to characterize genotypically and phenotypically, MRSA from a São Carlos-SP hospital. From July 2011 to January 2012, 34 *S. aureus* from different patients were isolated, among those 27 (79.4%) were identified as MRSA. Typing by PFGE resulted in three pulsotypes and prevalence of ST105/ST5-SCCmecII strains. Beta hemolysis and simultaneous presence of the *seh* / *sei* / *sem* / *seo* / *sem* // *lukDE* / *hla* / *hly* / *hlg* genes were found in 96.3% and 85% of the isolates, respectively, with no good biofilm forming sample. In the sensitivity assays, SCMSC29 isolate was characterized as *S. aureus* heterogeneous vancomycin intermediate resistant *S. aureus* (hVISA) and SCMSC29 and SCMSC35 as heterogeneous daptomycin non-susceptible *S. aureus* (hDNSSA), all confirmed by population analysis profile. In order to elucidate mechanisms of heteroresistance, we performed several comparative analyses between heterogeneous samples and a related sensitive isolate (SCMSC31). The hVISA and hDNSSA phenotype presented by the SCMSC29 isolate appeared to be related to increased expression of *graR*, *vraR*, *rpoB*, *mprF* and *dltA* genes, slight increase in cell wall thickness, reduction of autolysis and a mutation in the *mprF* (T551A), when compared to SCMSC31. The hDNSSA phenotype of SCMSC35 may be associated with a mutation found in *rpoB* (T622A), *mprF* (M347L, L720F) and increased cell wall thickness. Despite these worrying phenotypes found, treatment alternatives tested (teicoplanin, linezolid, tetracycline, tigecycline, quinupristin-dalfopristine and tedizolide) were active against all isolates. In conclusion, hVISA and hDNSSA were found to be among ST105/ST5-SCCmecII lineage and demonstrated cell wall thickening. The new antimicrobial tedizolide, not yet used in Brazil, had greater efficiency,

shown in vitro by tests of minimum inhibitory concentration. The appearance of heteroresistance profiles is a troubling finding and measures should be taken to improve the diagnosis of this phenotype in clinical laboratories in addition to avoiding dissemination. The adoption of surveillance programs and the caution in the use of these antibiotics are important to monitor possible dissemination and to avoid the selection of resistant clones and co-resistant to several other antibiotics.

Keywords: MRSA. Daptomycin heteroresistance. hVISA.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Estrutura de elemento <i>SCC_{mec}</i>	27
Figura 2	Respostas a antimicrobianos de populações homogêneas e heterogêneas.....	29
Figura 3	Mutações encontradas em <i>rpoB</i> , associadas a diminuição de sensibilidade a antimicrobianos.....	30
Figura 4	Regiões preferenciais de mutações no gene <i>mprf</i> associadas à resistência à daptomicina.....	33
Figura 5	Diferenças estruturais entre tedizolida, fosfato de tedizolida e linezolida.....	37
Figura 6	Dendrograma de similaridade com dados das isolados e de tipagem molecular.....	68
Figura 7	Dendrograma de similaridade com perfis de virulência.....	69
Figura 8	Agrupamento das isolados baseado no perfil de virulência.....	70
Figura 9	Análise <i>pca1</i> x <i>pca2</i> comparada com pulstotipos.....	71
Figura 10	Dendrograma de similaridade com famílias plasmídeos presentes.....	72
Figura 11	Comparação entre perfis de virulência e de família de plasmídeos.....	73
Figura 12	Curva de análise de população para vancomicina.....	77
Figura 13	Análise de população para daptomicina.....	78
Figura 14	Expressão gênica relativa normalizada.....	82
Figura 15	Espessura de parede medida por microscopia eletrônica de transmissão	83
Figura 16	Ensaio de autólise na presença de triton X-100.....	84
Figura 17	Despolarização de membrana na presença de daptomicina à 16µg/ml....	85
Figura 18	Curva de crescimento em meio MHCA.....	86
Figura 19	Curva de crescimento em meio BHI.....	86

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Iniciadores utilizados para tipagem por MLST	49
Tabela 2	Iniciadores utilizados para determinação elemento SCCmec.	49
Tabela 3	Iniciadores utilizados para determinação de famílias de plasmídeos.	53
Tabela 4	Pontos de corte utilizados para antimicrobianos testados	56
t	Iniciadores utilizados no sequenciamento dos genes rpoB,	
Tabela 5	mprF, graRS e vraRS	60
Tabela 6	Primers utilizados para amplificação de qPCR	62
Tabela 7	Resultados do antibiograma do hospital, por Vitek ®	74
Tabela 8	Concentrações inibitórias mínimas (CIM's), em µg/mL, para os antimicrobianos	75
Tabela 9	Valores de MIC50 e MIC90 para todos os antimicrobianos testados	76
Tabela 10	Resumo dos resultados em relação presença de população resistente intermediária heterogênea para vancomicina	78
Tabela 11	Mutações encontradas em genes relacionados à heterorresistência à daptomicina e vancomicina	80
Tabela 12	Níveis de expressão relativos dos genes pesquisados	81

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
BHI	Infusão de Cérebro e Coração, do inglês, “ <i>Brain and Heart Infusion</i> ”
BEC	Clone Endêmico Brasileiro
CA-MRSA	MRSA associados à comunidade
CC	Complexo Clonal
CCCC	Carbonilcianeto 3-clorofenil-hidrazona, do inglês “ <i>Cabonil Cyanide 3-clorofenilhidrazona</i> ”
CEP	Comitê de Ética em Pesquisa
CIM	Concentração Inibitória Mínima
CIM₅₀	Concentração Inibitória Mínima para inibir 50% da população
CIM₉₀	Concentração Inibitória Mínima para inibir 90% da das isolados estudados
CLSI	Instituto de Padrões Clínicos e laboratoriais, do inglês, “ <i>Clinical & Laboratorial Standards Institute</i> ”
D-Ala-D-Ala	D-Alanina-D-Alanina
DNA	Ácido desoxirribonucleico
dNTP	Trifosfato Deoxinucleotídico, do inglês “ <i>Deoxynucleotide Triphosphate</i> ”
DO	Densidade ótica
DR	Repetição direta, do inglês, “ <i>Direct Repeat</i> ”
EGM's	Elementos Genéticos Móveis
ET	Toxinas Esfoliativas, do inglês, “ <i>Esfoliative Toxins</i> ”
EUCAST	Comitê Europeu para Testes de Sensibilidade de Antimicrobianos do inglês, “ <i>European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing</i> ”
FDA	Administração de drogas e comidas, do inglês “ <i>Food and Drug Administration</i> ”
FnBP	Proteínas Ligadoras de Fibronectina, do inglês, “ <i>Fibronectin Binding Protein</i> ”
hDNSSA	<i>Staphylococcus aureus</i> com resistência heterogênea à daptomicina, do inglês, “ <i>heterogeneous Daptomycin Resistant Staphylococcus aureus</i> ”
HLA	Alfa hemolisina
HLB	Beta hemolisina
HLD	Delta hemolisina
HLG	Gama hemolisina
hVISA	<i>Staphylococcus aureus</i> com resistência intermediária heterogênea à vancomicina, do inglês, “ <i>heterogeneous Vancomycin Intermediate Staphylococcus aureus</i> ”
IR	Repetição Invertida, do inglês, “ <i>Inverted Repeat</i> ”
IRAS	Infecção Relacionada à Assistência à Saúde
LEMiMo	Laboratório de Epidemiologia e Microbiologia Molecular
MATE	Extrusão multidrogas e de compostos tóxicos, do inglês, “ <i>multidrug and toxic compound extrusion</i> ”
MFS	<i>Major Facilitator Superfamily</i>
MLST	Tipagem por Sequenciamento Multilocus, do inglês, “ <i>Multilocus</i> ”

	<i>Sequence Typing</i>
MPCR	Multiplex PCR
mRNA	RNA mensageiro
MRSA	<i>Staphylococcus aureus</i> resistente à meticilina, do inglês, “ <i>Meticillin Resistant Staphylococcus aureus</i> ”
PAP	Análise de Perfil de População do inglês, “ <i>Population Analysis Profile</i> ”
PBP	Proteína Ligadora de Penicilina, do inglês, “ <i>Penicillin Binding Protein</i> ”
PCA	Análise das Componentes Parciais, do inglês, “ <i>Partial Component Analysis</i> ”
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase, do inglês, “ <i>Polymerase Chain Reaction</i> ”
PFGE	Eletroforese em gel de Campos Pulsados, do inglês, “ <i>Pulsed Field Gel Electrophoresis</i> ”
PIA	Adesina Polissacarídica Intercelular, do inglês, “ <i>Polyssaccharide Intercellular Adhesin</i> ”
PVL	Leucocidina Panton Valentine, do inglês, “ <i>Panton Valentine Leukocidin</i> ”
RFLP	Tipagem por Polimorfismo de Comprimento de Fragmento de Restrição, do inglês, “ <i>Restriction Fragment Length Polymorphism</i> ”
RNA	Ácido ribonucleico
rRNA	RNA ribossômico
SAG	Superantígeno
SCCmec	Cassete Cromossômico Estafilocócico <i>mec</i> , do inglês, “ <i>Staphylococcal Cassette Chromosome mec</i> ”
SE	Exotoxina Estafilocócica, do inglês, “ <i>Staphylococcal Enterotoxin</i> ”
SEI	Toxinas parecidas com estafilocócicas, do inglês, “ <i>Staphylococcal exotoxin like</i> ”
SLV	Variante de Locus Único, do inglês, “ <i>Single Locus Variant</i> ”
ST	Tipo de Sequência, do inglês, “ <i>Sequence Type</i> ”
tRNA	RNA transportador
TSS	Síndrome do Choque Tóxico, do inglês, “ <i>Toxic Shock Syndrome</i> ”
UFC	Unidades Formadoras de Colônias
VISA	<i>Staphylococcus aureus</i> com resistência intermediária à vancomicina, do inglês, “ <i>Vancomycin Intermediate Staphylococcus aureus</i> ”
VRE	Enterococos resistentes à vancomicina, do inglês, “ <i>Vancomycin Resistant Enterococi</i> ”
VRSA	<i>Staphylococcus aureus</i> resistentes à vancomicina, do inglês, “ <i>Vancomycin Resistant Staphylococcus aureus</i> ”

LISTA DE SÍMBOLOS

°C	Graus Celsius
Mpb	Mega pares de base
C	Citosina
G	Guanina
mL	Mililitros
Rpm	Rotações por minuto
µg	Micrograma
ng	nanogramas
U	Unidades de taq polimerase
µM	Micromolar
MgCl₂	Cloreto de Magnésio
mM	Milimolar
Pb	Pares de base
≥	Maior ou igual
U	Uracila
Kb	Kilobases
A	Alanina
T	Timina
V	Volts
Cm	Centímetros
°	Graus
nm	Nanômetros
≤	Menor ou igual

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	23
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	25
2.1	<i>Staphylococcus aureus</i>	25
2.2	Histórico de resistências e linhagens	25
2.3	Plasmídeos	38
2.4	Fatores de virulência.....	39
2.5	Biofilmes	41
3.	OBJETIVOS	43
3.1	Objetivo geral	43
3.2	Objetivos específicos	43
4	MATERIAIS E MÉTODOS	45
4.1	Comitê de Ética	45
4.2	Amostras de MRSA.....	45
4.3	Extração de DNA.....	45
4.4	Caracterização genotípica.....	46
4.4.1	Eletroforese em gel de Campos Pulsados.....	46
4.4.2	Tipagem por sequenciamento de Multilocus.....	47
4.4.3	Determinação de elemento SCC _{mec}	48
4.4.4	Perfil de virulência.....	50
4.4.5	Determinação da família de plasmídeos	52
4.5	Caracterização fenotípica	54
4.5.1	Determinação do perfil de sensibilidade	54
4.5.2	Triagem para hVISA	57
4.5.3	Análise de população.....	57
4.5.4	Determinação do padrão de hemólise.....	58
4.5.5	Investigação para produção de biofilme	58
4.6	Pesquisa por mecanismos de heterorresistência	59
4.6. 1	Sequenciamento dos genes <i>graSR</i> , <i>vraSR</i> , <i>mprF</i> e <i>rpoB</i>	59
4.6.2	Expressão gênica relativa dos genes <i>graR</i> , <i>vraR</i> , <i>mprF</i> , <i>rpoB</i> e <i>dltA</i> para isolados heterogêneas	61
4.6.3	Análise de espessura da parede celular.....	63

4.6.4	Ensaio de autólise.....	64
4.6.5	Despolarização de membrana.....	64
4.6.6	Curvas de crescimento	65
5	RESULTADOS E DISCUSSÕES.....	67
5.1	Amostras de MRSA	67
5.2	Tipagem molecular	67
5.3	Tipagem fenotípica	73
5.4	Pesquisa por mecanismos de heterorresistência.....	80
6	CONCLUSÕES.....	89
	REFERÊNCIAS.....	91
	APÊNDICE 1- Primers utilizados para determinação do perfil de virulência.....	101
	APÊNDICE 2- Dendrograma com todos os dados.....	105
	ANEXO 1 – Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa.....	105
	ANEXO 2 – Dados dos isolados que vieram do hospital.....	11109

1 INTRODUÇÃO

Staphylococcus aureus resistentes à metilina (MRSA) são causa de grande preocupação em ambientes hospitalares e na comunidade, devido sua habilidade de adquirir resistência a diversos antimicrobianos, colonizar indivíduos por longos períodos de modo assintomático e serem um dos maiores causadores de infecção relacionada à assistência à saúde (IRAS). Podem ainda adquirir resistência heterogênea a antibióticos, que resulta em maior chance de falhas de tratamento. Mecanismos de resistência heterogênea ainda não são completamente elucidados, além de suas taxas serem subestimadas. O objetivo principal deste trabalho é caracterizar fenotípica e genotipicamente os isolados de MRSA de infecções de pacientes de um hospital da cidade de São Carlos (SP, Brasil) e investigar possíveis mecanismos de resistência heterogênea dentre os isolados do estudo.

O aumento de casos de MRSA e resistência a antibióticos são preocupantes, principalmente para saúde pública, já que são associados com o aumento da mortalidade e tempo de internação, logo, maior uso de recursos financeiros. Estudos desta natureza podem fornecer dados importantes para os médicos e enfermeiros, tais como determinar se houve ou não a disseminação de linhagens entre os indivíduos estudados, que geram subsídios para se iniciar medidas de controle de infecções mais rígidas. Tais providências contribuem com a diminuição dos casos de infecções hospitalares, diminuindo também o tempo de internação dos pacientes e, conseqüentemente, o custo destes para o hospital. Ainda, analisando o perfil de sensibilidade de linhagens endêmicas, o estudo pode mostrar qual antimicrobiano tem maior chance de sucesso em uma terapia empírica em uma IRAS neste hospital.*

* Tese de doutorado escrita de acordo com a Associação Brasileira de Normas Técnicas NBR 6023 e ABNT NBR 14724

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 *Staphylococcus aureus*

Staphylococcus aureus são microrganismos tanto comensais como patogênicos, que podem ser facilmente adquiridos, pois se encontram comumente dispersos em partículas no ar ou em superfícies, estando presentes na microbiota humana do trato respiratório superior e na pele. (1) Sua transmissão é dada por contato direto com superfícies contaminadas, sejam estas do ambiente ou de indivíduos. São bactérias gram-positivas, aeróbias facultativas, não-esporulantes, capazes de sobreviver a condições adversas de temperatura (de 7°C a 48,5°C), pH (4,2 a 9,3) e altas concentrações de cloreto de sódio (até 15%). (2)

Staphylococcus aureus são patógenos bem adaptados devido a uma combinação de fatores: virulência mediada por toxinas, capacidade de sobreviver e colonizar por longos períodos e resistência a antibióticos. (2) Uma característica fundamental para o sucesso deste patógeno, é sua capacidade de colonizar indivíduos assintomaticamente por longos períodos. Aproximadamente 30% dos adultos são colonizados de modo crônico por esta bactéria no trato respiratório. (3) Possuem ainda habilidade incrível de aquisição de elementos genéticos móveis. Prova disso é que seu genoma possui em torno de 2-3 Mpb, com baixo conteúdo C+G, com variabilidade de cerca de 20% em seu tamanho. Tal variabilidade deve-se a aquisição ou perda de elementos genéticos móveis, tais como: elementos cassette cromossômicos, ilhas de genômicas de patogenicidade ou resistência, transposons e plasmídeos. (4)

Essa bactéria é uma das maiores causas de IRAS. Ocasiona desde infecções simples, como espinhas e intoxicações alimentares, a graves, como síndrome do choque tóxico e sepse, sendo que algumas infecções dependem de fatores de virulência produzidos. (2,5) Em 2013, dados do controle de doenças dos Estados Unidos indicaram que cerca de 80.000 pessoas/ano adquirem infecções graves devido à MRSA nos Estados Unidos e cerca de 11.000 pessoas/ano morrem por infecções causadas por MRSA.

2.2 Histórico de resistências e linhagens

Desde o início de terapias antimicrobianas, o aparecimento de resistência antimicrobianos nesta espécie ocorreu anteriormente às outras. (1) Em 1941 a penicilina foi

introduzida em uso clínico e em 1944, emergiu o primeiro caso de *S. aureus* resistente. (6) No meio da década de 40 já havia, nos hospitais, aumento no número de isolados resistentes à penicilina devido à ação de penicilinas, e em 1950 essas linhagens já eram consideradas pandêmicas. (3) O mesmo efeito, de rápida observação de resistência após introdução de antimicrobiano, foi observado após a introdução da meticilina, outro betalactâmico. Esta foi inicialmente utilizada na clínica em 1959, e, em 1961, apenas dois anos após sua introdução, ocorreu o primeiro caso relatado de *Staphylococcus aureus* resistente à meticilina (MRSA, do inglês, “*Methicillin Resistant Staphylococcus aureus*”), resistentes também a todos os outros betalactâmicos. (3, 6) Ainda, recentemente foi descrito por Harkins e colaboradores que a resistência à meticilina pela aquisição do elemento SCCmec ocorreu antes mesmo da introdução do antimicrobiano na clínica. (7)

Resistência à meticilina é causada pela presença de uma proteína ligadora de penicilina (PBP, do inglês, “*Penicillin Binding Protein*”) homóloga, com baixa afinidade à betalactâmicos, PBP2A ou PBP2'. PBP2' é codificada pelo gene *mecA*, ou seu homólogo mais recentemente descrito, *mecC*. (6, 8) Tais genes estão contidos no elemento genético móvel *Staphylococcus Cassete Chromosome mec* (SCCmec). Provavelmente, *S. sciuri* atuou como doador deste elemento para *S. aureus*, pois possui uma PBP que compartilha 87,8% de similaridade da sequência de aminoácidos com a PBP2A encontrada em MRSA. (6)

O elemento SCCmec possui uma estrutura bem definida, com a presença de genes para recombinases (*ccrA*, *ccrB*, *ccrC*), que fazem parte do complexo *ccr*, e genes regulatórios (*mecR*, *mecI*), que podem ser truncados ou não, e fazem parte do complexo *mec*. Ainda, todos os elementos SCCmec conhecidos estão posicionados após a região *OrfX* do cromossomo e entre complexo *mec* e complexo *crr* possuem regiões de junção variáveis, que podem conter genes de resistência. Esquema da estrutura básica do SCCmec é ilustrado na Figura 1. Até hoje, 11 tipos destes elementos foram descritos e podem ser relacionados com linhagens de MRSA. (9)

Alguns clones de MRSA circularam em hospitais europeus até a década de 70 e, a partir da década de 80, esses clones foram substituídos por outros mais bem adaptados e que se espalharam internacionalmente. (3) Até os anos 2000, praticamente cinco principais linhagens foram definidas como clones bem-sucedidos, por possuírem capacidade de causar infecção, persistir no ambiente e de se disseminar geograficamente em determinados locais, levadas pelo aumento de viagens. Tais linhagens chegaram a representar cerca de 70% de todos os isolados de MRSA. (10) Essas foram denominadas de acordo com os locais onde

eram endêmicas e caracterizadas por Tipo de Sequência (ST, do inglês “*Sequence Type*”) e tipo de elemento *SCCmec*. Alguns dos principais clones pandêmicos são: Nova York/Japão (ST5-*SCCmec*II), Brasileiro (ST239-*SCCmec*IIIa), Ibérico (ST247-*SCCmec*I), Húngaro (ST239-*SCCmec*III), Pediátrico (ST5-*SCCmec*IV), Cordobês-Chileno (ST5-*SCCmec*I), USA300 (ST8-*SCCmec*IV). (10)

Figura 1 - ESTRUTURA DE ELEMENTO *SCCmec*. Elemento é flanqueado por repetições diretas (DRs), que contém sequências de sítio de inserção (ISS), reconhecidas por recombinases do cassete cromossômico (*ccr*). Nas extremidades existe um par de repetições invertidas (IRs) e contém os complexos *mec* e *ccr*, e as regiões de junção J1, J2 e J3.

Fonte: Adaptada de HIRAMATSU et al.(9)

O aumento de infecções causadas por MRSA causou também aumento no uso de vancomicina, descoberta em 1952 e introduzida para uso clínico em 1958, reservada para uso como antimicrobiano de última escolha. (11-12) A vancomicina age de forma bactericida inibindo a síntese da parede celular do lado externo da membrana bacteriana, se ligando ao peptídeoglicano precursor da parede celular, na porção C-terminal D-Ala-D-Ala, impedindo, a segunda etapa da síntese da parede, de forma a inibir crescimento bacteriano. (13-12)

Em 1996, no Japão, foi isolado o primeiro *Staphylococcus aureus* com resistência intermediária à vancomicina, VISA (do inglês, “*Vancomycin Intermediate Staphylococcus aureus*”). (14) Pouco tempo após a emergência de isolados VISA, em 1997, foram observados isolados de MRSA considerados sensíveis à vancomicina, com presença de subpopulações com padrões de resistência à vancomicina atípicos, denominados com resistência intermediária heterogênea, hVISA. (12,14)

O termo “resistência heterogênea” a um antibiótico foi utilizado pela primeira vez, em 1947, para *H. Influenzae*. (15) Amostras bacterianas homogêneas possuem subpopulações com variações pequenas no valor da concentração inibitória mínima, enquanto isolados heterogêneos possuem subpopulações com intervalo de variação do valor de concentração inibitória mínima maior, conforme mostrado na Figura 2. Uma vez que heterorresistência é

caracterizada pela presença de uma parcela da população bacteriana com concentração inibitória mínima (CIM) diferente, é possível existência de três tipos de heterorresistência: população completamente sensível a um antibiótico, mas com presença de subpopulações com diferentes CIM's de sensibilidade, que respondem diferentemente, e todas estejam inibidas na faixa de sensibilidade, não sendo um problema para clínica; o caso em que toda a população seja resistente a um antibiótico, embora haja presença de subpopulação com CIM diferentes, toda a população possui CIM de resistente, e o caso mais preocupante, em que a maior parte da população bacteriana é sensível a um antibiótico, com uma parcela pequena de subpopulação com resistência. Testes tradicionais caracterizam tais isolados como sensíveis, mas tratamento com concentrações de sensibilidade ao antimicrobiano pode selecionar minoria resistente, levando à falha do tratamento. (15) Os três casos são ilustrados em esquema na Figura 2.

Figura 2 - RESPOSTAS A ANTIMICROBIANOS DE POPULAÇÕES HOMOGÊNEAS E HETEROGÊNEAS.

Em testes tradicionais, populações homogêneas (parte superior da figura) podem ser caracterizadas como sensíveis (S), resistentes intermediárias (I) ou resistentes (R). Populações heterogêneas (parte inferior da figura) podem ser completamente sensíveis a um antibiótico, mesmo com subpopulações com diferentes CIM's, sendo menos importante clinicamente. Ou podem ter ainda a maior parte da população é sensível com minoria resistente, que pode causar falhas em tratamentos ou ser toda a população resistente com subpopulações com diferentes CIMs de resistência.

Fonte: Elaborada pela autora. Adaptada de EL-HALFAWY; VALVANO(15)

Casos de resistência heterogênea são difíceis de detectar, sendo o Perfil de Análise de População (PAP) o método padrão ouro indicado. Isto porque, a maior parte da população pode ser sensível, e, métodos tradicionais de disco difusão, microdiluição ou Etest não serão sensíveis o suficiente para detectar uma parcela pequena com sensibilidade reduzida, pois utilizam pequena quantidade de inóculo. (11-12,15-16) PAP é um método muito trabalhoso e por este motivo, laboratórios de hospitais, em geral, não possuem disponibilidade para realizá-

lo. Experimento de PAP consiste em observar crescimento bacteriano em várias concentrações de antibiótico, com concentrações variadas de bactéria inoculada para realizar contagem de células que crescem em diferentes concentrações do antibiótico testado e traçar curva de crescimento utilizando gráfico do logaritmo (log) de unidades formadoras de colônias por mL (UFC/mL) versus a concentração do antibiótico. (11)

Em relação à morfologia, é descrito que linhagens de hVISA possuem colônias com morfologia heterogênea, com presença de colônias pequenas e podem possuir espessamento da parede celular. (11) Em Etest, presença de colônias dentro do halo de inibição podem indicar existência de hVISA, mas não é um método indicado para a identificação. Em microdiluição, mudanças de valor de CIM ou crescimento em placas com 4 µg/mL de vancomicina também são indicadores de potencial hVISA. Em todos estes casos, fenótipo de resistência heterogênea deve ser confirmado por PAP. (14-15)

Especificamente, no caso da vancomicina, para análise do gráfico gerado por PAP para confirmação de fenótipo hVISA, existem os critérios de Hiramatsu et al (1997), Wootton et al (2001) e El-Halfawy e Valvano (2015). (14-16) O critério de Hiramatsu considera como hVISA, isolados que crescem pelo menos 10^1 UFC, em concentrações de resistência intermediária, na qual linhagens homogeneamente sensíveis deveriam ser completamente inibidas. (14) No caso da vancomicina, de 4 µg/mL, concentração esta de níveis de resistência intermediária, determinada pelo CLSI. (17) O critério proposto Wootton e colaboradores, considera a razão da área abaixo da curva entre isolado estudada e controle hVISA, Mu3. (16) O isolado é considerada hVISA caso esta razão seja $\geq 0,9$, ou seja, mais que 90% similar ao controle hVISA Mu3. O critério de El-Halfawy e Valvano considera que linhagens heterorresistentes são capazes de crescer em concentrações maiores que duas vezes a CIM do isolado, para o antimicrobiano de interesse, enquanto isolados com sensibilidade homogênea crescem apenas até duas vezes a sua CIM. (14)

Resistência heterogênea à vancomicina em *S. aureus* não está relacionada a um mecanismo em particular. Várias mutações descritas são relacionadas com este fenótipo, dentre elas, em genes regulatórios, tais como locus *agr*, sistemas *vraSR*, *graSR*, *walKR*, *rpoB*, operon *dltABCD* e *mprF*. (11) Fenótipos VISA e hVISA são causados por mutações pontuais, que se acumulam, diminuindo sensibilidade à vancomicina, se tratando de um fenômeno de vários passos, com hVISA como um intermediário entre os dois. (11-12) Estima-se que primeiramente ocorra mutação no sistema regulatório *VraSR*, que está intimamente ligado com o aparecimento de linhagens hVISA e subsequentemente, mutação

no sistema *graSR* estaria ligada ao surgimento de linhagens VISA. (19-20) Além do espessamento da parede celular, outras observações comuns em isolados VISA são: redução do acesso à vancomicina ao seu sítio ativo, aumento da produção de mucopeptídeos, aumento da expressão da PBP2 ou PBP2', aumento dos resíduos D-Ala-D-Ala, redução da atividade autolítica (ligado à mutações no locus *agr*) e redução da taxa de crescimento. (11)

Cerca de 64% das linhagens clínicas VISA descritas possuem ao menos uma mutação em *rpoB*. Este codifica a subunidade beta da RNA polimerase, sendo que mutações neste gene são consideradas mutações regulatórias, pois não são no gene do alvo do antimicrobiano, mas em um gene que regula expressão de componentes celular associados ao mecanismo de ação. (18) A figura 3 mostra a localização no gene *rpoB* das mutações mais significantes encontradas na literatura.

Figura 3 - MUTAÇÕES ENCONTRADAS EM *rpoB*, ASSOCIADAS A DIMINUIÇÃO DE SENSIBILIDADE A ANTIMICROBIANOS. Acima do esquema do gene estão listadas mutações encontradas em linhagens selecionadas *in vitro* e a consequência nas concentrações inibitórias mínimas. Abaixo, constam mutações encontradas em isolados clínicos.

Fonte: HIRAMASTU et al. (9)

Mutação no *vraS*, que codifica para um sensor histina quinase, leva a regulação do sistema de dois componentes *VraSR* e conversão para o fenótipo de hVISA, sendo que *vraR* regula mais de 40 genes. Mutações em *graR*, que é regulador de resposta de *graS* podem ocasionar aumento de expressão operon capsular, do operon *dltABCD* (responsável pela

alanilação dos ácidos teicóicos), aumento da expressão do sistema *vraSR*, aumento de expressão de *mprF* (ligado a carga positiva do envelope celular) e diminuição da autólise de parede celular. (11) Mutações no sistema regulatório WalKR (também conhecido como YycG/YycF) estão também relacionadas no controle do metabolismo da parede celular, sendo estas mutações encontradas também em linhagens VISA. (11-12, 15)

Um estudo de Katayama e colaboradores (2016), conseguiu reproduzir *in vitro* o fenótipo de VISA, com mutações sequenciais em *vraS*, *mrsR*, *graR*, *rpoB*. Este fenótipo, ao contrário do esperado, não apresentou espessamento da parede celular, sendo necessários passos adicionais de mutações em *fdh2*, para converter espessamento de parede constitutivo. (19)

O primeiro caso de resistência a altas concentrações de vancomicina ocorreu apenas em 2002 (cerca de 50 anos após descoberta da vancomicina), nos Estados Unidos. (11) Os chamados *Staphylococcus aureus* resistentes à vancomicina, VRSA (do inglês, “*Vancomycin Resistant Staphylococcus aureus*”) são raros, mas de incidência crescente. Ao contrário dos casos VISA e hVISA, resistência a altos níveis de vancomicina é devido à aquisição de elementos genéticos móveis. Resistência completa à vancomicina é causada pela aquisição do transposon Tn1546 de enterococos resistentes à vancomicina (VRE's, do inglês “*Vancomycin Resistant Enterococcus*”). (21) A preocupação com o número crescente de casos é maior em países com alta taxa de VRE, doador do transposon. Em isolados VRSA, o transposon Tn1546 contém um *cluster* de genes *vanHAXYZ*, que troca a porção D-Ala-D-Ala, por D-Ala-D-Lactato, impedindo a ligação da vancomicina. (13)

Até hoje, apenas cerca de 20 casos de VRSA foram descritos e confirmados em alguns países, (22) sendo que estes números são crescentes. Por exemplo, foram encontrados 13 isolados nos Estados Unidos, (23) um no Irã, (24) na Índia, (25-27) alguns no Sudão, (28-29) um no Brasil em 2012 (21) e o primeiro VRSA da Europa, em Portugal, isolado em Lisboa, em 2013, pertencente ao CC5 (ST105-SCCmecII), que tem sido relacionado ao fenótipo VRSA. (30)

Alguns fatores de risco que aumentam a chance de infecções por VRSA são: prévia infecção por VRE, colonização ou infecção por MRSA, colonização simultânea por VRE e MRSA, exposição à vancomicina e comorbidades como diabetes e úlceras crônicas. O tratamento com vancomicina em dosagens maiores que 15 µg/mL aumenta riscos de toxicidade renal, principalmente em pacientes que já são tratados com outros remédios nefrotóxicos. Desta forma, em casos de redução de sensibilidade à vancomicina, outros antibióticos

devem ser indicados, por exemplo, linezolida e tigeciclina. Daptomicina pode ser indicada, mas possui maiores riscos de falhar em isolados que falham com vancomicina, como será abordado posteriormente. (12)

A elevação dos valores de CIM de vancomicina possui consequências importantes para eficiência do antibiótico e impacto em taxas de mortalidade por bacteremia causada por MRSA. Consequentemente, para clínica, seria razoável considerar tratamento com vancomicina apenas para isolados com CIM abaixo de 1 µg/L, já que isolados com CIM maior que este podem apresentar falha de tratamento por presença de resistência heterogênea. Como citado anteriormente, presença de hVISA raramente pode ser investigada em testes realizados nos hospitais, que normalmente utilizam métodos automatizados para estimar a CIM. Tais métodos são capazes de estimar apenas 10% dos MRSA hVISA com CIM de 2 µg/mL. (12)

Outro antimicrobiano glicopeptídeo recomendado para tratamento de MRSA é a teicoplanina, que é usada no Brasil para tratamento de infecções causadas por Gram-positivos. (31) Teicoplanina age na etapa final da polimerização da cadeia de peptideoglicanos da parede celular. (32) Isolados resistentes à teicoplanina podem apresentar redução de sensibilidade à vancomicina, (14) bem como é descrito que uso prévio de teicoplanina pode selecionar mutações que levam ao perfil VISA. (11,33)

Opções mais recentes para tratamento de infecções por MRSA são daptomicina, linezolida e tigeciclina. (12) Daptomicina é um lipopeptídeo com ação bactericida aprovado para uso clínico em 2003 nos Estados Unidos, e, em 2008 no Brasil. (34-35) Por possuir parte lipídica, é capaz de se inserir na membrana, numa reação cálcio dependente, que leva à despolarização da membrana, indução de curvatura na posição dos lipídeos da membrana e posterior liberação de potássio intracelular, queda do potencial de membrana, inibição da síntese de DNA, RNA e morte da bactéria. (35-37)

Resistência à daptomicina é rara (CIM $\geq$ 1µg/mL), mas crescente, e já foi encontrada no Brasil. (34) Isolados com redução de sensibilidade geralmente apresentam mutações associadas com aumento de carga do envelope celular, estrutura da membrana e espessamento da parede, e, assim como para vancomicina, também apresenta mutações nos genes *mprF*, *yycFG* (*walRK*), *rpoB*, *graR* e mudanças na expressão do operon *dltABCD*. (12, 20, 38)

O gene *mprF* codifica a enzima bifuncional lisilfosfatidilglicerol sintase, denominada Fator de Multiresistência a peptídeos (MprF), que incorpora lisina (aminoácido carregado positivamente) ao fosfolípido, além de também translocar para parte externa da membrana

celular, mudando sua carga, tornando-a mais positiva. (39) Mutações em *mprF* podem ocasionar aumento da carga positiva do envelope celular, que diminui capacidade de ligação da daptomicina. Também estão associados a este fenótipo mudanças no potencial de membrana, na fluidez da membrana, aumento da carga positiva da superfície da membrana e diminuição da despolarização de membrana. (39) A figura 4 mostra um esquema do gene *mprF* e suas regiões do domínio bifuncional, translocase e sintase que são consideradas “hot spots” para mutações associadas a redução de sensibilidade à daptomicina. (40)

Figura 4 - REGIÕES PREFERENCIAIS DE MUTAÇÕES NO GENE *mprF* ASSOCIADAS À RESISTÊNCIA À DAPTOMICINA. A proteína MprF consiste de um domínio C-terminal de lisil-fosfatidilglicerol sintase, domínio N-terminal translocase de lisil-fosfatidilglicerol e um domínio bifuncional, entre o C-terminal e N-terminal.

Fonte: BAYER et al.(40)

Outro gene associado à diminuição de sensibilidade à daptomicina é *rpoB*, que codifica a subunidade beta da RNA polimerase e está ligado ao fenótipo de espessamento da parede celular, em alguns isolados, como citado anteriormente. (41) Estudo de redução de sensibilidade à daptomicina já associou mutação em *rpoB* também com diminuição da carga negativa da superfície. (39)

Em estudo feito por de Barti e colaboradores (2015), (42) foi associado mutações e fenótipos encontrados com tratamento dado a pacientes que passaram por diferentes combinações de tratamento, e foram encontradas modificações na fluidez de membrana e potencial de membrana, que ocasionaram redução da ligação de daptomicina, logo diminuição de sensibilidade.

Existem indícios de resistência cruzada à daptomicina e à vancomicina. Isolados hVISA podem ser selecionadas por pressão seletiva de uso de daptomicina *in vitro*. (35) Por este motivo, daptomicina não é indicada como alternativa para tratamento de infecções causadas por *S. aureus* com sensibilidade reduzida à vancomicina. Outro ponto que sugere

resistência cruzada, é que isolados podem se tornar resistentes à daptomicina, caso o paciente tenha passado por tratamento prévio com vancomicina, mesmo que sem tratamento com daptomicina. (11)

Assim como para vancomicina, existem descritos isolados de *S. aureus* com resistência heterogênea à daptomicina, hDNSSA (do inglês, “*heterogeneous Daptomycin non-Susceptible Staphylococcus aureus*”). (38, 43-44) O método para detecção indicado é PAP, da mesma forma que para hVISA. Entretanto, não há critério descrito para interpretação específica de PAP para daptomicina, devendo ser utilizada a definição de heterorresistência, em que em concentrações de resistência, não há inibição de toda cultura devido à presença de uma pequena parcela de células resistente, como utilizam os critérios de El-Halfawy e Valvano e Hiramatsu, para vancomicina. (14-15)

Resistência heterogênea à daptomicina em isolados clínicos ainda não é bem elucidada. Alguns podem apresentar mesmas mutações e fenótipos encontrados em isolados resistentes, enquanto outros não, sendo que os mecanismos que levam à heteroresistência à daptomicina ainda não são claros. (38) Dentre algumas modificações encontradas em isolados heteroresistentes para daptomicina, encontram-se mutações em *rpoB* (41) e em alguns isolados com resistência heterogênea à daptomicina, foram encontrados potenciais de membrana maiores que em isolados parentais. (35)

Linezolida é um antimicrobiano de ação bacteriostática, da classe das oxazolidinonas, aprovado para uso nos Estados Unidos pelo FDA em 2000, e no Brasil em 2005. (45-46) Inibe a síntese proteica por se ligar ao domínio V da subunidade 23S do rRNA, impedindo a formação do complexo 70S, essencial no processo de iniciação de tradução. (47-48) Antibióticos da classe das oxazolidinonas inibem a formação deste complexo, pois perturbam o centro peptil-transferase ribossômico, afetando o posicionamento do tRNA. (49)

Esperava-se que levaria bastante tempo para o surgimento de resistência à linezolida, por esta ser um antimicrobiano totalmente sintético e por se ligar à subunidade 23S do RNA ribossômico, que possui várias cópias. Entretanto, a primeira aparição de resistência à linezolida foi descrita em *S. aureus* em 1998, em experimento *in vitro*, causada por uma substituição de guanina para uracila na posição 2447 do loop do domínio V do RNA ribossômico 23S. (48) No Brasil, o primeiro caso de MRSA resistente à linezolida (LRSA) foi descrito em 2006, de isolado em 2002. (45)

Hoje são conhecidos quatro principais mecanismos de resistência à linezolida: 1) aquisição do gene *cfr*, contido no plasmídeo pSCFS1 de 17.1 kb de *Staphylococcus sciuri*,

que confere resistência não só à linezolida, mas todos fenicóis, lincosaminas, oxazolidinonas, pleuromutilinas e estreptogramina A (fenótipo PhLOPS_A). Este gene codifica uma metilase, que causa metilação do 23S rRNA na posição A2503, inibindo ligação de fenicol ao ribossomo. (50) 2) Mutações nos genes *rplC*, *rplD* e *rplV*, que codificam as proteínas ribossômicas L3, L4, L22, respectivamente, encontradas na subunidade 23S. 3) O mecanismo mais comumente encontrado, é a mutação no *loop* central do domínio V do RNA ribossômico 23S, sendo G2576T a mais comum entre estafilococos, e outras, tais como C2192T, G2447T, T2500A, A2503G, T2504C, G2505A, G2766T (as últimas observadas *in vitro* e em numeração de *E. coli*). (51) 4) aquisição do gene *optrA*, contido em plasmídeos de multirresistência, que codifica um transportador ABC. (52)

Tigeciclina faz parte de uma subclasse das tetraciclinas, determinada glicilclinas. Foi aprovada para uso nos Estados Unidos em 2005 e na Europa em 2006. (53) Assim como as tetraciclinas, seu mecanismo de ação baseia-se em ligação na subunidade ribossômico 30S, o que causa inibição da síntese proteica. (54-55) Entretanto, possui maior afinidade ao ribossomo e maior impedimento estérico que as tetraciclinas, sendo mais eficiente. (56) Apesar de ser indicada para infecções por MRSA pelo fabricante (57) e EUCAST, (58) ainda não consta no CLSI (17) como tratamento para *S. aureus*.

Mecanismos de resistência à tigeciclina são relacionados à proteção ribossômica, inativação por enzima e bombas de efluxo. Casos de resistência em *S. aureus* à tigeciclina são raros, mas em outras bactérias, estão relacionados também com bombas de efluxo. (53) Genes que codificam estas podem ser encontrados tanto no cromossomo quanto em elementos genéticos móveis (EGM's), como plasmídeos. Genes da família *tet*, por exemplo, estão contidos em plasmídeos e podem conferir resistência a tetraciclinas, que também possuem mecanismo de ação baseado em ligação ao ribossomo. (59-60) Em isolados de *Bacteroides*, presença dos genes *tetQ*, *tetX* e seu homólogo *tetX1* estão relacionados com resistência à tetraciclina e tigeciclina. Os genes *tet* são transportados por elementos móveis, sendo que o gene *tetX* é encontrado nos transposons Tn4351 e Tn4400, enquanto *tetX1* é encontrado em um transposon conjugativo CTnDOT. (61)

Casos de resistência mediados por bomba de efluxo podem ocorrer de dois modos distintos: aumento de expressão da bomba de efluxo ou substituição na proteína que causa maior eficiência em exportar. Em casos de resistência mediada por bombas de efluxo, há aumento de duas a oito vezes na CIM para compostos, em comparação com linhagens sensíveis representativas. Em isolados clínicos, mecanismos descritos que aumentam efluxo

são: mutação em gene regulador global, mutações na região promotora de gene transportador e elementos de inserção na região adjacente do gene transportador. No caso de proteção ribossômica, a resistência pode estar associada à mutação nas proteínas formadoras do 16SrRNA, S2 e S10, uma vez que a tigeciclina se liga a subunidade 30S. (60-62)

O primeiro caso de MRSA resistente à tigeciclina *in vitro*, por pressão seletiva, foi descrito em 2005. (56) Neste estudo, a equipe analisou, após 16 passagens em meio com tigeciclina, mutações encontradas nas linhagens resistentes e encontraram expressão 100 vezes maior no grupo de genes *mepRAB*, que contém uma bomba de efluxo da superfamília MATE (do inglês, “*multidrug and toxic compound extrusion*”). (56) No Brasil, casos de resistência à tigeciclina em MRSA já foram descritos em 2013, em isolados de um hospital de Belo Horizonte. (34)

Outro antimicrobiano de amplo espectro que age contra *S. aureus*, embora não seja usado ainda no Brasil, é a mistura de estreptograminas quinupristina-dalfopristina, que também age por ligação ao ribossomo, na unidade 50S. (63)

Uma das mais recentes alternativas para tratamento de infecções por MRSA é a tedizolida (TR-701), da classe das oxazolidinonas, que, assim como linezolida, age de forma bacteriostática. (64) Anteriormente, conhecida como torezolida ou TR-700, (65) foi aprovada pelo FDA em 2015 e ainda não está em uso no Brasil. Tedizolida é comercializada sob a forma de fosfato de tedizolida, com nome comercial Sivextro. (66) Até hoje, nenhum trabalho utilizando somente grupo de isolados brasileiros estudou eficácia da tedizolida em MRSA.

Embora seja da mesma classe que linezolida e bem similar, tedizolida possui melhor farmacocinética, maior potência antimicrobiana e menor incidência de efeitos colaterais, incluindo trombocitopenia, quando comparada à linezolida. (67) O aumento de potência em até oito vezes em relação à linezolida, deve-se a interações adicionais com 23S rRNA. (68) Tedizolida é efetiva mesmo em casos que linezolida falha no tratamento e possui menos toxicidade. (69) A figura 5 ilustra a estrutura química das duas oxazolidinonas e da forma pró-fármaco utilizada em tratamento de fosfato de tedizolida.

Aquisição do gene *cfr* causa resistência à linezolida por codificar metilase, que metila resíduo A2503 do 23S rRNA, o que não corre com tedizolida, devido diferença estrutural na porção do anel C-5 e do anel D, que permitem maior estabilidade de ligação ao sítio ativo no centro peptidil transferase e também devido ao tamanho menor do grupo hidroximetil comparado com o grupo acetamida da linezolida (figura 5). (51, 64) Embora tenha se mostrado muito eficaz em tratamento para infecções causadas por MRSA, resistência

in vitro à tedizolida parece estar relacionada a mutações no 23S rRNA, como G2576U, G2447U, T2500A e T2571C e mutações na proteína ribossômica L3: Gly155Arg, Met169Leu e Δ Phe127-His146. (51, 64, 68)

Figura 5 DIFERENÇAS ESTRUTURAIS ENTRE TEDIZOLIDA, FOSFATO DE TEDIZOLIDA E LINEZOLIDA. A adição do anel D na tedizolida e seu pró-fármaco ajudam na estabilidade das interações com sítio alvo. O uso do pró-fármaco fosforilado aumenta solubilidade em água, o grupo fosfato é clivado no sangue pela fosfatase sérica, não interferindo na potência.

Fonte: Elaborada pela autora. Adaptada de RYBAK ;ROBERTS (67)

Dada a grande capacidade de MRSA adquirirem resistência a todas as classes de antimicrobianos existentes, em casos de infecções com isolados resistentes às últimas alternativas de tratamento, são recomendadas medidas para evitar disseminação e controle de infecções nosocomiais e evolução de linhagens: 1) separar pacientes colonizados ou infectados dos que não são, 2) uso de máscaras protetoras, luvas e jalecos específicos para o quarto do paciente, 3) evitar uso coletivo de equipamentos, 4) uso de ação preventiva de lavar as mãos e utilizar agente bactericida sobre superfícies; 5) realizar pesquisa de MRSA de modo periódico, em sítios de colonização do paciente infectado, até que se mostre descolonizado; 6) minimizar o número de pacientes que o profissional de saúde cuida, 6) realizar pesquisa de vigilância epidemiológica nos profissionais de saúde e em pessoas com contato próximo, 7) conscientizar a equipe sobre precauções e medidas sanitárias, 8) realizar descolonização de pacientes e profissionais de saúde, 9) evitar contato direto entre pacientes com profissionais de saúde colonizados, até que estes possuam culturas negativas. (12)

2.3 Plasmídeos em estafilococos

A maior parte de fatores de virulência e genes de resistência a antibióticos são adquiridos por elementos genéticos móveis, sendo plasmídeos um destes. (59, 70) EGM's constituem cerca de 20% do genoma de MRSA e foram descritos primeiramente no final da década de 40. (71-72) Linhagens com sistema de restrição e modificação de genoma defeituoso são capazes de adquirir EGM's com mais frequência, possuindo maior potencial de causarem surtos. (70)

Plasmídeos são moléculas de DNA auto-replicativas e podem ser passados por transferência horizontal durante conjugação, mobilização ou transdução. (70) Estafilococos tipicamente possuem ao menos um plasmídeo. (72) Um estudo realizado em 2011, mostra que cerca de 80% de isolados de estafilococos possuíam pelo menos um plasmídeo maior que 20 kb, sugerindo que a pressão seletiva otimizou o conteúdo de alguns plasmídeos, apesar de possuírem tamanho grande e estrutura complexa. (70)

A classificação de plasmídeos tem sido historicamente determinada por métodos de tipagem por Polimorfismo de Comprimento de Fragmento de Restrição (RFLP, do inglês, "*Restriction Fragment Length Polymorphism*") e grupos de incompatibilidade baseados nos achados que dois plasmídeos com mesmas proteínas de replicação (Rep) não podem ser mantidos estáveis na mesma célula. Este método de classificação foi desenvolvido baseado na sequência dos genes *rep*, que codificam estas proteínas. (59, 73) Dado o crescente número de plasmídeos sequenciados, em *S. aureus*, o método mais utilizado e que permite maior comparação de dados quanto à família de plasmídeos de isolados é o agrupamento por famílias Rep. (74) Agrupamento de plasmídeos por tamanho não é apropriado, pois sua plasticidade é imensa e o tamanho pode variar muito em consequência de inserções e deleções, o que torna difícil a comparação entre linhagens pela presença de plasmídeos de diferentes lugares ou períodos. (73)

Desta forma, plasmídeos de estafilococos possuem taxonomia agrupada por mecanismo de replicação e habilidade de conjugação. (70, 73) É comum que plasmídeos pequenos carreguem genes de resistência e sejam transferidos por fagos, plasmídeos conjugativos ou se cointegrarem com plasmídeos maiores entre elementos de inserção. Plasmídeos de multirresistência possuem entre 20 e 30kb. Apesar deste tamanho, podem ser transferidos por mobilização ou transdução de fagos. (70)

Embora seja crescente o número de plasmídeos sequenciados, ainda não é bem compreendido como genes de virulência e resistência estão associados com plasmídeos e genes *rep*. A associação entre gene *tetK*, que confere resistência às tetraciclinas, com família de plasmídeos *rep7* já foi descrita. (59) Grupos de plasmídeos similares podem conter mais de um gene *rep*, indicando o alto grau de recombinação entre *S. aureus*. (59)

2.4 Fatores de virulência

S. aureus podem expressar uma ampla variedade de fatores de virulência, incluindo adesinas (proteínas ligadoras de fibronectinas - FnBPs), proteína A (que medeia a ligação a células hospedeiras), enzimas (proteases e lipases), modulinas, polissacarídeos solúveis, fenol e toxinas como α -hemolisina e Leucocidina Pantón Valentine (PVL, do inglês, *Panton Valentine Leukocidine*). É importante salientar que diferentes linhagens podem produzir diferentes toxinas e diferem em relação à sensibilidade a antimicrobianos e à produção de biofilme. A produção de fatores de virulência pode estar relacionada ao tipo clonal ou ser adquirida por transferência genética. Assim, a epidemiologia molecular varia em diferentes partes do mundo. (75)

Fatores de virulência são determinados pela presença de seus genes. Associação entre estes fatores e sintomas de doenças é observada, por exemplo, na síndrome do choque tóxico (TSS, do inglês, "*Toxic Shock Syndrome*"). (76) Algumas toxinas podem ser caracterizadas como superantígenos (SAG). O termo superantígeno foi usado primeiramente para descrever a expansão de células T possuindo regiões variáveis da cadeia beta. Antígenos convencionais estimulam da ordem de 0,01% de todas as células T, enquanto SAG's podem estimular mais de 20% destas. (77) Isto leva a um grande número de células T ativadas, e posteriormente, um processo pró-inflamatório exagerado. (78)

Até agora, 23 SAG's estafilocócicas foram descritas, dentre elas as toxinas estafilocócicas (SE's), toxinas estafilocócicas similares (SEI's, do inglês *Staphylococcal enterotoxin like*) e TSST-1 (Toxina causadora do choque tóxico-1). (76) Apenas SAG's que possuem atividade emética, após administração oral em modelo primata, são designadas como SE's. Toxinas relacionadas, sem esta atividade, são designadas como SEI's. (78) Os genes que codificam SAG's são localizados em EGM's (ilhas de patogenicidade, plasmídeos, profagos, ilhas genômicas de *Staphylococcus aureus*, genes próximos ao elemento móvel *SCCmec*). Fenômenos de transmissões vertical e horizontal causam grande diversidade nos

elementos que contém genes de virulência, sendo possível, por meio da análise dessas transmissões, criar uma árvore filogenética para pesquisar familiaridade entre os isolados, por tipagem dos genes de toxinas. (77-78)

SE's são exotoxinas sintetizadas por *S. aureus* durante a fase logarítmica de crescimento ou entre a fase exponencial e estacionária, são ativas em pequenas quantidades e resistem a condições adversas de calor e pH, mantendo atividade, mesmo no ambiente estomacal. (78) SE's e SEI's são subdivididas em clássicas (SEA-SEE) e novas (SEG-SE/U) e são estruturalmente relacionadas. Todas possuem tamanho entre 22 e 28 kDa, atividades superantigênicas e são codificadas por elementos genéticos adquiridos. (78) SEA é a causadora mais comum de intoxicação alimentar, assim como as SE's clássicas. Das novas SE's/SEI's, apenas a SEH (codificada pelo gene *seh*) é descrita capaz de causar contaminação alimentar. (79-80)

Toxinas poro-formadoras são capazes de danificar a membrana das células hospedeiras, levando em última instância à lise celular. Dentre elas, consta a alfa-hemolisina, produzida por 95% de linhagens de *S. aureus* e a família das leucotoxinas. (76) Algumas destas são: leucocidina Pantón Valentine (PVL-LukPV), LukM e LukDE. Esta família de toxinas formadoras de poros contém de proteínas hetero-oliméricas, que podem matar células da linhagem mielóide, sendo importantes na habilidade de invasão de *S. aureus*. (76,81) Leucotoxinas são secretadas como bi componentes S e F. Existe associação epidemiológica entre a presença da toxina PVL e infecções causadas por MRSA associadas à comunidade (CA-MRSA, do inglês, *Community associated MRSA*), que são tipicamente relacionadas com linhagens contendo SCCmec IV. (81) Foi provada que a produção de PVL induz a apoptose de neutrófilos, lise celular e agrava infecções. Em altas concentrações, pode causar necrose, necrose pulmonar (em casos de pneumonia) e aumento exagerado da resposta imune, causando piora de inflamações e osteomielite local. (75)

Ainda, existem as toxinas esfoliativas (ET, do inglês "*Esfoliative toxins*"), ETA, ETB e ETD, codificadas por diferentes elementos genéticos. ETA é encontrada em fagos, ETB em plasmídeos e ETD em ilha genômica. (76) A expressão destas toxinas é regulada pelo locus *agr*, também envolvido nos mecanismos de resistência à vancomicina. (11, 76) ET's são isoformas de enzimas espécie específicas que agem como moléculas que quebram a adesão celular entre células do hospedeiro, facilitando a invasão bacteriana pela pele. (76)

Uma vez que fatores de virulência são transferidos de uma célula à outra, e é descrito que EGM's e genes de toxinas não são transferidos randomicamente, existem sugestões de

restrições entre transferência horizontal, devendo haver relação entre a presença destes fatores e padrão filogenético, o que gera impacto para investigação epidemiológica de virulência em *S. aureus*. (76)

2.5 Biofilmes

Além da alta capacidade de recombinação genética, aquisição de resistência, persistência de colonização e produção de diversos fatores de virulência, *S. aureus* é capaz de formar biofilmes, que podem levar à infecção crônica. Biofilmes são comunidades bacterianas tridimensionais, multicelulares, ancoradas a superfícies. (82) *S. aureus* um grande causador de infecções associadas a dispositivos médicos, principalmente cateteres e próteses. (83-84) A habilidade de formar biofilmes é crucial para o sucesso do patógeno em infecções deste tipo.

Células formadoras de biofilmes são resistentes à fagocitose e de difícil acesso para antibióticos. Enquanto falta de nutrientes no meio e quantidade elevada de células aumentam mortalidade em culturas planctônicas, em biofilmes não ocorre o mesmo efeito, já que são características fisiológicas dos biofilems. (85) A formação de biofilmes ocorre em uma sequência de eventos: anexação microbiana à uma superfície, proliferação de células, produção de matriz extracelular, destacamento de partes do biofilme e proliferação deste. Este processo é controlado em partes, por mecanismo de comunicação inter bacteriano (“*quorum sensing*”), dependente da densidade populacional e associado com mudança no padrão de proteínas expressadas. (85) Em *S. aureus*, expressão diferenciada de proteínas ligadas a formação de biofilmes é regulada pelo locus *agr*. (83) Quando o sistema *agr* está reprimido, as células têm maior probabilidade de se anexar à superfície e formar biofilmes, já que fatores de destacamento são produzidos em menor quantidade. Se o sistema *agr* não está reprimido, a bactéria continua em estado planctônico. (83) Biofilmes maduros possuem estrutura tridimensional complexa, com microambientes que diferem entre si por osmolaridade, suprimentos nutritivos e densidade celular.

Até pouco tempo atrás, o acúmulo de células para formação de biofilme era atribuído exclusivamente à participação da adesina polissacarídeo intracelular (PIA, do inglês, *polyssaccharide intercellular adhesin*), codificada pelo operon *ica*. (82-84) Hoje, este papel também é reconhecidamente atribuído a proteínas estafilocócicas de superfície (Bap, SasC, SasG, ClfB, FnBPs, proteína A), em casos *ica*-independentes. (83-84)

Biofilmes facilitam disseminação de resistência à antibióticos de três maneiras: primeiro, tratamento em infecções bacterianas causadas por biofilmes exige terapia antimicrobiana prolongada e várias vezes recorrentes, facilitando pressão seletiva. Segundo, a fisiologia do biofilme permite que a bactéria sobreviva por longos períodos de tratamento com antibiótico, mesmo sem ainda ter adquirido mecanismo de resistência específico, devido dificuldade de difusão do antibiótico nas camadas do biofilme, além de que, concentrações sub-inibitórias de antibiótico induzem a formação de matriz. E, terceiro, a alta densidade celular favorece trocas genéticas por transferência horizontal de genes. (85)

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Objetivo geral do trabalho foi caracterizar amostras de MRSA isoladas em um hospital de São Carlos – (SP), Brasil, tanto fenotípica quanto genotipicamente e determinar possível disseminação de linhagens específicas entre pacientes.

3.2 Objetivos específicos

Os objetivos específicos deste estudo incluíram:

1. Avaliar taxa de MRSA neste hospital do período estudado
2. Avaliar linhagens presentes e possível disseminação entre pacientes
3. Analisar perfil de virulência de todos os isolados
4. Caracterizar o perfil de sensibilidade a antimicrobianos
5. Determinar famílias de plasmídeos presentes
6. Em casos de heteroressistência, estudar possíveis mecanismos envolvidos neste fenótipo.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Comitê de Ética

Para realização deste estudo, o projeto foi submetido ao Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) por intermédio da Plataforma Brasil. (86) Neste caso, o projeto é enviado ao CEP mais próximo, da Universidade Federal de São Carlos (UFSCar) número 5504 que analisou e aprovou com número de parecer 1.556.620 e número CAAE 55310916.7.0000.5504 (Anexo 1).

4.2 Amostras de MRSA

No período de julho de 2011 a janeiro de 2012, todos os isolados de *S. aureus* obtidos de infecções de pacientes internados no Hospital Santa Casa de Misericórdia de São Carlos, foram coletados e armazenados. O armazenamento foi realizado em caldo de infusão de cérebro e coração (BHI, do inglês, “*Brain and Heart Infusion*”), contendo 40% em volume final de glicerol e mantidos em freezer -80°C, nas dependências do Laboratório de Epidemiologia e Microbiologia Molecular (LEMiMo).

Identificação dos isolados como *S. aureus* foi realizada previamente no laboratório clínico do próprio hospital por método automatizado Vitek® (Biomérieux, França), cartão GT e confirmada no LEMiMo. Foram utilizados neste estudo apenas o primeiro isolado de *S. aureus* caracterizados como MRSA de cada paciente. Todos os isolados posteriores de mesmo paciente foram excluídos e considerados como duplicatas. A prevalência de MRSA neste hospital foi estimada utilizando a taxa de MRSA dentre todos os *S. aureus* isolados neste período, excluídas as duplicatas.

As informações sobre data, sítio de coleta, quais isolados foram mantidos no estudo e todos os dados que vieram do hospital estão disponíveis no Anexo 2.

4.3. Extração de DNA

O DNA dos isolados foi extraído por método de lise mecânica, segundo Palazzo *et al* (2007). (87) Para tanto, cada isolado foi inoculado por técnica de isolamento em placas BHI-água. Estas foram incubadas em estufa a 37 °C, por 24 horas, para obtenção de colônias isoladas e verificação de inexistência de contaminação. Após confirmação de pureza, uma

colônia isolada de cada isolado foi inoculada em 10 mL de caldo BHI e crescidas em banho aquecido a 100 °C com agitação de 100 rpm, por período de 18 horas. Após este período, as células em suspensão foram centrifugas e lavadas duas vezes com solução fisiológica estéril. Estas células passaram por método de lise mecânica, com agitação vigorosa com pérolas de vidro tratadas com ácido nítrico e solução de lise. (87) O DNA foi extraído com fenol-clorofórmio e precipitado utilizando isopropanol.

Após a extração, o DNA purificado foi quantificado e confirmada pureza no equipamento *NanoDrop* 2000 (Thermo Fisher Scientific Co., Waltham, Massachusetts, EUA), observando relação 280/260 nm. O DNA purificado foi diluído para a concentração necessária para utilização nas reações em cadeia da polimerase (PCR, do inglês *Polymerase Chain Reaction*) realizadas no estudo e estocado a -20°C.

4.4 Caracterização genotípica

4.4.1 Eletroforese em gel de Campos Pulsados

O experimento de Eletroforese em Gel de Campos Pulsados (PFGE, do inglês *Pulsed Field Gel Electrophoresis*) para análise do perfil de macro restrição de DNA genômico, foi realizado e analisado como descrito por Tenover e colaboradores (1995). (88) PFGE foi realizada em cuba de eletroforese com equipamento CHEF Mapper XA *Pulsed Field Electrophoresis System* (Bio-Rad Laboratories, Califórnia, EUA), por 22 horas, gradiente de 6 V/cm, ângulo de 120 °, com pulsos de 5 a 40 segundos, em rampeamento linear e temperatura da cuba controlada em 14°C.

Após a corrida, para visualização do perfil eletroforético, o gel foi corado em tampão TBE 1x e corante SybrSafe (Thermo Fisher Scientific Co., Waltham, Massachusetts, EUA), na proporção de 10µL de corante para cada 100mL de tampão em agitação por 1 hora. Posteriormente, gel foi visualizado em fotodocumentador Gel DocTM XR + System (Bio-rad Laboratories, Califórnia, EUA) com luz ultravioleta, no programa ImageLab (Bio-rad Laboratories, Califórnia, EUA).

Para estudo dos géis e de similaridade entre os isolados, foi utilizado o *software Bionumerics 7.1* (Applied Maths NV, Bélgica). A análise foi feita com coeficiente de correlação *Dice* e parâmetros de otimização ajustados em 0,7% e tolerância de 1,25%. Foram consideradas como mesmo pulso tipo, isolados com similaridade maior que 80% e mesmo

subtipo apenas quando idênticas, de acordo com critério descrito por McDougal, Tenover e colaboradores (2003). (89-90) Para interpretação dos resultados, o subtipo A1 foi designado para o isolado mais antigo.

4.4.2 Tipagem por sequenciamento de Multilocus

Foi realizada tipagem por sequenciamento de multilocus (MLST, do inglês, *Multilocus Sequence Typing*) para pelo menos um isolado representativo de cada pulso tipo. Para isto, foram amplificados por PCR, os sete genes *housekeeping* do esquema de MLST proposto para *S. aureus* para cada isolado. (91) O programa utilizado no termociclador consistiu de uma etapa de desnaturação a 95 °C por 5 minutos, seguido por 30 ciclos de desnaturação a 55 °C por 1 minuto, anelamento a 72 °C por 1 minuto e extensão a 95 °C por um minuto, seguidos por etapa de extensão final a 72 °C por 5 minutos. Os iniciadores utilizados foram os recomendados pelo do site *Multilocus Sequence Typing* (<http://www.mlst.net/>), apresentados na Tabela 1. (91) As reações de PCR de volume final 50 µL foram realizadas utilizando 200 ng de DNA, 0,5 µg de *primers*, 2,5 U de DNA taq polimerase high-fidelity e concentrações finais de dNTP a 200 µM e cloreto de magnésio (MgCl₂) a 2 mM. Produtos de PCR foram confirmados por eletroforese em gel de agarose 1%, e posteriormente foram purificados utilizando conjunto *Wizard® SV Gel and PCR Clean-up System* (Promega, Fitchburg, EUA).

Posteriormente, o sequenciamento dos alelos amplificados foi realizado em duplicata, em equipamento *Applied Biosystems® 3130 Genetic Analyzer* (*Life Technologies*, Carlsbad, EUA) com os mesmos *primers* usados para reação de PCR. As sequências foram analisadas no programa *Contig Express*, do pacote *Vector NTI Advance 11.0* (*Life Technologies*, Carlsbad, EUA) para alinhamento das sequências e verificação da qualidade dos eletroferogramas.

Os *contigs* formados foram confirmados e submetidos a análise mutacional, comparando com sequências do banco de dados de *S. aureus* do site *Multilocus Sequence Typing* (<http://www.mlst.net/>), (91) e o número de cada alelo foi determinado. Denomina-se perfil alélico o conjunto dos sete números. Com o perfil alélico obtido, foi possível determinar o Tipo de Sequência (ST, do inglês, *Sequence Type*) dos isolados selecionados. Foi esquematizado ainda, um diagrama utilizando o programa eBURSTv3

(<http://saureus.mlst.net/eburst/>), (92) para verificação da relação genética entre os ST's das amostras de MRSA do trabalho e das contidas no banco de dados.

Tabela 1 - Iniciadores utilizados para tipagem por MLST.

Iniciador	Sequência de nucleotídeos	Gene detectado	Tamanho amplificado (pb)
<i>arcC</i>	TTGATTACACGCGCGTATTGTC AGGTATCTGCTTCAATCAGCG	<i>arc</i>	456
<i>aroE</i>	ATCGGAAATCCTATTTACATTC GGTGTTGTATTAATAACGATATC	<i>aro</i>	456
<i>glpF</i>	CTAGGAACTGCAATCTTAATCC TGGTAAAATCGCATGTCCAATTC	<i>glp</i>	465
<i>gmk</i>	ATCGTTTTATCGGGACCATC TCATTAACCTACAACGTAATCGTA	<i>gmk</i>	429
<i>pta</i>	GTAAAAATCGTATTACCTGAAGG GACCCTTTTGTGAAAAGCTTAA	<i>pta</i>	474
<i>tpi</i>	TCGTTCATTCTGAACGTCGTGAA TTTGCACCTTCTAACAATTGTAC	<i>tpi</i>	402
<i>yqiL</i>	CAGCATACAGGACACCTATTGGC CGTTGAGGAATCGATACTGGAAC	<i>yqi</i>	516

Fonte: Elaborada pela autora, baseado em Sequenciamento Multilocus (91)

4.4.3 Determinação de elemento SCCmec

Para determinação do tipo de elemento SCCmec de cada isolado, foi utilizado método de Multiplex PCR (MPCR, *Multiplex Polymerase Chain Reaction*), proposto por Kondo *et al.* (2007). (93) Este método determina os tipos de complexos *ccr* e *mec* separadamente, e, com a combinação dos dois complexos, o elemento SCCmec de cada isolado é determinado. A reação denominada MPCR1 determina o complexo *ccr* e confirma a presença do gene *mecA*. O programa utilizado para MPCR1 consistiu de uma etapa de desnaturação a 94 °C por 2 minutos, seguido por 30 ciclos de desnaturação a 94 °C por 2 minutos, anelamento a 57 °C por 1 minuto e extensão a 72 °C por 2 minutos, seguido por etapa de extensão final a 72 °C por 2 minutos. Reação MPCR2 foi realizada para determinação do complexo *mec* e o programa foi basicamente o mesmo de MPCR1, exceto pela temperatura de anelamento, que foi de 60 °C. Os *primers* utilizados estão organizados na Tabela 2.

As linhagens controle utilizadas foram: *S. aureus* RN4220 (NARSA 144), como controle negativo, *S. aureus* 10442 para SCCmecI (*ccrA1-ccrB*, complexo *mec* tipo B), *S. aureus* N315 para SCCmecII (*ccrA2-ccrB*, complexo *mec* tipo A), *S. aureus* 85/2082 para SCCmecIII (*ccrC, ccrA3-ccrB*, complexo *mec* tipo A), *S. aureus* 4744 para SCCmecIVa (*ccrA2-ccrB*, complexo *mec* tipo B) e *S. aureus* WIS para SCCmecV (*ccrC*, complexo *mec* tipo C). A reação de MPCR1 foram realizados utilizando 10 ng de DNA, 1,2 U de taq DNA polimerase e concentrações finais de 0,1 μ M cada primer, 200 μ M de dNTP e 3,2 mM de MgCl₂. Na reação de MPCR2 foram utilizadas as mesmas quantidades, exceto para cloreto de magnésio, que foi utilizada concentração final de 2 mM.

Tabela 2 - Iniciadores utilizados para determinação elemento SCCmec.

Reação	Iniciador	Sequência de nucleotídeos	Gene detectado	Tamanho (bp)
MPCR1				
	mA1	TGCTATCCACCCTCAAACAGG	<i>mecA</i> (mA1-mA2)	286
	mA2	AACGTTGTAACCACCCAAGA		
	α 1	AACCTATATCATCAATCAGTACGT	<i>ccrA1-ccrB</i> (α 1- β c)	695
	α 2	TAAAGGCATCAATGCACAAACACT	<i>ccrA2-ccrB</i> (α 2- β c)	973
	α 3	AGCTCAAAAGCAAGCAATAGAAT	<i>ccrA3-ccrB</i> (α 3- β c)	1791
	β C	ATTGCCTTGATAATAGCCITCT	<i>ccrA4-ccrB4</i> (α 4.2- β 4.2)	1287
	α 4.2	GTATCAATGCACCAGAACTT		
	β 4.2	TTGCGACTCTCTTGGCGTTT	<i>ccrC</i> (YR-YF)	518
	YR	CCTTTATAGACTGGATTATTCAAAATAT		
	YF	CGTCTATTACAAGATGTTAAGGATAAT		
MPCR2				
	mI6	CATAACTTCCCATTCTGCAGATG	<i>mecA-mecI</i> (mA7-mI6)	1963
	IS7	CATAACTTCCCATTCTGCAGATG	<i>mecA-IS1272</i> <i>upstream do mecA</i> (mA7-IS7)	2827
	IS2	CATAACTTCCCATTCTGCAGATG	<i>mecA-IS431</i> <i>upstream do mecA</i> (mA7-IS2)	804
	mA7	ATATACCAAACCCGACAACCTACA		

Fonte: Elaborada pela autora. Adaptada de KONDO et al. (93)

Visualização e confirmação de pureza e dos tamanhos dos produtos de PCR foi realizada por eletroforese com gel de agarose 1% (Sigma-Aldrich Co., St Louis, EUA), 5V/cm, utilizando corante Hydragreen 1:5000 (Sinapse Inc., São Paulo, Brasil) nos isoaldos e marcador de peso molecular 100pb Scada 100pb #S1511 (Sinapse Inc., São Paulo, Brasil) e 1kb DNA ladder M217 (Jena Bioscience, Jena, Alemanha) visualização com luz ultravioleta

em equipamento fotodocumentador Gel Doc XRTM (Bio-Rad Laboratories, Califórnia, EUA) e programa ImageLab (Bio-Rad Laboratories, Califórnia, EUA).

4.4.4 Perfil de virulência

Foi determinada a presença de 22 genes de virulência, por modo indireto de amplificação dos genes por PCR, utilizando primers baseados em Jarraud *et al.* (2002) e Sapri *et al.* (2011). (79, 94) Os genes estudados para o perfil de virulência incluíram as enterotoxinas estafilocócicas SEA- SEE, SEH-SEJ, SEM-SEO, toxinas esfoliativas ETA e ETB, genes de leucocidinas LukFS-PV (PVL) e LukDE, toxina 1 da Síndrome do Choque Tóxico, TSST-1 e as hemolisinas alfa (HLA), beta (HLB), delta (HLD), gama (HLG) e gama variante (HLGvar). Todos os *primers* usados para determinação de perfil de virulência estão apresentados no Apêndice 1, bem como o tamanho esperado para cada fragmento amplificado e linhagem controle positivo utilizada.

Para PCR de todas as toxinas pesquisadas, exceto PVL, HLG, SEH e SEJ, foram utilizadas reações com 50 ng de DNA e concentrações finais de 0,1 μ M de *primers*, 400 μ M de dNTP, 3 mM de MgCl₂ e 2,5 U de DNA taq polimerase em reações de 50 μ L. O programa utilizado para PCR das toxinas SEA, SEG, SEM, ETB e HLB foi composto de etapa de desnaturação a 95 °C por 1 minuto, seguido por 30 ciclos de desnaturação a 94 °C por 1 minuto, anelamento a 50 °C por 1 minuto e extensão a 72 °C por 1 minuto, seguidos por etapa de extensão final a 72 °C por 5 minutos. Para reações de PCR para as toxinas SEB, SEC, SED, SEE, SEI, TSST-1, ETA, HLA HLD, HLG, HLG variante e LukDE o programa foi o mesmo, exceto pela temperatura de anelamento, que foi de 50 °C. No caso da PCR para SEN, temperatura de anelamento foi de 51 °C e para SEO, de 52 °C.

PCR para amplificação de gama hemolisina (HL) SEH e SEJ as reações foram feitas utilizando 50 ng de DNA e concentrações finais de *primers* a 0,4 μ M, dNTP a 200 μ M, MgCl₂ a 2 mM e 2,5 U de taq DNA polimerase, para reação de 50 μ L. O programa para HLG utilizado consistiu de etapa de desnaturação a 95 °C por 3 minutos, seguido por 35 ciclos de desnaturação a 94 °C por 1 minuto, anelamento a 46 °C por 1 minuto e extensão a 72 °C por 40 segundos, seguidos por etapa de extensão final a 72 °C por 5 minutos. Para SEH e SEJ o programa foi praticamente o mesmo, exceto pela temperatura de anelamento que para SEH foi de 57 °C e para SEJ, de 55 °C.

Para determinação da presença do gene da PVL, foi usado método de PCR descrito por Lina e colaboradores. A linhagem *S. aureus* 81/108, usada como controle positivo para PVL foi gentilmente cedida pelo Professor Keiichi Hiramatsu. Os *primers* usados realizam a co-amplificação de *lukS-PV* e *lukF-PV* (Apêndice 1). (81) Estes não amplificam outra classe de genes *luk S* ou *F*. Programa utilizado para amplificação de gene para PVL foi de uma etapa de desnaturação a 94 °C por 5 minutos, seguido por 30 ciclos de desnaturação a 94 °C por 30 segundos, anelamento a 55 °C por 30 segundos e extensão a 72 °C por 2 minutos, seguidos por etapa de extensão final a 72 °C por 10 minutos. Para reação, foram utilizados 10 ng de DNA e concentrações finais de *primers* a 10 µM, dNTP a 200 µM, MgCl₂ a 2 mM e 2,5 U de taq polimerase para 50 µL.

Após reação de PCR em termociclador C1000 Thermal Clycler (Bio-Rad Laboratories, Califórnia, EUA), a pureza e tamanho amplificado foram confirmados por meio de eletroforese em gel de agarose 1% em cuba CHEFF-DR® *System* (Bio-Rad Laboratories, Califórnia, EUA) a 300mA, 5V/cm, com amostras coradas com corante HydraGreen 1:5000 (Sinapse Inc., São Paulo, Brasil) e marcador de peso molecular 100 pb Scada #1511 (Sinapse Inc., São Paulo, Brasil) e visualizadas com luz ultravioleta em foto documentador Gel Doc XR (Bio-rad Laboratories, Califórnia, EUA).

O conjunto de genes presentes em cada isolado foi denominado de perfil de virulência. Todas as amostras bacterianas tiveram seus perfis de virulência comparados para observar a similaridade bacteriana baseada neste perfil.

Foi feita análise para agrupamento dos isolados baseados em método das componentes principais, PCA (do inglês, “*Principal Component Analysis*”). (94) Este método matemático de análise é muito utilizado em comparações e agrupamentos de dados biológicos, inclusive de perfil de virulência. (94-97) Utiliza transformações ortogonais para converter um conjunto de observações, que podem estar correlacionadas em outro conjunto de variáveis sem correlação que são denominadas componentes principais. O primeiro componente principal representa o máximo da variabilidade dos dados, e normalmente os agrupa da melhor forma possível, e cada componente que o sucede tem a maior variância possível, e sempre ortogonal com as componentes anteriores. (98)

O cálculo das componentes principais envolve procedimentos matemáticos de médias, desvios, matrizes de covariância, autovetores e autovalores. As primeiras componentes principais são selecionadas com base na porcentagem de variância acumulada. Desta forma, o agrupamento dos isolados é estruturado em gráficos, cujos eixos são as

componentes principais (PCs), nas quais os dados são projetados. Assim, é possível diminuir as dimensões de um gráfico inicial para dimensões mais apropriadas para análise. (98)

Análise das componentes principais foi realizada em programa MatLab v. R2014a (MathWorks, Massachusetts, EUA), utilizando funções do próprio software para facilitar cálculos, e gráficos utilizando a primeira e primeira e segunda componentes principais foram traçados em Excel® (Microsoft Washington, EUA). Cálculo da confiabilidade das análises foi realizado também no programa MatLab (MathWorks, Massachusetts, EUA)

4.4.5 Determinação da família de plasmídeos

Determinação da família de plasmídeos foi realizada para todas as amostras de MRSA do estudo, utilizando método de MPCR e DNA genômico, de acordo com esquema proposto por *Jensen et al* (2010). (73) Embora em *S. aureus* tenham sido descritas apenas as famílias rep1, rep5, rep7, rep9, rep13, rep15, rep16, rep19 e único, pesquisa foi realizada para todas as famílias de rep1 a rep19 e rep único, exceto rep12, por estar presente em *B. thuringiensis*.

Reação denominada de MPCR1 co-amplifica genes das famílias rep1, rep9 e rep10 e os controles utilizados foram plasmídeos pIP501 (*E. faecalis* JH2-2), pCF10 (*E. faecalis* OG1), pIM13 (*Bacillus ssp.* JAS9), respectivamente. MPCR2 amplifica as famílias rep4, rep7, rep14 e rep17 e os controles para amplificação serão os plasmídeos pMBB1 (*L. lactis* LM0230), pUSA02 (*S. aureus* FPR3757), pRI (*E. faecalis* AHA15) e pRUM (*E. faecium* U37), respectivamente. MPCR3 amplifica para plasmídeos das famílias rep3 e única, controle positivo para rep3 foi pAW63(*B. thuringiensis*) e para único, pMG1 (*E. faecium*). MPCR4 amplifica para as famílias de plasmídeos rep2, rep6, rep8 e rep18 com controles pRE25 (*E. faecalis*), pS86 (*E. faecalis*), pAM373 (*E. faecalis* OG1X) e pEF418 (*E. faecalis*), respectivamente. MPCR5 amplifica famílias de plasmídeos rep13, 15 e 16 e plasmídeos usados como controles pC194, pUSA03 e pSAS (*S. aureus* MSSA 476), respectivamente. MPCR6 amplificou para famílias rep5 e rep11, usando como controles plasmídeos pSAS e pEF1071, respectivamente.

Programa utilizado para MPCR1 consistiu de etapa de desnaturação a 94 °C por 2 minutos, seguido por 30 ciclos de desnaturação a 94 °C por 30 segundos, anelamento a 55,1 °C por 30 segundos e extensão a 72 °C por 40 segundos, seguido por etapa de extensão final a 72 °C por 5 minutos. Todos os outros multiplex PCRs utilizaram basicamente o mesmo ciclo,

mudando apenas a temperatura de anelamento, de 56 °C para MPCR4 e 52 °C para os demais. Reação de 50 µl foi preparada utilizando 100 ng de DNA, 210 ng de cada primer, 2,5 U de taq DNA polimerase e concentrações finais de 200 µM de dNTP's e 3 mM de MgCl₂.

Rep19 foi amplificado em reação de PCR isolada, em reação com mesmas concentrações de reagentes dos MPCRs e ciclo programado em uma etapa de desnaturação inicial a 94 °C por 2 minutos, seguida de 30 ciclos de desnaturação a 94 °C por 30 segundos, anelamento a 48 °C por 30 segundos, amplificação a 72 °C por 40 segundos e amplificação final a 72 °C por 5 minutos. Plasmídeo pUB101 foi usado como controle positivo. Os *primers* utilizados, família rep e tamanho que amplificam estão listados na tabela 3.

A visualização do tamanho e pureza dos produtos de PCR foi realizada por eletroforese com gel de agarose 1,5% (Sigma-Aldrich Co., St Louis, EUA). O esquema se baseia na identificação das famílias de gene *rep* presentes em cada isolado.

Tabela 3 - Iniciadores utilizados para determinação de famílias de plasmídeos.

Iniciador	Família	Sequência	Tamanho amplificado (pb)
pIP501 F	rep1	TCGCTCAATCACTACCAAGC	624
pIP501 R		CTTGAACGAGTAAAGCCCTT	
pCF10 F	rep9	GCTCGATCARTTTTCAGAAG	201
pCF10 R		CGCAAACATTTGTCWATTTCTT	
pIM13 F	rep10	TATAAAGGCTCTCAGAGGCT	382
pIM13 R		CCAAATTCGAGTAAGAGGTA	
pMBB1 F	rep4	ACTATGTCGTTGAGTCTAATGACT	430
pMBB1 R		AGCAAGATAGAATATTTACTTTTAAGTTT	
pUSA02	rep7	CCAAAATAYTTYGTTTCTGG	227
pRI F	rep14	GAAAGYTTRGATAGYTTTGC	164
pRI R		RTTTTGRCTTTCTTSYTCA	
pRUM F	rep17	TACTAACTGTTGGTAATTCGTTAAAT	604
pRUM R		ATCAAGGACTCAACCGTAATT	
pAW63 F	rep3	CCTAATGTATATAATTTTGGTACATAT	403
pAW63 R		ACATTTTCCTCAAAGAACAT	
pMG1 F	Único	GTATTAACACACTGGACTC	199
pMG1 R		TCAGTGTAGGCAATAACCC	
pRE25 F	rep2	GAGAACCATCAAGGCGAAAT	630

continua

Continuação da Tabela 3.

Iniciador	Família	Sequência	Tamanho amplificado (pb)
pRE25R		ACCAGAATAAGCACTACGTACAATCT	
pS86 F	rep6	ACGAATGAAAGATAAAGGAGTAG	551
pS86R		TAAATTCTAGTTTGGCAATCTTAT	
pAM373 F	rep8	TAGATACGACAAAAGAAGAATTACA	394
pAM373 R		CCAATCATGTAATGTTACAACC	
pEF418 F	rep18	ACACCAGTCGAAATGAATTT	462
pEF418 R		AGGAATATCAAGTAATTCATGAAAGT	
pC194 F	rep13	ATGATGCAATATATTAAGCA	402
pC194 R		TACCAGAATAYTTAGCCATTTT	
pUSA03 F	rep15	CAGTAGAAGAAAATTATAAAGAAC	327
pUSA03 R		GTTATGGCTGGTTTTAATAAA	
pSAS F	rep16	CAGGAAAACACTTCGTTTAT	592
pSAS R		CTTCTATATCACTATCATTGTCATT	
pSAS F	rep5	ATGTGTAATAAATTAAAAGAGCA	637
pN315		ATTGTCTTGATTTATCTATCTTG	
pEF1071 F	rep11	TCTAGAATGCGTAAAAAGG	500
pEF1071 R		CCTTTGAAGATWGCRGTWAG	
pUB101-F	rep19	GWGATCGCTTARAYTTATCTAT	543
pUB101-R		YMTTGTTSTGGMAATTCTT	

Fonte: Elaborada pela autora, baseado em JENSEN et al. (73)

4.5 Caracterização fenotípica

4.5.1 Determinação do perfil de sensibilidade

No laboratório clínico do hospital foi realizado antibiograma com perfis de resistência a 19 antimicrobianos de 7 classes diferentes, por método automatizado Vitek® (Biomérieux, França) cartão P585. Os antibióticos testados no hospital foram: penicilina, ampicilina, amoxicilina, oxacilina, cloxacilina, dicloxacilina (penicilinas), ciprofloxacina, levofloxacina, lomefloxacina, norfloxacina, ofloxacina (os cinco, quinolonas), eritromicina, claritromicina, azitromicina (os três, macrolídeos), vancomicina (glicopeptídeo), amoxicilina-

ácido clavulânico, ampicilina-sulbactam (ambos betalactâmicos), sulfametoxazole-trimetoprina (inibidor de via de folato) e clindamicina (lincosamina).

Valores da concentração inibitória mínima (CIM) foram determinados no LEMiMo por microdiluição em caldo, segundo CLSI (2015), (17) para os seguintes antimicrobianos para tratamento de infecções por MRSA: daptomicina (Novartis, Basileia, Suíça), linezolida (Zyvox®, Pfizer, Nova Iorque, EUA), tedizolida (fosfato de tedizolida, Bayer, Leverkusen, Alemanha), teicoplanina (Sigma-Aldrich Co., St Louis, EUA), tetraciclina (Sigma-Aldrich Co., St Louis, EUA) e tigeciclina (Tygacil®, Novartis, Basileia, Suíça) e vancomicina (Sigma-Aldrich Co., St Louis, EUA) e por Etest® para quinupristina-dalfopristina (Biomérieux, Marcy-l'Étoile, França). O experimento de microdiluição foi feito de acordo com recomendações do CLSI, sendo realizado sempre em câmara de biossegurança e condições de assepsia. Todas as soluções com antibióticos foram mantidas protegidas da luz. Todos os experimentos foram feitos utilizando caldo Müeller Hinton Cátion Ajustado (Becton, Dickinson and Company, Nova Jersey, EUA), conforme pede CLSI, e, para tigeciclina, este foi fresco, não excedendo 18 horas após esterilização. Para daptomicina foi utilizado caldo Müeller Hinton Cátion Ajustado (Becton, Dickinson and Company, Nova Jersey, EUA), suplementado com cloreto de cálcio, para concentração final de 50mg/L de íons cálcio.

Foram utilizadas como controles sensíveis as linhagens de *S. aureus* ATCC 29213 e *S. aureus* ATCC 25923. Todos os experimentos foram repetidos em duplicata e observação de valores de CIM foi realizada em 24 horas e, para antimicrobianos bactericidas, também em 48 horas. Em caso de mudança de CIM em 48 horas, nova repetição em duplicata foi realizada. Para cada isolado, foi utilizado controle negativo estéril (sem antibiótico e sem bactéria) e controle positivo para averiguar se cultura estava viável (sem antibiótico e com bactéria) simultaneamente em cada experimento.

Os isolados foram crescidos inicialmente em placas de ágar-BHI, para obtenção de culturas isoladas e confirmação de pureza, em estufa a 37 °C por 18 horas. Posteriormente, colônia isolada foi passada para caldo BHI estéril e cultivada sob agitação em banho a 37 °C por 18 horas. Desta cultura, uma alíquota foi padronizada em 0,5 McFarland utilizando equipamento Densimat (BioMérieux, Marcy-l'Étoile, França). 200 µL da cultura ajustada foi adicionada em 1,8 mL de caldo estéril e 5 µL desta foram inoculados em cada poço com volume final de 100 µL, em microplacas e incubadas em estufa à 37 °C.

As microplacas foram preparadas com caldo com antimicrobianos em diferentes concentrações, respeitando qual o meio indicado para cada antimicrobiano usado, sendo preparadas por diluição seriada. Em todos os casos, valores de CIM testados cobriam espaço amostral de diferentes concentrações de CIM de sensibilidade e resistência (Tabela 4).

Para determinação de CIM para quinupristina-dalfopristina, foi utilizado método de Etest® (bioMérieux, Marcy-l'Étoile, França), já que o antibiótico em pó não é comercializado no país. Observação dos halos de inibição foi feita em 24 e 48 horas.

Foram utilizados os pontos de corte preconizados pelo CLSI, para todos os antibióticos testados, exceto no caso da tigeciclina, para a qual CLSI não determina pontos de corte e por isso foram utilizadas informações do EUCAST. (58) Na tabela 4 são observados os pontos de corte dos antimicrobianos utilizados neste trabalho, em µg/mL e quais os intervalos de concentrações testados.

Tabela 4 - Pontos de corte utilizados para antimicrobianos testados. S = sensível, I = intermediário, R = resistente.

Antimicrobiano	S	I	R	Fonte	Intervalos de CIM testados (µg/mL)
Daptomicina	≤ 1	-	-	CLSI (17)	0,125-4
Linezolida	≤ 4	-	≥ 8	CLSI (17)	0,5-16
Quinupristina-dalfopristina	≤ 1	2	≥ 4	CLSI (17)	0,002-32 (Etest)
Tedizolida	≤ 0,5	1	≥ 2	CLSI (17)	0,0625 - 32
Teicoplanina	≤ 8	16	> 32	CLSI (17)	0,5-256
Tetraciclina	≤ 4	8	≥ 16	CLSI (17)	0,125-64
Tigeciclina	≤ 0,5	-	> 0,5	EUCAST (58)	0,0625-2
Vancomicina	≤ 2	4-8	> 16	CLSI (17)	0,25-8

Fonte: Elaborada pela autora.

Valores de MIC₅₀ e MIC₉₀ foram calculados para cada antibiótico, estes representam a concentração mínima necessária para inibir o crescimento de 50% e 90% dos isolados estudados, respectivamente. A eficácia de cada antimicrobiano testado foi então determinada, utilizando método descrito por Gusek e colaboradores, o qual a mede a eficácia do antimicrobiano pelo cálculo da razão entre o valor de MIC₉₀ e o valor de ponto de corte. (99) Neste estudo, utilizamos valores de ponto de corte para cada antimicrobiano pesquisado de acordo com CLSI, ou EUCAST (apenas para tigeciclina), conforme descrito anteriormente para o perfil de sensibilidade.

4.5.2 Triagem para hVISA

Todos os isolados passaram por triagem para detecção da redução da sensibilidade à vancomicina por análise de população de ponto único, seguindo o método sugerido por Hiramatsu e colaboradores, em placas de BHI-ágar contendo 4 µg/mL de vancomicina, concentração esta em que isolados totalmente sensíveis não exibem crescimento bacteriano. (14) Foram inoculados 100 µL de solução bacteriana em solução fisiológica estéril, ajustada a 0,5 McFarland em cada placa e cultivada a 37°C, por 48 horas. Foram consideradas suspeitas de serem VISA caso fosse observado crescimento de mais de 1000 colônias em 48 horas, e de serem hVISA caso crescessem menos de 1000 colônias. Todos os isolados que cresceram na triagem foram considerados possíveis hVISA e submetidos à análise de população (PAP) para vancomicina.

4.5.3 Análise de população

Isolados que foram positivos na triagem e as que mudaram para resistentes à daptomicina em 48 horas (antimicrobiano bactericida, e, portanto, comportamento a ser investigado) foram submetidas à PAP. O experimento da PAP foi realizado como descrito na literatura. (14,16)

As linhagens *S. aureus* Mu50, Mu3 e N315 foram usadas como controles de linhagens VISA, hetero-VISA e sensível à vancomicina, respectivamente. O experimento foi realizado em triplicatas independentes, sendo que, a cada repetição, todos os controles eram utilizados simultaneamente aos isolados de interesse, em todas as concentrações estudadas. Para daptomicina foram utilizadas placas com daptomicina na concentração de 0; 0,125; 0,25; 0,5; 1; 1,5; 2; 3; 4; 5; 6; 7 e 8 µg/mL, com inóculos de diferentes concentrações de bactéria, de 10⁸ a 10 UFC/mL. Para vancomicina, foram utilizadas placas com vancomicina nas concentrações de 0; 0,5; 1; 2; 3; 4; 5 e 6 µg/mL e inóculos de bactéria ajustados de 10⁸ a 10 UFC/mL.

Para traçar a curva foram utilizadas as diluições em que contagem de colônias foi entre 30 a 300 colônias, e feito o gráfico do logaritmo na base 10 do número de unidades formadoras de colônias (UFC) por mililitro (log UFC/mL) versus a concentração do antibiótico, com os programas Origin 6.6 (OriginLab, EUA) e Excel® (Microsoft, Windows

7, Redmond, WA, EUA). A área abaixo da curva foi calculada usando o programa Origin 6.6 (OriginLab, EUA).

A análise dos gráficos de análise de população para determinar se os isolados foram caracterizados ou não como heterorresistentes foi feita utilizando os critérios Hiramatsu, Wooton e El-Halfay e Valvano para vancomicina, e, para daptomicina, foram utilizados os mesmo critérios, adaptados para o ponto de corte de resistência para daptomicina. (14-16)

4.5.4 Determinação do padrão de hemólise

Foi realizado teste para determinar produção de hemólise e sua classificação, para cada um dos isolados de MRSA. Segundo recomendações da ANVISA, foram feitas placas de ágar sangue 5 %, utilizando meio sólido com BHI (Becton Dickinson, Franklin Lake, EUA) e ágar (Kasvi, Curitiba, Brasil) e sangue de carneiro. (100) Foi feita punção de cultura de cada isolado crescido previamente, a 37 °C por 24 horas em meio sólido BHI (Becton Dickinson, Franklin Lake, EUA) contendo ágar (Kasvi, Curitiba, Brasil) e observado halo de hemólise após 24 horas. Foram utilizados como controles, para α -hemólise (hemólise incompleta) a linhagem *Enterococcus faecium* VRE16, e para β -hemólise (hemólise completa) a linhagem de *S. aureus* ATCC 25923.

4.5.5 Investigação para produção de biofilme

Ensaio para verificar produção de biofilme foi feito cada isolado, a fim de observar se havia um perfil regular de produção ou não biofilme entre os isolados do estudo. Caso as amostras de MRSA fossem produtoras de biofilmes, encontrar a melhor produtora.

O ensaio para verificação da produção de biofilme foi realizado por método indireto, de acordo com Tendolkar e colaboradores. (101) Sucintamente, cultura de cada isolado crescido por 24 horas a 37 °C em caldo BHI (Becton Dickinson, Franklin Lake, EUA) com 0,75% p/v glicose (Synth, Diadema, Brasil), foi centrifugada a 5000xg por 10 minutos, resuspensa em 5 mL de caldo, medida densidade ótica (DO) em microplaca, utilizando leitora de microplacas Celer Polaris UV (Celer, Uberlândia, Brasil) e padronizadas para DO igual a 1.

A cultura padronizada foi então diluída 1:40 no mesmo meio de cultura e alíquotas de 200 µL foram distribuídas em poços de microplaca de polietireno estéril. A seguir, foram incubadas a 37 °C por 24 horas, para crescimento de biofilme. Após incubação, as células planctônicas foram aspiradas e feitas três lavagens com tampão PBS. As placas foram deixadas secar e em seguida foram adicionados 200 µL de solução aquosa 0,2 % de cristal violeta (Synth, Diadema, Brasil) que ficaram incubados por 15 minutos a temperatura ambiente.

A quantidade de solução cristal violeta que se adere a cada poço da microplaca é proporcional a quantidade de biofilme formada. A solução de cristal violeta foi retirada por aspiração e em seguida lavada com 200 µL de tampão PBS, por três vezes. Por fim, a solução de cristal violeta que se ligou ao biofilme foi retirada com 200 µL de solução 80:20 (vol:vol) de álcool etílico (Synth, Diadema, Brasil) e acetona (Synth, Diadema, Brasil) e a absorbância foi medida a 595 nm em leitora de microplaca Celer Polaris (Celer, Uberlândia, Brasil). Tal absorbância é proporcional a quantidade de biofilme formada.

Foi utilizada linhagem *S. epidermidis* ATCC35984 como controle de linhagem boa formadora e linhagem *S. epidermidis* ATCC12228 como controle de linhagem má produtora de biofilme. À cada série de experimento, foram utilizados os controles boa e má formadora de biofilme e os ensaios foram realizados em 12 repetições para cada isolado e controles de cada experimento. Relevância estatística foi avaliada utilizando ANOVA.

4.6 Pesquisa por mecanismos de heterorresistência

4.6.1 Sequenciamento dos genes *graSR*, *vraSR*, *mprF* e *rpoB*

Todos os isolados caracterizados como hDNSSA ou hVISA tiveram os genes relacionados com heterorresistência à daptomicina (*mprF* e *rpoB*) e vancomicina (*graR*, *graS*, *vraR*, *vraS*) sequenciados, uma vez que é descrita associação entre resistência à daptomicina e vancomicina. (20, 36, 41, 102) Para tanto, PCR para amplificação de cada gene completo foi realizada, utilizando pares de *primers* apresentados na Tabela 5. Condições de amplificação para estes genes foram baseado em estudo anterior de caracterização de *S. aureus* do nosso grupo. (103)

Tabela 5 - Iniciadores utilizados no sequenciamento dos genes *rpoB*, *mprF*, *graRS* e *vraRS*. (*= *primers* usados na PCR).

Iniciador	Gene	Sequência	Tamanho do gene (pb)
mprF-F1*	<i>mprF</i>	ATG AAT CAG GAA GTT AAA AAC AAA ATA	2523
mprf-R1		ACT TTA GTG TCG TGT GTT GAA	
mprF-F2		TTGACGCTCATGTATCATTCA	
mprF-R2	<i>mprF</i>	GCTATTATTTTTGTTCTGCTTATTGTA	
mprF-F3		CATTCTTCACTTACGCTTCATA	
mprF-R3		ACACATGCCTTTATATCATAATTTTC	
mprF-F4		GAAGCAATTATTGATTTAACGCA	
mprF-R4*		GCGTGTAATACGTCACAAATAA	
rpoB-F1*	<i>rpoB</i>	TTG GCA GGT CAA GTT GTC CA	3552
rpoB-R1		CTC AAG TGA CCA AGA AAT TGT TGA CCTT	
rpoB-F2		GGCACTGAAAACACTGAACAAGC	
rpoB-R2		ATCGGTTTATCAAGAATGGAAAGAGTTGTAC	
rpoB-F3		TTAGGTAACCGTCGTTTACGTTCTGTAG	
rpoB-R3		ATCGCCGAAGCAAGTTGTTTC	
rpoB-F4		GCATTGATGGGTGCGAACATG	
rpoB-R4		TTAGTTGGTAAAGTAACGCCTAAAGGTG	
rpoB-F5		AATCACAAGAGATATTCCTAATGTTTCTGA	
rpoB-R5		GCACATGGTTGATGATAAATTACATGCG	
rpoB-F6		CGTTCAACAGGACCATATTCACCTG	
rpoB-R6*		GCTCCTGAAACACAAAAAGAAGTTACTGATTAA	
graR F1*	<i>graR</i>	ATG CAA ATA CTA CTA GTA GAA GAT G	675
graR R1*		AAA AGG ATA TAT GGC TCA TGA ATA A	
graS F1*	<i>graS</i>	ATG AAT AAT TTG AAA TGG GTA GCT TAT	1041
graS R1		CTG TGA CAG CCA TGA AAT TA	
graS F2		GAATGGTCTCGTATAAACTCGA	
graS R2*		GGAAGTGACAAATTTGTCATTTTAA	
vraR F1*	<i>vraR</i>	ATG ACG ATT AAA GTA TTG TTTGTG	630
vraR R1*		GCA TTC CAA CAT AAT TTA ATT CAA TAG	
vraS F1*	<i>vraS</i>	ATG AAC CAC TAC ATT AGA ACA ATT G	1044
vraS R1		CAA AGA CTA GCT CGA GAA CT	
vraS F2		CGGCAAGTATGATGCTTT	
vraS R2*		GGAGGATTTCGTATGACGATTAA	

Fonte: Elaborada pela autora, baseado em DABUL (103)

Para reação de 50 µL foram utilizados 100ng de DNA, 1,5 U de taq DNA polimerase e concentrações finais de *primers* a 0,5 µM, dNTPs a 200 µM e MgCl₂. O programa consistiu de uma etapa inicial de desnaturação a 94 °C por 2 minutos, seguida de 30 ciclos de desnaturação à 94 °C por 2 minutos, anelamento à 55 °C por 1 minuto e extensão à 72 °C por 2 minutos, e extensão final à 72 °C por 2 minutos. Apenas para amplificação do gene *rpoB*, temperatura de anelamento utilizada foi de 52 °C, com restante do ciclo idêntico aos demais

genes. Os tamanhos esperados para *mprF*, *rpoB*, *graR*, *graS*, *vraR* e *vraS* são 2523, 3552, 675, 1041, 630 e 1044 pares de base, respectivamente.

Os produtos de PCR foram confirmados quanto à pureza e tamanho por eletroforese em gel de agarose 1%, 5 V/cm, e em seguida, os produtos de PCR foram purificados com conjunto *Wizard® SV Gel and PCR Clean-up System* (Promega, Fitchburg, EUA). O produto de PCR purificado foi quantificado e conferido pureza (280/260 nm) em equipamento nanodrop 2000 (Thermo Fisher Scientific Co., Waltham, Massachusetts, EUA).

Posterior sequenciamento foi realizado em equipamento *Applied Biosystems® 3130 Genetic Analyser* (Life Technologies, Carlsbad, EUA). As sequências produzidas foram analisadas no programa *Contig Express* do pacote Vector NTI® 11.0 (Life Technologies, Carlsbad, EUA), para verificação da qualidade dos eletroferogramas e alinhadas, para formação de *contigs*. As sequências dos genes de interesse de cada isolado foram comparadas com sequências respectivas dos genes da linhagem sensível *S. aureus* N315.

4.6.2 Expressão gênica relativa dos genes *graR*, *vraR*, *mprF*, *rpoB* e *dltA* para isolados heterogêneos

A expressão gênica relativa foi investigada em relação ao isolado SCMSC31 (sensível a daptomicina e vancomicina), SCMSC 29 (hVISA e hDNSSA) e SCMSC35 (hDNSSA). O isolado SCMSC31, relacionado por similaridade aos isolados heteroresistentes, foi usado como controle sensível para esta comparação.

Todos os isolados foram cultivados em caldo BHI, a 37°C, sob agitação de 130 rpm, por 18 hours. Em seguida, 100µL deste pré-inóculo foi diluído para volume total de 5 mL de meio BHI fresco e as culturas foram crescidas até alcançar Densidade Óptica a 600 nm (DO₆₀₀) com valor entre 0,6-1,0. As células foram separadas por centrifugação a 14.000 x g por 2 minutos, a 4° C e o sobrenadante foi descartado. As células passaram por lise com 3 mg/mL de lisozima (Sigma-Aldrich Co., St Louis, EUA) e 3 mg/mL de lisosafina (Sigma-Aldrich Co., St Louis, EUA), com solução prepada em tampão TE, pH 8,0.

Extração de RNA foi realizada por meio de kit comercial *SV Total RNA Isolation System* (Promega Co., Madison, USA), de acordo com as recomendações do fabricante. A concentração de RNA obtida foi determinada por medida de absorbância a 260 e 280 nm (A₂₆₀ e A₂₈₀, respectivamente) usando espectrofotômetro NanoDrop 2000c Spectrophotometer (Thermo Scientific, Waltham, USA). A pureza do RNA foi medida pela razão A₂₆₀/A₂₈₀, que

considerada boa entre 1,8 to 2,1. Para transcrição reversa, foi utilizado kit commercial *SuperScript™ III First-Strand kit* (Invitrogen, Carlsbad, USA), de acordo com as recomendações do fabricante, usando 50 ng of hexômeros randômicos e 1 µg de RNA total, gerando 20 µL de cDNA na concentração de 50 ng/µL. A avaliação da expressão gênica, por qPCR, de *vraR*, *graR*, *mprF*, *rpoB* e *dltA* (número de acesso de todos os genes em Gene Bank: ASZO000000000) foi realizada utilizando *gmk* (Gene ID BAB42304), *tpi* (Gene ID BAB41962) e *pta* (Gene ID BAB41777) como referências para normalização de expressão. Os *primers* utilizados para amplificação qPCR são mostrados na Tabela 6.

Uma mistura de cDNA foi utilizada para otimização das temperaturas de anelamento; esta mistura foi utilizada também em uma curva padrão para determinação de eficácia de primer, que por sua vez, foi utilizada para corrigir valores de expressão. (104) A mesma mistura foi utilizada para avaliar a estabilidade dos genes de referência (*gmk*, *tpi* e *pta*) com RefFinder. (105) Todos os três genes foram considerados estáveis para normalização da expressão relativa.

Tabela 6 - Primers utilizados para amplificação de qPCR

Gene	Primer	Sequência
<i>vraR</i>	<i>vraR-F</i>	GCTAGTGCATCGCATATTAC
	<i>vraR-R</i>	CTATTGAATTAAATTATGTTGGAATGC
<i>graR</i>	<i>graR-F</i>	GGGATGATGAAGCATTGTGTTAG
	<i>graR-R</i>	TTATTCATGAGCCTATTATCCTTTT
<i>mprF</i>	<i>mprF - F</i>	TTGACGCTCATGTATCATTCA
	<i>mprF-R</i>	ACTTTAGTGTCTGTGTGTTGAA
<i>rpoB</i>	<i>rpoB-F</i>	ATCGCCGAAGCAAGTTGTTTC
	<i>rpoB-R</i>	CATGTTTCGCACCCATCAATGC
<i>dltA</i>	<i>dltA-F</i>	CCTCACAGAGCAGCAAAAAGC
	<i>dltA-R</i>	CCTCACAGAGCAGCAAAAAGC
<i>gmk</i>	<i>gmk-F</i>	ATCGTTTTATCGGGACCATC
	<i>gmk-R</i>	CATTTGACGTGTTGTCATTG
<i>tpi</i>	<i>tpi-F</i>	TCGTTTCATTCTGAACGTCGTGAA
	<i>tpi-R</i>	CGTCTGTTTCACCAACACAAAT
<i>pta</i>	<i>pta-F</i>	GTAAAAATCGTATTACCTGAAGG
	<i>pta-R</i>	CCTAACACGATTGGTGTAACAT

Fonte: Elaborada pela autora.

Para amplificação por qPCR, o corante fluorescente de ligação ao DNA PowerUP™ SYBR® Green PCR Master Mix (Thermo Fisher Scientific, Waltham, EUA) foi utilizado de acordo com as recomendações do fabricante, com 5 ng de cDNA por reação. Foi utilizado

sistema de detecção de PCR em tempo real CFX96 Touch™ (Bio-Rad, Hercules, EUA) e as condições de amplificação foram: uma etapa 50 °C durante 2 minutos, seguida de outra etapa a 95 °C por 2 minutos e, em seguida, 40 ciclos de 15 segundos a 95 °C e 1 minuto a temperatura de anelamento ideal (variando de 56 a 60 °C, dependendo dos *primers*). Uma curva de *melting* foi realizada após cada corrida (aumentando 0,5 °C por segundo, de 65 a 95 °C), para certificar a especificidade da amplificação em cada reação. A reação qPCR foi realizada em triplicatas técnicas e duas replicatas independentes. A expressão relativa foi calculada usando as razões dos três genes de referência, utilizando o método $\Delta\Delta CT$ comparativo com correção de eficiência de PCR. (106)

4.6.3 Análise de espessura da parede celular

Análise de espessura de parede celular foi realizada para isolados heteroresistentes e novamente como controle sensível o isolado SCMSC31, utilizando microscopia eletrônica de transmissão. As células foram preparadas para microscopia eletrônica de transmissão como descrito anteriormente. (107)

Sucintamente, células de pré-inóculos após crescimento por 18 horas foram diluídas e cultivadas em caldo BHI a 37°C, até atingirem DO_{600} de 0,3. Depois, foram lavadas com tampão PBS e tratadas com solução de glutaraldeído a 3% por 2 horas. Após a lavagem, as células foram fixadas usando solução de ósmio, lavadas novamente e desidratadas com concentração crescente de solução de etanol (30 a 100% de etanol). Posteriormente, as células foram lavadas com óxido de propileno e transferidas para um bloco de araldite.

Fatias de um micrometro foram utilizadas para observação em um microscópio eletrônico JEOL-100CX-II (JEOL, Tóquio Japão). A visualização e etapas de preparo de rede foram realizadas nas dependências do Laboratório Multiusuário de Microscopia Eletrônica (LMME) do Departamento de Biologia Celular Molecular e Bioreagentes Patogênicos da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto (Universidade de São Paulo-USP). A espessura da parede celular foi avaliada usando imagens fotográficas com ampliação de até 100 mil vezes. Foi realizada medida em duplicata de trinta células diferentes de cada linhagem e ao menos seis medidas de pontos diferentes da parede celular foram realizadas utilizando o software aberto Image J (108). Os valores médios e os desvios padrão das medidas de parede celular foram determinados para cada isolado e a significância estatística foi avaliada por teste de Student. Este experimento foi realizado em duplicatas independentes.

4.6.4 Ensaio de autólise

A fim de comparar se isolados heteroresistentes possuíam maior taxa de autólise ou maior velocidade de autólise, estas foram comparadas com o isolado SCMSC31, utilizado como controle sensível nos experimentos. Os ensaios de autólise foram realizados conforme descrito anteriormente, utilizando 0,05% Triton X-100 v/v. (109)

De modo resumido, as células foram crescidas até DO_{600} de 0,3, lavadas e ressuspensas a uma DO_{600} de 1,0 em tampão com 50 mM de glicina e Triton X-100 a 0,05%, pH 8.0. Foi realizada autólise com incubação por 3 horas a 37°C em espectrofotômetro SpectraMax M5 (Molecular Devices, California). Todos os experimentos foram realizados com triplicatas biológica e técnica. Relevância estatística da taxa de autólise após 3 horas de incubação para cada isolado, no mesmo tempo, foi analisada por teste de Student.

4.6.5 Despolarização de membrana

Para observar se havia diferenças no tempo e na taxa de despolarização de membrana causada por daptomicina em isolado sensível comparada com isolados heteroresistentes, foi realizado ensaio de despolarização de membrana celular conforme descrito anteriormente. (110) Para tanto, SCMSC31 foi utilizado como controle sensível a daptomicina e vancomicina e isolados heteroresistentes SCMSC19, 29 e 35.

O corante fluorescente DiSC₃(5) foi utilizado, pois é sensível a mudança em potencial de membrana na concentração final de 0,4 μ M. A fluorescência foi observada por pelo menos 30 minutos antes de se adicionar daptomicina, tempo em que houve uma estabilidade no valor de fluorescência. Após tratamento com daptomicina na concentração final de 16 μ g/mL, a fluorescência foi medida durante 90 minutos. Cabe ressaltar que tratamentento com daptomicina foi realizado com concentração final de íon cálcio de 50 μ g/mL.

A observação de fluorescência foi realizada em espectrofotômetro SpectraMax M5 (Molecular Devices, Sunnyvale, USA) e os resultados foram expressos em variação percentual de fluorescência em relação a controle sem tratamento, no mesmo tempo de exposição. Uma vez que variação de fluorescência é proporcional a despolarização de membrana, o comportamento desta pode ser medido de forma indireta. Foi utilizado comprimento de onda de excitação de 622 nm e comprimento de onda de emissão em 670 nm.

CCCP (Sigma-Aldrich, Saint Louis, USA) foi utilizado na concentração de 1,6 µg/mL como controle positivo interno para despolarização, já que o mesmo também causa despolarização de membrana, bem como daptomicina, para confirmar que a o experimento de fato causava despolarização de membrana.

4.6.6 Curvas de crescimento

Para estudar se alguns dos isolados caracterizados com resistência heterogênea para vancomicina ou daptomicina cresciam mais devagar que isolado sensível, foi realizado experimento de curva de crescimento. Para tanto, foi utilizado protocolo adaptado de Hall e colaboradores (2014). (111)

Resumidamente, culturas dos isolados de interesse foram crescidas em meio BHI e MHCA, por cerca de 18 horas. Após este período, foram ajustadas para OD_{600nm} entre 0,05 a 1, em equipamento espectrofotômetro Spectramax M5 (*Molecular Devices*, Califórnia, EUA). Foram inoculados 200 µL da cultura ajustada em microplaca de 96 poços e feita medida de DO₆₀₀, a cada 5 minutos, por tempo total de 10 horas e agitação da placa durante 5 segundos, antes e depois de cada medida. Experimento foi realizado em seis replicatas para cada isolado. Gráfico do tempo versus DO₆₀₀ foi traçado utilizando software Excel, e aproximado a fit exponencial, com parâmetro R² maior que 0,99. Foram realizados três experimentos independentes, em cada um com seis replicatas técnicas.

5 RESULTADOS E DISCUSSÕES

5.1 Amostras de MRSA

No período estudado, foram isolados 49 *S. aureus* de infecções de pacientes neste hospital. Destes *S. aureus*, 42 foram caracterizados como MRSA e sete como MSSA. Excluindo as duplicatas, deixando apenas o primeiro isolado de cada paciente, restaram 27 MRSA de 34 *S. aureus*, representando taxa de MRSA de 79,4% neste hospital neste período. Este valor é alto e preocupante, comparada à média brasileira de 40 a 50%. (112)

5.2 Tipagem molecular

Análise de similaridade por padrão de restrição com *Sma*I por PFGE, agrupou todas os isolados em apenas três pulsotipos e dez subtipos, sendo o pulsotipo A o prevalente com 88,9% (24 isolados) dos isolados classificados neste. Deste pulsotipo, o subtipo predominante foi A3, com 33,3% dos isolados (nove). A presença de maior parte dos isolados em um subtipo mostra que é possível ter ocorrido disseminação das linhagens presentes neste hospital, no período estudado. O dendrograma da análise de similaridade com todos os resultados deste trabalho está apresentado no Apêndice 2. Dendrograma apenas com análise de similaridade e perfis moleculares encontrados segue abaixo, na figura 6.

Os resultados de MLST para 16 isolados selecionados, mostram que a grande maioria dos isolados neste período pertenciam ao antigo complexo clonal 5, sendo apenas um isolado pertencentes ao antigo CC8. Os ST's mais frequentes foram ST5 e ST105, ocorrendo também, em um único isolado, presença de ST8. O último é um “variante de locus único” (SLV, do inglês “*Single Locus Variante*”) do ST239, ou seja, difere do perfil alélico do ST239 por apenas um número alélico. Dos 16 isolados que tiveram seu ST determinado, 11 foram ST105 (68,8%), quatro ST5 (31,2%), um ST8 (3,6%). A forte presença de linhagens do CC5 favorece o aparecimento de isolados VRSA, que é causa de grande preocupação, já que todos VRSA, exceto um, isolados nos Estados Unidos eram pertencentes ao CC5, bem como VRSA isolado em Portugal, colaborando com a teoria de que o CC5 favorece o aparecimento de resistência à vancomicina. (113)

Figura 6 - DENDROGRAMA DE SIMILARIDADE COM DADOS DOS ISOLADOS E DE TIPAGEM MOLECULAR. Isolados foram considerados de mesmo pulsotipo quando possuíam mais que 80% de similaridade, idênticos quando 100% similares e mesmo subtipo entre 80% e 100% similares. Subtipo A1 foi designado para o isolado mais antigo.

Fonte: Elaborada pela autora, com auxílio do software Bionumerics ®

De todos os isolados, 26 (96,3%) possuíam elemento *SCCmecII* e apenas um (3,6%) possuía *SCCmecIV*. Nenhum outro tipo de *SCCmec* foi encontrado neste grupo de amostras de MRSA, incluindo *SCCmecIII*, referente ao então prevalente Clone Endêmico Brasileiro (BEC). Tal observação é consistente com a substituição do BEC por outras linhagens, que tem sido observada, desde os anos 2000. (10, 34, 14-116) Com estes dados de tipagem de elemento *SCCmec* e MLST, foi possível observar que neste hospital e período houve disseminação de duas linhagens prevalentes, ST5-*SCCmecII* e ST105-*SCCmecII* SLV's do clone Nova York/Japão. Além da presença de apenas um isolado da linhagem ST8-*SCCmecIV* (relacionado à USA300, USA500 e EMRSA-2). (6,117-118)

Análise do perfil de virulência mostrou que nenhum isolado possuiu gene que codifica as toxinas estafilocócicas SEB, SEE, a toxina da síndrome do choque tóxico TSST, leucocidina PVL, e toxinas esfoliativas ETA e ETB. Todos foram positivos para leucocidina lukDE e alfa e gama hemolisinas (HLA e HLG, respectivamente). Quanto a presença dos outros genes testados, houve a taxa de presença de das toxinas estafilocócicas SEA, SEC e SED foi de 3,7%, delta hemolisina (HDL) de 14,8%, enterotoxina SEG de 44,4%, HLG

variante de 48,1%, gene para enterotoxina SEJ foi encontrada em 55,6%, beta hemolisina (HLB) em 70,4%, enterotoxinas SEH e SEI em 92,6%, e enterotoxinas SEO, SEN e SEM em 96,3%. Considerando apenas os genes mais presentes, 85% dos isolados apresentaram simultaneamente 8 genes de fatores de virulência (*seh*, *sei*, *sen*, *seo*, *sem*, *lukDE*, *hla* e *hla*). Já para perfis idênticos, os mais comuns incluíram apenas 10% dos isolados, sendo: “*seg*, *seh*, *sei*, *sej*, *sen*, *seo*, *sem*, *lukDE*, *hla*, *hla*, *hlg*” e “*seh*, *sei*, *sem*, *seo*, *sem*, *lukDE*, *hla*, *hla*, *hlg*”. Análise dos perfis de virulência encontrados utilizando dendrograma apenas, não mostrou associação entre separação em pulsotipos e presença de perfis de virulência (figura 7).

Figura 7 - DENDROGRAMA DE SIMILARIDADE COM PERFIS DE VIRULÊNCIA. Cada perfil de virulência diferente está destacado com uma cor que se repete em outro isolado caso apresente exatamente o mesmo perfil de virulência.

Fonte: Elaborada pela autora.

Agrupamento por característica binária (presença ou não de cada gene de virulência) utilizando software Bionumerics ® 7.1 (Applied Maths NV, Bélgica), apresentado na figura 8. O mesmo critério para análise de similaridade e valor de corte foi utilizado para ser caracterizado em mesmo grupo, ou seja, baseou-se em 80% de similaridade do perfil de virulência. Por este agrupamento do Bionumerics ® 7.1, os isolados são agrupados em apenas

dois grupos, sendo que o segundo grupo contém apenas SCMSC44, único de pulsotipo C, enquanto todos os outros são incluídos em apenas um grupo, mostrando certa aproximação com análise de PFGE.

Figura 8 - AGRUPAMENTO DOS ISOLADOS BASEADO NO PERFIL DE VIRULÊNCIA.

Fonte: Elaborada pela autora, com auxílio do software Bionumerics.

Inicialmente, agrupamento dos perfis de virulência feito por método PCA não foi capaz de separar de modo significativo os isolados, já que possuem perfis bem parecidos de virulência, exceto SCMSC44, que é bem diferente por similaridade por PFGE, único isolado no pulsotipo C e também o único com *SCCmecIV* e ST8. Entretanto, quando observado o gráfico da análise em duas componentes principais dos isolados juntamente com seus pulsotipos (figura 9), foi possível observar certa aproximação dos dois métodos de agrupamento, com confiabilidade de 81,5%, já que mesmo por PFGE, os pulsotipos A e B são separados apenas por 79,3% de similaridade e seriam considerados de mesmo pulsotipo se fossem similares em mais que 80%.

Figura 9 - ANÁLISE PCA1 X PCA2 COMPARADA COM PULSTOTIPOS. Apesar de PCA ser capaz apenas de separar de modo bem definido o isolado mais diferente (SCMSC44), de pulstipo C, quando comparados os resultados de PFGE e PCA, a última metodologia praticamente agrupa isolados de mesmo pulstipos, sendo coerente com a técnica de PFGE, assim como o dendrograma de similaridade, os grupos A e B são muito próximos.

Fonte: Elaborada pela autora.

Análise das famílias de plasmídeos presentes nos isolados, de acordo com os grupos definidos por Jensen *et. al*, mostrou a presença das seguintes famílias de genes *rep* nas respectivas taxas: rep5 em 75,2% dos isolados, rep19 em 73,8%, rep16, rep7, rep10 em 62,6%, 45,2% e 26,2%, respectivamente. (73) Desse modo, das nove famílias já descritas em *S. aureus* (rep1, 5, 7, 10, 13, 15, 16, 19, único), cinco (55,5%) estiveram presentes no grupo de isolados estudado. Nenhuma das famílias ainda não descritas em *S. aureus* e testadas neste estudo foi encontrada. O perfil de famílias de plasmídeos presentes mais comum encontrado foi “rep5/rep16/rep19”, em 31% do grupo estudado.

Ainda, analisando os dados dos perfis de famílias de plasmídeos presentes com o dendrograma de similaridade gerado por PFGE (figura 10), não há associação entre pulstipos e perfis de famílias de plasmídeos presentes.

Figura 10 - DENDROGRAMA DE SIMILARIDADE COM FAMÍLIAS PLASMÍDEOS PRESENTES. Cada perfil diferente está destacado com uma cor e iguais com a mesma cor.
Fonte: Elaborada pela autora.

Quando comparados os resultados de famílias de plasmídeos presentes com os resultados dos perfis de virulência, não há correlação entre a presença de determinadas famílias de plasmídeos do agrupamento proposto por Jensen et al (73) e fatores de virulências específicos, embora muitos dos genes destes fatores estarem presentes em plasmídeos (figura 11). Muito provavelmente a classificação de plasmídeos por genes *rep* proposta não deve ser relacionada ao perfil de virulência. Soma-se ainda o fato de que dos genes de virulência encontrados, apenas três estão presentes em plasmídeos (enterotoxinas SEC, SED e SEJ).

Figura 11 - COMPARAÇÃO ENTRE PERFIS DE VIRULÊNCIA E DE FAMÍLIA DE PLASMÍDEOS. O dendrograma mostra que não há relação entre família de plasmídeos de perfis de virulência, ou entre estes e clonalidade.

Fonte: Elaborada pela autora

5.3 Tipagem fenotípica

Antibiograma preliminar realizado no hospital por método automatizado mostrou que todos os isolados, exceto SCMSC35 (não determinado), foram resistentes a 15 dos 17 antimicrobianos testados (Tabela 7). Aqueles foram sensíveis a apenas sulfametoxazol-tripetoprim e vancomicina (Tabela 7), sendo, portanto, caracterizados como isolados multirresistentes (MDR, do inglês, “*Multi Drug Resistant*”), que, segundo classificação de Cantón & Ruiz-Garbajosa (2011), (119) para serem MDR, eles devem ser resistentes a pelo menos um antimicrobiano de três classes distintas.

Tabela 7 - Resultados do antibiograma do hospital, por Vitek ®

Isolado SMCSC	Penicilina	Ampicilina	Amoxacilina	Oxacilina	Cloxacilina	Dicloxacilina	Amoxacilina Ácido Clavulânico	Ampicilina Sulbactam	Eritromicina	Clarithromicina	Azitromicina	Sulfametoxazol Trimetoprim	Ciprofloxacina	Levofloxacina	Lomefloxacina	Norfloxacina	Ofloxacina	Clindamicina	Vancomicina
04	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	R	R	R	R	R	R	S
06	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	R	R	R	R	R	R	S
07	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	R	R	R	R	R	R	S
09	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	R	R	R	R	R	R	S
11	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	R	R	R	R	R	R	S
14	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	R	R	R	R	R	R	S
17	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	R	R	R	R	R	R	S
18	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	R	R	R	R	R	R	S
20	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	R	R	R	R	R	R	S
21	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	R	R	R	R	R	R	S
22	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	R	R	R	R	R	R	S
24	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	R	R	R	R	R	R	S
25	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	R	R	R	R	R	R	S
7	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	R	R	R	R	R	R	S
28	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	R	R	R	R	R	R	S
29	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	R	R	R	R	R	R	S
30	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	R	R	R	R	R	R	S
31	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	R	R	R	R	R	R	S
32	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	R	R	R	R	R	R	S
34	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	R	R	R	R	R	R	S
35	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
36	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	R	R	R	R	R	R	S
39	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	R	R	R	R	R	R	S
42	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	R	R	R	R	R	R	S
43	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	R	R	R	R	R	R	S
44	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	R	R	R	R	R	R	S
49	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	R	R	R	R	R	R	S

R = resistente, S = sensível, nd = não determinado.

Fonte: Elaborada pela autora.

Determinação da CIM por microdiluição mostrou que todas os isolados foram sensíveis para todos os antimicrobianos testados no LEMiMo (Tabela 8). Pelos valores de

CIM para estes MRSA, observa-se ótima atividade do novo antimicrobiano tedizolida. Embora preconizando os pontos de corte definidos pelo CLSI, todos os isolados foram considerados sensíveis, mas é importante ressaltar que, segundo EUCAST, três isolados seriam considerados resistentes à tetraciclina (SCMSC21, SCMSC22, SCMSC28).

Tabela 8 - Concentrações inibitórias mínimas (CIM's), em µg/mL, para os antimicrobianos testados.

Isolados	DAP	LDZ	QDA	TCP	TDZ	TET	TIG	VAN
SCMSC04	1	2	1	0,5	0,25	1	0,25	2
SCMSC06	0,5	2	1	0,5	0,25	0,5	0,25	1
SCMSC07	0,5	2	1	0,5	0,25	1	0,5	2
SCMSC09	1	4	1	2	0,25	1	0,25	2
SCMSC11	1	4	1	0,5	0,25	1	0,5	2
SCMSC14	1	2	1	0,5	0,25	1	0,125	2
SCMSC17	1	2	1	1	0,25	2	0,125	2
SCMSC18	0,5	4	1	0,5	0,25	2	0,25	1
SCMSC20	0,5	2	1	0,5	0,25	1	0,25	2
SCMSC21	0,5	2	1	1	0,25	4	0,125	2
SCMSC22	1	2	1	0,5	0,25	4	0,25	1
SCMSC24	1	2	1	0,5	0,25	2	0,25	1
SCMSC25	1	2	1	0,5	0,25	1	0,25	2
SCMSC27	0,5	2	1	0,5	0,5	1	0,25	2
SCMSC28	1	2	1	0,5	0,25	4	0,5	2
SCMSC29	1*	2	1	1	0,25	2	0,25	2*
SCMSC30	0,5	2	1	0,5	0,25	2	0,25	2
SCMSC31	0,5	2	1	0,5	0,25	1	0,25	2
SCMSC32	0,5	2	1	0,5	0,25	1	0,25	2
SCMSC34	0,5	2	1	0,5	0,25	1	0,125	2
SCMSC35	1*	2	1	0,5	0,25	0,5	0,25	2
SCMSC36	0,5	2	1	0,5	0,25	1	0,25	2
SCMSC39	1	2	1	0,5	0,25	1	0,25	2
SCMSC42	1	4	1	0,5	0,25	0,5	0,25	2
SCMSC43	0,5	2	1	0,5	0,25	0,5	0,25	2
SCMSC44	0,5	2	0,5	0,5	0,125	0,5	0,25	2
SCMSC49	1	2	1	0,5	0,25	1	0,125	2

* = presença de população heterogênea, DAP= daptomicina, LDZ = linezolida, QDA = quinupristina-dalfopristina, TCP = teicoplanina, TDZ = tedizolida, TET = tetraciclina, TIG = tigeciclina e VAN = vancomicina.

Fonte: Elaborada pela autora.

Teicoplanina foi o antimicrobiano estudado que apresentou maior eficácia, uma vez que o valor de MIC₉₀ representou apenas 12,5% do seu ponto de corte, seguida por tedizolida (MIC₉₀ representou 50% do valor do ponto de corte). Todos os outros antimicrobianos testados, embora efetivos em ensaios *in vitro*, não mostraram a mesma eficácia, uma vez que o valor de MIC₉₀ para estes alcançou o valor do ponto de corte (MIC₉₀ = 100% do ponto de corte), conforme mostrado na Tabela 9.

Tabela 9 - Valores de MIC₅₀ e MIC₉₀ para todos os antimicrobianos testados.

Antimicrobiano	MIC ₅₀ (µg/mL)	MIC ₉₀ (µg/mL)
Daptomicina	1,0	1,0
Linezolida	2,0	4,0
Quinupristina/dalfopristina	1,0	1,0
Teicoplanina	0,5	1,0
Tetraciclina	1,0	4,0
Tedizolida	0,25	0,25
Tigeciclina	0,25	0,5
Vancomicina	2,0	2,0

Fonte: Elaborada pela autora.

Apesar de apresentarem CIM's de sensibilidade, dois isolados (SCMSC35 e SCMSC29) mudaram CIM de daptomicina de 1 µg/mL em 24 horas para 2 µg/mL em 48 horas, concentração esta de resistência. Da mesma forma, um isolado (SCMSC29) mudou CIM de vancomicina de 2 µg/mL em 24 horas para 4 µg/mL em 48 horas, concentração esta de resistência intermediária. Estes isolados foram selecionados para a análise de população.

No caso específico da vancomicina, além da microdiluição, foi feita triagem para hVISA com análise de população de ponto único em placas contendo 4 µg/mL de vancomicina no meio. Na triagem, houve crescimento para três isolados (SCMSC9, 28 e 29). Como citado anteriormente, no isolado SCMSC29 também foi observada mudança de CIM em 48 horas. Todos os três isolados que cresceram na triagem passaram por confirmação do perfil de hVISA por método de PAP. Desta forma, estes 5 isolados foram considerados suspeitos de possuírem resistência heterogênea e foram selecionados para análise de população: SCMSC 29 e 35 para daptomicina e SCMSC9, 28 e 29 para vancomicina. O isolado SCMSC31, sensível para daptomicina e vancomicina e similar por PFGE foi escolhido também para comparação de perfil de análise de população.

A figura 12 mostra a distribuição da população das células destes isolados e controles nas condições da PAP com vancomicina. A curva da linhagem controle Mu3 representa uma população de células de um isolado hVISA, Mu50 de uma resistente e N315 de uma sensível.

Figura 12 - PERFIL DE ANÁLISE DE POPULAÇÃO PARA VANCOMICINA. Mu50, Mu3 e N315 são controles com resistência intermediária, heterorresistência à vancomicina e sensível, respectivamente. Isolado SCMSC31 do mesmo pulsotipo dos isolados estudados SCMSC28 e 29.

Fonte: Elaborada pela autora.

De acordo com CLSI (17), $CIM \leq 2 \mu\text{g/mL}$ define isolados sensíveis à vancomicina, $4 \mu\text{g/mL} \leq CIM \leq 8 \mu\text{g/mL}$ isolados com resistência intermediárias e $\geq 16 \mu\text{g/mL}$, resistentes. Desta forma, pelo critério de Hiramatsu, (14) isolados com população totalmente sensível são inibidas em concentrações de vancomicina menores que $4 \mu\text{g/mL}$, como observado com o controle sensível N315, que não cresce nesta concentração de vancomicina. Entretanto, em $4 \mu\text{g/mL}$ não há crescimento para as isolados SCMSC9, SCMSC28 e SCMSC31. Portanto, pelo critério de Hiramatsu, apenas o isolado SCMSC29 foi caracterizado como hVISA.

Aplicando critério proposto por Wootton e colaboradores, o qual considera hVISA apenas isolados que possuem pelo menos 90% da área do controle hVISA Mu3. (16) A razão entre a área do isolado e Mu3 para os isolados SCMSC9, 28 e 29 e 31 foi respectivamente de: 0,79; 0,58; 0,95 e 0,43. Logo, apenas o isolado SCMSC29 seria considerado hVISA.

Utilizando o critério de El-Halfawy e Valvano, (15) novamente, apenas o isolado SCMSC29 foi confirmado como hVISA. Lembrando que, por este critério, isolados homogêneos conseguem crescer em até duas vezes a concentração da própria CIM e isolados heterogêneos crescem em concentrações maiores que duas vezes a própria CIM e que para os

três isolados a CIM foi de 2 µg/mL, apenas SCMSC29 foi capaz de crescer em concentrações de 4 µg/mL, sendo totalmente inibido apenas em 5 µg/mL. Logo, caracterizando heterorresistência, de acordo com este último critério. A Tabela 10 ilustra este resultado.

Tabela 10 - Resumo dos resultados em relação presença de população resistente intermediária heterogênea para vancomicina

Isolado	Critério Hiramatu et al	Critério Wooton et al	Critério El-Halfawy e Valvano	Razão da área (isolado/mu3)	Conclusão
SCMSC9	VSSA	VSSA	VSSA	0,79	VSSA
SCMSC28	VSSA	VSSA	VSSA	0,58	VSSA
SCMSC29	hVISA	hVISA	hVISA	0,95	hVISA
SCMSC31	VSSA	VSSA	VSSA	0,43	VSSA

Fonte: Elaborada pela autora.

Em relação aos isolados com resistência heterogênea à daptomicina, embora tenham sido considerados com CIM sensível (1 µg/mL) em 24 horas, dois (SCMSC 29 e 35) mudaram CIM para valores de resistência em 48 horas (2 µg/mL). A mudança de CIM não era esperada, já que a daptomicina é um antibiótico com ação bactericida em *S. aureus* e mudança de CIM entre 48 e 72 horas pode indicar presença de subpopulação resistente com crescimento lento. (41) Desta forma, a presença de população heterogênea foi investigada por PAP (figura 13).

Figura 13 - ANÁLISE DE POPULAÇÃO PARA DAPTOMICINA. Mu50 e N315 são controles resistente e sensível, respectivamente. SCMSC29 e 35 foram consideradas hDNSSA e SCMSC31 sensível à daptomicina.

Fonte: Elaborada pela autora.

A figura 13 mostra PAP para daptomicina. Novamente, o controle sensível N315 apresenta decaimento abrupto e em concentrações de resistência (2 µg/mL, pelo CLSI) não há mais crescimento. (17) Utilizando o critério para vancomicina de Hiramatsu e colaboradores (14) e adaptando para daptomicina, os isolados continuam com crescimento até concentrações de 4 e 5 µg/mL (concentrações de níveis de resistência), o que fortemente indica presença de uma taxa de subpopulação resistente. Portanto, este critério caracteriza os dois isolados testados como heterorresistentes para daptomicina (hDNSSA).

Aplicando o critério de El-Halfawy e Valvano (15) o qual considera que isolados com população heterogênea devem crescer em concentrações maiores que duas vezes a própria CIM, e, comparando com os resultados de CIM dos isolados SCMSC29 e SCMSC35 (Tabela 8), ambos com CIM de 1 µg/mL, SCMSC29 é capaz de crescer em concentrações de daptomicina de até 5 µg/mL e SCMSC35 cresce em concentrações até 4 µg/mL. Logo, aplicando o critério de El-Halfawy e Valvano, que considera qualquer antimicrobiano, ambos são considerados hDNSSA, podendo haver falha de tratamento quando esse antibiótico for usado.

Quando observados os pulsotipos dos isolados hDNSSA (Apêndice 2), é possível observar que não se trata de uma disseminação clonal, já que não estão no mesmo subtipo. É importante ressaltar que no período estudado, daptomicina não foi utilizada para tratar infecções causadas por MRSA neste hospital, mas que vancomicina foi. O uso de vancomicina em um isolado como o SCMSC29, que é hVISA e hDNSSA, seleciona isolados que sejam hVISA, que contém resistência a outros antibióticos. No caso específico do isolado SCMSC29, caso fosse utilizada vancomicina para tratamento, haveria chance de falha terapêutica e de selecionar um isolado hVISA, hDNSSA e com resistência a outros 15 antimicrobianos testados no Vitek®.

No período do estudo, apenas daptomicina não foi utilizada no hospital, o que indica que pode ter havido pressão seletiva neste hospital por outro antimicrobiano, como por exemplo, por vancomicina, já que existe histórico de resistência cruzada entre vancomicina e daptomicina. (35-36)

No ensaio de produção de biofilme, nenhum isolado com alta produção de biofilme foi encontrado, pelo método utilizado. Cabe consignar que o método utilizado é diferente das condições fisiológicas, de sinalização, e não mimetiza os sistemas de indução presente nas mesmas.

Para teste de hemólise fenotípico em sangue de carneiro, 96,3 % dos isolados apresentaram beta hemólise (hemólise completa) e nenhum gama hemólise, sendo resultados compatíveis com o que foi encontrado no teste genotípico da presença de hemolisinas.

5.4 Pesquisa por mecanismos de heterorresistência

Para pesquisar sobre mecanismos de heterorresistência dos isolados que confirmaram tal fenômeno por PAP, sequenciou-se os genes *graSR*, *vraSR*, *mprF* e *rpoB*, já anteriormente descritos e relacionados a estes fenótipos uma vez que sequenciamento de genoma completo era inviável. Por se tratar de um estudo com amostras de MRSA clínicas, uma de cada paciente, não há um par isogênico para comparação. Por isso, o isolado SCMSC31 foi utilizado para comparação, pois é próximo por similaridade aos isolados estudados e sensível para tais antimicrobianos.

Apenas mutações silenciosas foram encontradas nos genes regulatórios *graSR* e *vraSR* e foram encontradas mutações não-sinônimas nos genes *rpoB* e *mprF*. Em SCMSC9, que pela PAP aparenta possuir pequena taxa de população heteroresistente, mas considerada ainda como sensível, foi encontrada mutação His436Asn no gene *rpoB*. Neste mesmo gene, foi encontrada mutação Thr628Ala nos isolados SCMSC29 (hDNSSA e hVISA) e SCMSC35 (hDNSSA), indicando que tal mutação pode estar relacionada ao fenótipo de heterorresistência à daptomicina, já que aparece em ambos. Cabe lembrar que *rpoB* codifica a subunidade beta da RNA polimerase, que regula a expressão de diversos genes (Tabela 11).

No gene *mprF*, que quando mais expresso está relacionado com aumento de positividade do envelope celular, foram encontradas as mutações Met347Leu (SCMSC29-hVISA/hDNSSA), e Leu722Phe (SCMSC29 -hVISA/hDNSSA e SCMSC35 (hDNSSA)). O fato da última ter sido encontrada nos isolados SCMSC29 e SCMSC35, indica que esta mutação pode estar relacionada ao fenótipo de heterorresistência a daptomicina. (Tabela 11)

Tabela 11 - Mutações encontradas em genes relacionados à heterorresistência à daptomicina e vancomicina.

Gene	Mutação	Consequência	Isolado
<i>rpoB</i>	A1864G	T622A	SCMSC29 / SCMSC35
<i>mprF</i>	A1039T	M347L	SCMSC29
	A2310T	L720F	SCMSC29 / SCMSC35

Fonte: Elaborada pela autora.

A mutação encontrada no gene *rpoB* de SCMSC29 (His436Asn) quando comparada com a sensível SCMSC31, está localizada próxima a uma região conhecida por causar resistência à rifampina. (7) SCMSC29 apresentou ainda no gene *mprF* outras duas mutações. A primeira resultando na substituição Met347Leu, numa região descrita em 2016 por Bayer e colaboradores como “*hot spot*” para mutações relacionadas à resistência à daptomicina, que codifica o domínio bifuncional da proteína MprF. Esta por sua vez, já relacionada à redução de sensibilidade à daptomicina. (7)

A segunda mutação pontual encontrada em *mprF* no isolado SCMSC29 resultou na substituição Thr551Ala, em relação a SCMSC31, região esta correspondente ao domínio sintase, que pode consequentemente, estar relacionado com o fenótipo hDNSSA apresentado.

Vários genes que regulam a espessura de parede e estrutura de membrana celular têm sido descritos como envolvidos em mecanismos de resistência. (11) Baseado nisto e na observação da presença das mutações citadas acima em *rpoB* e *mprF*, que estão ligados à codificação da subunidade β da RNA polymerase e composição de fosfolipídeos da membrana, respectivamente, medimos os níveis de expressão gênica relativa de alguns genes ligados à carga de parede celular, e espessura de membrana. (11, 120) Para tanto, foi quantificado níveis de expressão gênica dos isolados heterogêneos SCMSC29 e SCMSC35, em relação ao sensível SCMSC31, para verificação de correlação entre aumento de expressão e fenótipo de heteroressistência. Os níveis de expressão dos genes *graR*, *vraR*, *mprF*, *rpoB* and *dltA*, foram normalizados em relação aos genes de referência validados (genes *gmk*, *tpi* and *pta*), conforme mostrado na Tabela 12.

Tabela 12 - Níveis de expressão relativa dos genes pesquisados. (NS = não significativo, * = significativo)

Gene	Isolado	Expressão média	Desvio padrão	Significância P<0.001
<i>graR</i>	SCMSC31	1,00	0,00	-
	SCMSC29	2,02	0,12	*
	SCMSC35	0,81	0,17	NS
<i>vraR</i>	SCMSC31	1,00	0,00	-
	SCMSC29	2,00	0,12	*
	SCMSC35	0,99	0,06	NS
<i>mprF</i>	SCMSC31	1,00	0,00	-
	SCMSC29	2,00	0,04	*
	SCMSC35	1,11	0,15	NS
<i>rpoB</i>	SCMSC31	1,00	0,00	-

continua

Continuação da tabela 12

	SCMSC29	3,33	0,26	*
	SCMSC35	1,19	0,10	NS
<i>dltA</i>	SCMSC31	1,00	0,00	-
	SCMSC29	3,04	0,15	*
	SCMSC35	1,02	0,03	NS

Fonte: Elaborada pela autora.

É possível observar que todos os cinco genes testados possuem expressão aumentada para SCMSC29, em relação a SCMSC31, com significância estatística ($p < 0,05$), sendo que os genes *rpoB* e *dltA* estão três vezes mais expressos e os genes *vraR*, *graR* e *mprF*, duas vezes mais expressos. A expressão observada nestes dois últimos pode ainda estar diretamente relacionado com o aumento de expressão em *rpoB*. Já para SCMSC35, as diferenças de expressão relativas, comparadas a SCMSC31 não são estatisticamente relevantes. Tal resultado pode ser observado na forma gráfica, na figura 14.

Figura 14 - EXPRESSÃO GÊNICA RELATIVA NORMALIZADA. Expressão relativa para genes *graR*, *vraR*, *mprF*, *rpoB* e *dltA* dos isolados heteroresistentes em relação ao sensível. * = estatisticamente significativo.

Fonte: Elaborada pela autora.

Outra característica celular importante para a resistência à vancomicina e à daptomicina explorada foi a espessura da parede celular. Embora visualmente não pudessem ser observadas diferenças na espessura de parede celular entre isolados heteroresistentes e

sensível, as medidas de espessura de parede celular por microscopia eletrônica de transmissão mostraram tendência a aumento da parede nos isoaldos heteroresistentes SCMSC29 e SCMSC35, em relação ao isolado sensível SCMSC31, conforme mostrado na figura 15.

Figura 15 - ESPESSURA DE PAREDE MEDIDA POR MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE TRANSMISSÃO. Comparação entre isolado sensível SCMSC31 e heteroresistentes mostra que os heteroresistentes possuem tendência de aumento da espessura de parede. (A) Isolado sensível SCMSC31, (B) Isolado hVISA e hDNSSA, SCMSC29, (C) Isolado hDNSSA, SCMSC35.

Fonte: Elaborada pela autora.

É importante salientar que este estudo tem como falha o fato de SCMSC31 e SCMSC29 não serem isogênicos, e serem pertencentes a pulsotipos diferentes e variantes de locus único por MLST. Portanto a diferença de duas a três vezes mais expressão gênica dos genes testados pode não ser biologicamente relevante para fenótipo de heterorresistência. Ainda assim, as observações entre aumento de expressão gênica e espessamento de parede celular são condizentes e podem estar relacionados.

Tal resultado vai de encontro com as observações anteriores e é um indicativo de que aumento de espessura na parede celular pode estar relacionada à heterorresistência à daptomicina e vancomicina, podendo se tratar de um dos passos até a resistência total à daptomicina e VISA. (41,35)

Em experimentos de ensaio para taxa de autólise, foi observado que o isolado SCMSC29 sofreu menos ação de lise celular após três horas de exposição ao surfactante do que o isolado sensível SCMSC31, diferença esta com significância estatisticamente relevante ($p < 0,05$), conforme mostrado na figura 16, isto pode estar relacionado a uma diferença da composição da membrana, não pesquisada neste trabalho. Embora fosse possível observar menos autólise em relação ao isolado sensível SCMSC35, tal diferença não possuía

significância estatística, podendo se tratar de reflexo apenas de variância biológica natural e não relevante. Diferenças observadas na diminuição de autólise podem estar relacionadas à composição de membrana celular e de fluidez de membrana, como já descrito anteriormente.

(40)

Figura 16 – ENSAIO DE AUTÓLISE NA PRESENÇA DE TRITON X-100. O gráfico mostra experimento representativo dos resultados. Isolado heteroresistente à vancomicina e daptomicina SCMSC29 sofre menos autólise após mesmo tempo de exposição ao surfactante que o sensível SCMSC31. Não foi possível observar diferença relevante entre SCMSC35 e SCMSC31.

Fonte: Elaborada pela autora.

Em ensaio realizado para observar diferenças na intensidade e velocidade de despolarização que tratamento com daptomicina causava em isolado sensível SCMSC31 e isolados heteroresistentes, ao contrário do esperado, o isolado heteroresistente à daptomicina e vancomicina SCMSC29, após 90 minutos de exposição à daptomicina a 16 µg/mL sofreu maior nível de despolarização de membrana que o isolado sensível ($p < 0,05$). Já o isolado SCMSC35 não sofre diferença significativa na taxa de despolarização, em relação ao sensível, conforme mostrar a figura 17.

Os resultados apresentados neste trabalho não indicam menor despolarização nos isolados SCMSC29 e SCMSC35 em relação ao isolado sensível, como poderia ser esperado. De acordo com Jones e colegas, despolarização de membrana pode ser relevante para ação bactericida da daptomicina, embora não seja o fator mais importante. Ainda, cita que não é regra que isolados não sensíveis apresentem menor taxa de despolarização em relação aos sensíveis, já que outros mecanismos de resistência também foram descritos. (121)

Figura 17 - DESPOLARIZAÇÃO DE MEMBRANA NA PRESENÇA DE DAPTOMICINA À 16 μ g/mL. Curva mostra porcentagem de variação de fluorescência comparado com controle sem tratamento no mesmo tempo. Porcentagem de variação é diretamente proporcional à quantidade de despolarização de membrana. O isolado SCMSC29 sofreu mais despolarização que o sensível no mesmo tempo de exposição, enquanto não foi observada diferença significativa para SCMSC35 em relação ao controle sensível.

Fonte: Elaborada pela autora.

Em relação a diferenças de crescimento, para observar se isolados heteroresistentes cresceriam mais lentamente que o sensível, foi observado a curva de crescimento, tanto em meio de cultivo BHI, quanto em meio MHCA utilizado nos experimentos de microdiluição. Em ambos os casos, houve uma tendência dos isolados heteroresistentes crescerem mais rapidamente que o sensível, conforme mostram as figuras 18 e 19. Juntos, estes resultados sugerem que pode não haver um custo de adaptação o fenótipo de heteroresistência.

Figura 18 - CURVA DE CRESCIMENTO EM MEIO MHCA. Experimento representativo do comportamento observado em triplicatas independentes. É possível observar que os isolados heterogêneos SCMSC29 e SCMSC35 possuem crescimento ligeiramente mais rápido que a sensível SCMSC31.
Fonte: Elaborada pela autora.

Figura 19 - CURVA DE CRESCIMENTO EM MEIO BHI. Experimento representativo do comportamento observado em triplicatas independentes. É possível observar que os isolados heterogêneos SCMSC29 e SCMSC35 possuem crescimento ligeiramente mais rápido que a sensível SCMSC31.
Fonte: Elaborado pela autora.

Somados, os resultados para SCMSC29 sugerem que o aumento da expressão de *rpoB* e dos genes reguladores *graR* e *vraR* podem ser responsáveis pelo fenótipo hVISA, levando a uma autólise diminuída e parede celular ligeiramente mais espessa. Esses genes foram muitas vezes associados aos fenótipos de hVISA e VISA. (11, 41) *vraR* faz parte do sistema de dois componentes *VraSR*, que regula a síntese da parede celular, o alvo de vancomicina. *graR* também é membro de um sistema de dois componentes, denominado *graSR*, conhecido por controlar a expressão de mais de 200 genes. O gene *rpoB* codifica a subunidade beta da RNA polimerase e uma mutação neste gene pode causar uma alteração no perfil transcricional da célula. De acordo com a literatura, de fato, mutações em *rpoB* podem causar espessamento da parede celular. (122)

O fenótipo hDNSSA encontrado em SCMSC29 pode ser consequência do espessamento de parede celular e aumento de expressão nos genes, já que é possível ocorrer resistência cruzada entre daptomicina e vancomicina, (41) o que explica também o fenótipo hVISA encontrado. Além disso, o aumento da expressão de *dltA* pode causar elevação na carga positiva líquida celular e colaborar com o fenótipo hDNSSA no isolado SCMSC29, bem como aumento da expressão de *graR*, pode aumentar expressão de *mprF*, aumentando a carga positiva do envelope celular.

Por fim, o fenótipo hDNSSA do isolado SCMSC35, pode estar relacionado com as substituições Leu722Ala encontrada no domínio sintase da proteína MprF e Thr628Ala em RpoB, bem como o espessamento de parede celular. Para confirmação de tal hipótese faz-se necessário mais estudos para relacionar se estas mutações pontuais encontradas são sempre acompanhadas por resistência heterogênea ou se poderiam ser um passo entre vários até aquisição de resistência completa.

6 CONCLUSÕES

- Foi possível observar que a taxa de MRSA neste hospital, dentro deste período de estudo, foi de 79,4 % e houve disseminação de duas linhagens prevalentes de MRSA: ST5-SCC*mecII* (clone Nova York/Japão) e seu SLV, ST105-SCC*mecII*.
- O perfil dos genes de virulência prevalente foi “*seh, sei, sen, seo, sem, lukDE, hla e hlb*”
- Todos os isolados bacterianos foram sensíveis às alternativas mais recentes de tratamento, sendo teicoplanina e tedizolida os mais eficazes contra estas amostras de MRSA, dentre os antimicrobianos estudados.
- Dois isolados dentre os disseminados foram caracterizados como hDNSSA, sendo um deles simultaneamente caracterizado como hVISA.
- Os resultados para SCMSC29 sugerem que o aumento da expressão de *rpoB* e dos genes reguladores *graR* e *vraR* podem ser responsáveis pelo fenótipo hVISA, levando a uma autólise diminuída e parede celular espessa que também podem contribuir para resistência à daptomicina.
- O fenótipo hDNSSA encontrado em SCMSC35 provavelmente é devido à sua parede celular ligeiramente mais espessa e SNPs no domínio da proteína sintase MprF e no RpoB.
- Para os isolados heteroresistentes estudados, tal fenótipo não parece ser acompanhado por custo de crescimento.

REFERÊNCIAS

- 1 MADIGAN, M. T. et al. **Brock microbiology of microorganisms**. 13th.ed. São Francisco: Pearson Education, Inc., 2011. cap 26, p. 756-784.
- 2 LELOIR, Y.; BARON, F.; GAUTIER, M. *Staphylococcus aureus* and food poisoning. **Genetics and Molecular Research**, v. 2, n.1,p. 63-76, 2003.
- 3 CHAMBERS, H. F.; DELEO, F. Waves of resistance : *Staphylococcus aureus* inthe antibiotic era. **Nature Reviews Microbiology**, v. 7, n.9, p. 629-641, 2009.
- 4 BABA, T. et al. Genome sequence of *Staphylococcus aureus* strain newman and comparative analysis of staphylococcal genomes: polymorphism and evolution of two major pathogenicity islands. **Journal of Bacteriology**, v. 190, n. 1, p. 300-310, 2008.
- 5 MADIGAN, M. T. et al. **Brock microbiology of microorganisms**. 13th.ed. São Francisco: Pearson Education, Inc., 2011. cap 33, p. 944-962.
- 6 ENRIGHT, M. C. The evolution of a resistant pathogen – the case of MRSA. **Current Opinion in Pharmacology**, v. 3, n. 5, p. 474–479, 2003.
- 7 HARKINS, C. P. et al. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* emerged long before the introduction of methicillin into clinical practice. **Genome Biology**,v. 18, n. 130, 2017. doi 10.1186/s13059-017-1252-9
- 8 PETERSEN, A. et al. Epidemiology of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* carrying thenovel *mecC* gene in Denmark corroborates a zoonotic reservoir with transmission to humans. **Clinical Microbiology Infections**, v.19, n.1,E19-E22, 2012.
- 9 HIRAMATSU, K. et al. Genomic basis for methicillin resistance in *Staphylococcus aureus*. **Infection & Chemotherapy** v. 45, n. 2, p. 117-136, 2013.
- 10 OLIVEIRA, D. C.; TOMASZ, A.; LENCASTRE, H. Secrets of success of a human pathogen: molecular evolution of pandemic clones of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. **Lancet**, v. 2, n. 3, p. 180-189, 2002.
- 11 HOWDEN, B. P. et al. Reduced Vancomycin susceptibility in *Staphylococcus aureus*, including vancomycin-intermediate and heterogeneous vancomycin-intermediate strains: resistance mechanisms, laboratory detection, and clinical implications. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 23, n. 1, p. 99-139, 2010.
- 12 MORALES-CARTAGENA, A. et al. Treatment of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infections: Importance of high vancomycin minumum inhibitory concentrations. **World Journal of Clinical Infectious Diseases**, v. 5, n. 2, p. 14-29, 2015.
- 13 AL, A. M. E. Mechanisms of glycopeptide resistance in *enterococci*. **Journal of Infection**, v. 30, n. 1, p. 11-16, 1996.
- 14 HIRAMATSU, K. E. A. Dissemination in Japanese hospitals of strains of *Staphylococcus aureus* heterogeneously resistant to vancomycin. **Lancet**, v. 350, n. 9092, p. 1670 - 1673, 1997.
- 15 EL-HALFAWY, O. M.; VALVANO, M. A. Antimicrobial heteroresistance: an emerging field in need of clarity. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 28, n. 1, p. 191-206, 2015.

- 16 WOOTTON, M. et al. A modified population analysis profile (PAP) method to detect hetero-resistance to vancomycin in *Staphylococcus aureus* in a UK hospital. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 48, n. 1, p. 399-413, 2001.
- 17 CLSI. **Performance standards for antimicrobial susceptibility testing**; nineteenth informational supplement. 26th.ed. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute, 2016.
- 18 HIRAMATSU, K. et al. Multi-drug-resistant *Staphylococcus aureus* and future chemotherapy. **Journal of Infection and Chemotherapy**, v. 20, n. 10, p. 593-601, 2014.
- 19 KATAYAMA, Y. et al. Complete reconstitution of the vancomycin-intermediate *Staphylococcus aureus* phenotype of strain mu50 in vancomycin-susceptible *S. aureus*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 60, n. 6, p. 3730-3742, 2016.
- 20 CUI, L. et al. Contribution of *vraSR* and *graSR* point mutations to vancomycin resistance in Vancomycin-Intermediate *Staphylococcus aureus*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 53, n. 3, p. 1231-1234, 2009.
- 21 ROSSI, F. E. A. Transferable vancomycin resistance in a community-associated MRSA lineage. **New England Journal of Medicine**, v. 370, n. 16, p. 1524-1531, 2012.
- 22 GOULD, I. M. Treatment of bacteraemia: meticillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) to vancomycin-resistant *S. aureus* (VRSA). **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 45, n. S1, p. S17–S21, 2013.
- 23 PREVENTION CENTER FOR DISEASE CONTROL. Disponível em: <<https://www.cdc.gov/>> Acesso em: 7 ago. 2015.
- 24 DEZFULIAN, A. et al. Identification and characterization of a high vancomycin-resistant *Staphylococcus aureus* harboring *VanA* gene cluster isolated from diabetic foot ulcer. **Iranian Journal of Basic Medical Science**, v. 15, n. 2, p. 803-806, 2012.
- 25 SAHA, B. E. A. Identification and characterization of a vancomycin-resistant *Staphylococcus aureus* isolated from Kolkata (South Asia). **Journal of Medical Microbiology**, v. 57, n. 1, p. 72-79, 2008.
- 26 BANERJEE, T.; ANUPURBA, S. Colonization with vancomycin-intermediate *Staphylococcus aureus* strains containing the *vanA* resistance gene in a tertiary-care center in North India. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 50, n. 5, p. 1730–1732, 2012.
- 27 TIWARI, H.; SEN, M. Emergence of vancomycin resistant *Staphylococcus aureus* (VRSA) from a tertiary care hospital from northern part of India. **BMC Infectious Diseases**, v. 6, n. 156, 2016. doi:10.1186/1471-2334-6-156.
- 28 ELIMAM, M. A. E. et al. Emergence of vancomycin resistant and methicillin resistant *Staphylococcus aureus* in patients with different. **Journal of American Science**, v. 10, n. 6, p. 106-110, 2014.
- 29 ABDELGADEIR, L. M.; ELHASSAN, M. M. van B. Positive vancomycin-resistant *Staphylococcus aureus* among clinical isolates in Shendi City, Northern Sudan. **IOSR Journal of Dental and Medical Sciences**, v. 14, n. 3, p. 87-91, 2015.
- 30 FRIÃES, A. et al. Epidemiological survey of the first case of vancomycin-resistant *Staphylococcus aureus* infection in Europe. **Epidemiology and Infection**, v. 143, n. 4, p. 745-748, 2015.

- 31 GOODMAN, A.; GILMAN, A. **As bases farmacológicas da terapêutica**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2003. cap. 7, p. 929 - 955.
- 32 KAHNE, D. et al. Glycopeptide and lipoglycopeptide antibiotics. **Chemical Reviews**, v. 105, n. 2, p. 425 - 448, 2005.
- 33 BISCHOFF, M.; BERGER-BACHI, B. Teicoplanin stress-selected mutations increasing sigma(B) activity in *Staphylococcus aureus*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 45, n. 6, p. 1714-1720, 2001.
- 34 DABUL, A. N. G.; CAMARGO, I. L. B. C. Molecular characterization of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* resistant to tigecycline and daptomycin isolated in a hospital in Brazil. **Epidemiology Infections**, v. 142, n. 3, p. 479-483, 2013.
- 35 CAMARGO, I. L. B. C. et al. Serial daptomycin selection generates daptomycin-nonsusceptible *Staphylococcus aureus* strains with a heterogeneous vancomycin-intermediate phenotype. **Antimicrobial Agents Chemotherapy**, v. 52, n. 12, p. 4289-4299, 2008.
- 36 CUI, L. et al. Correlation between reduced daptomycin susceptibility and vancomycin resistance in vancomycin-intermediate *Staphylococcus aureus*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 50, n. 3p. 1079-1082, 2006.
- 37 MISHRA, N. N.; BAYER, A. S. Correlation of cell membrane lipid profiles with daptomycin resistance in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 57, n. 2, p. 1082-1085, 2013.
- 38 CAFISO, V. et al. *dltA* overexpression: a strain-independent keystone of daptomycin resistance and vancomycin in *Staphylococcus aureus*. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 43, n. 1, p. 26-31, 2013.
- 39 STEED, M. E. et al. Evaluation of daptomycin non-susceptible *Staphylococcus aureus* for stability, population profiles, *mprf* mutations, and daptomycin activity. **Infectious Diseases and Therapy**, v. 2, n. 2, p. 187-200, 2013.
- 40 BAYER, A. S. et al. Frequency and distribution of single-nucleotide polymorphisms within *mprf* in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clinical isolates and their role in cross-resistance to daptomycin and host defense antimicrobial peptides. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 59, n. 8, p. 4930-4937, 2015.
- 41 CUI, L. et al. An *rpob* mutation confers dual heteroresistance to daptomycin and vancomycin in *Staphylococcus aureus*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 54, n. 12, p. 5222-5233, 2010.
- 42 BERTI, A. D. et al. Heterogeneity of genetic pathways toward daptomycin nonsusceptibility in *Staphylococcus aureus* determined by adjunctive antibiotics. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 59, n. 5, p. 2799-2806, 2015.
- 43 SAKOULAS, G. et al. Induction of daptomycin heterogeneous susceptibility in *Staphylococcus aureus* by exposure to vancomycin. **Antimicrobials Agents and Chemotherapy**, v. 50, n. 4, p. 1581 - 1585, 2006.
- 44 KELLEY, P. G. et al. Daptomycin non-susceptibility in vancomycin-intermediate *Staphylococcus aureus* (VISA) and heterogeneous-VISA (hVISA): implications for therapy after vancomycin treatment failure. **Journal Antimicrobial Chemotherapy**, v. 66, n. 5, p. 1057-1060, 2011.

- 45 GALES, A. C. et al. Emergence of linezolid-resistant *Staphylococcus aureus* during treatment of pulmonary infection in a patient with cystic fibrosis. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 27, n. 4, p. 300–302, 2006.
- 46 AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA, ANVISA. **Detalhe do produto: zyvox. ANVISA**, 2005. Disponível em: <http://www.anvisa.gov.br/datavisa/fila_bula/frmVisualizarBula.asp?pNuTransacao=10865102013&pIdAnexo=1916191>. Acesso em: 12 ago. 2015.
- 47 DE ALMEIDA, L. M. et al. Dissemination of the linezolid-resistant *Staphylococcus epidermidis* clone ST2 exhibiting the G2576T mutation in the 23S rRNA gene in a tertiary-care hospital, Brazil. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v.67, n.3,p.768-769, 2012. doi:10.1093/jac/dkr538.
- 48 MEKA, V. G.; GOULD, H. S. Antimicrobial resistance to linezolid. **Clinical Infectious Diseases**, v. 39, n. 7, p. 1010-1015, 2004.
- 49 WILSON, D. N. et al. The oxazolidinone antibiotics perturb the ribosomal peptidyl-transferase center and effect tRNA positioning. **PNAS**, v. 105, n. 36, p. 13339–13344, 2008.
- 50 KEHRENGER, C.; SCHWARZ, S. Distribution of florfenicol resistance genes *fexA* and *cfr* among chloramphenicol-resistant *Staphylococcus* isolates. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 50, n. 4, p. 1156-1163, 2006.
- 51 LOCKE, J. E.; HILGERS, M.; SHAW, K. J. Novel ribosomal mutations in *Staphylococcus aureus* strains identified through selection with the oxazolidinones linezolid and terecyclid (TR-700). **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 53, n. 12, p. 5265-5274, 2009.
- 52 LI, D. et al. Co-location of the oxazolidinone resistance genes *optrA* and *cfr* on a multiresistance plasmid from *Staphylococcus sciuri*. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 72, n. 6, p. 1474-1478, 2016.
- 53 STEIN, G. E.; BABINCHAK, T. Tigecycline: an update. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v. 75, n. 4, p. 331–336, 2013.
- 54 PANKEY, G. A. Tigecycline. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 56, n. 3, p. 470–480, 2005.
- 55 PETERSON, L. R. A review of tigecycline — the first glycylcycline. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 32, n. 4, p. S215–S222, 2008.
- 56 MCALEESE, F. et al. A Novel MATE family efflux pump contributes to the reduced susceptibility of laboratory-derived *Staphylococcus aureus* mutants to tigecycline. **Antimicrobial Agents Chemotherapy**, v. 49, n. 5, p. 1865-1871, 2005.
- 57 WYETH PHARMACEUTICALS INC. **Tygacil**. 2016. Disponível em: <<http://labeling.pfizer.com/showlabeling.aspx?id=491>>. Acesso em: 21 jun. 2016.
- 58 EUCAST.: The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing, 2016. Disponível em: <http://www.eucast.org/fileadmin/src/media/PDFs/EUCAST_files/Breakpoint_tables/v_6.0_Breakpoint_table.pdf>. Acesso em: 21 jun. 2016.

- 59 MCCARTHY, A. J.; LINDSAY, J. A. The distribution of plasmids that carry virulence and resistance genes in *Staphylococcus aureus* is lineage associated. **BMC Microbiology**, v. 12, n. 104, 2012. doi:10.1186/1471-2180-12-104.
- 60 PIDDOCK, L. J. V. Clinically relevant chromosomally encoded multidrug resistance efflux pumps in bacteria. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 19, n. 2, p. 382-402, 2006.
- 61 BARTHA, N. A. et al. Investigation of the prevalence of *tetQ*, *tetX* and *tetX1* genes in *Bacteroides* strains with elevated tigecycline minimum inhibitory concentrations. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v.38, n.6, p.522-525, 2011. doi:10.1016/j.ijantimicag.2011.07.010.
- 62 STELZL, U. et al. Ribosomal proteins: role in ribosomal functions. **eLS**, p. 1-12, 2015. doi 10.1038/npg.els.0000687
- 63 MAST, Y.; WOHLLEBEN, W. Streptogramins – two are better than one! **International Journal of Medical Microbiology**, v. 304, n. 1, p. 44–50, 2014
- 64 LOCKE, J. B. et al. Tedizolid for the management of human infections: in vitro characteristics. **Clinical Infectious Diseases**, v. 58, n. S1, p. S35-S42, 2014.
- 65 RODRÍGUEZ-AVIAL, I. et al. In vitro activity of tedizolid (TR-700) against linezolid-resistant staphylococci. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 1, n. 67, p. 167-169, 2012.
- 66 PÊRA, M. C. S. M. **Terapêutica Antibiótica em infecções adquiridas na comunidade**. 2015. 107 p .Dissertação(Mestre em Ciências Farmaceuticas) -Instituto Superior de Ciências da Saúde Egas Moniz, Alameda, Portugal, 2015.
- 67 RYBAK, J. M.; ROBERTS, K. Tedizolid Phosphate: a Next-Generation Oxazolidinone. **Infectious Diseases and Therapy**, v. 4, n. 1, p. 1-14, 2015.
- 68 SHAW, K. J. et al. In Vitro activity of TR-700, the antibacterial moiety of the prodrug tr-701, against linezolid-resistant strains. **Antimicrobial agents and Chemotherapy**, v. 52, n. 12, p. 4442-4447, 2008.
- 69 MOELLERING JR, R. C. Tedizolid: a novel oxazolidinone for gram-positive infections. **Clinical Infectious Diseases**, v. S1, n. 58, p. S1-3, 2014.
- 70 SHEARER, J. E. S. et al. Major families of multiresistant plasmids from geographically and epidemiologically diverse staphylococci. **G3-Genes, Genomic, Genetics**, v. 1, n. 7, 2p. 581-591, 2011.
- 71 LINDSAY, J. A. et al. Microarrays reveal that each of the ten dominant lineages of *Staphylococcus aureus* has a unique combination of surface-associated and regulatory genes. **Journal of Bacteriology**, v. 188, n. 2, p. 669-676, 2006.
- 72 MALACHOVA, N.; DELEO, R. Mobile genetic elements of *Staphylococcus aureus*. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 67, n.18, p. 3057–3071, 2010.
- 73 JENSEN, L. B. et al. A classification system for plasmids from enterococci and other Gram-positive bacteria. **Journal of Microbiological Methods**, v. 80, n.1,p. 25–43, 2010.

- 74 SHINTANI, M.; SANCHEZ, Z. K.; KIMBARA, K. Genomics of microbial plasmids: classification and identification based on replication and transfer systems and host taxonomy. **Frontiers in Microbiology**, v. 6, n. 00242. Disponível em: <http://www.frontiersin.org/Journal/Abstract.aspx?s=406&name=evolutionary_and_genomic_microbiology&ART_Doi=10.3389/fmicb.2015.00242>. Acesso em: 21 junho 2016.
- 75 GOULD, I. M. et al. New insights into methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) pathogenesis, treatment and resistance. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v.39, n.2, p.96-104, 2012.
- 76 GRUMANN, D.; NÜBEL, U.; BRÖKER, B. M. *Staphylococcus aureus* toxins – Their functions and genetics. **Infection, Genetics and Evolution**, v. 21, p. 583–592, 2014.
- 77 MCCORMICK, J. K.; YARWOOD, J. M.; SCHLIEVERT, P. M. Toxic shock syndrome and bacterial superantigens: an update. **Annual Review of Microbiology**, v.55, , p. 77-104, 2001. doi: 10.1146/annurev.micro.55.1.77.
- 78 ARGUDÍN, M. A.; MENDONZA, M. C.; RODICIO, M. R. Food poisoning and *Staphylococcus aureus* enterotoxins. **Toxins**, v. 2, n. 7, p. 1751-1773, 2010.
- 79 SAPRI, H. F. et al. Virulence gene typing of methicillin-susceptible *Staphylococcus aureus* (MSSA) isolates in universiti kebangsaan malaysia medical centre (UKMMC). **Asia-Pacific Journal of Molecular Medicine**, v. 4, p. 1 - 4, 2011.
- 80 OMOE, K. et al. Detection of *seg*, *seh*, and *sei* genes in *Staphylococcus aureus* isolates and determination of the enterotoxin productivities of *S. aureus* isolates harboring *seg*, *seh*, or *sei* genes. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 40, n. 3, p. 857-862, 2002.
- 81 LINA, G. et al. Involvement of panton-valentine leukocidin-producing staphylococcus aureus in primary skin infections and pneumonia. **Clinical infectious Diseases**, v. 29, n. 5, p. 1128-1132, 1999.
- 82 ATKIN, K. E. et al. A different path: Revealing the function of staphylococcal proteins in biofilm formation. **FEBS Letters**, v. 588, n. 10, p. 1869–1872, 2014.
- 83 BOLES, B. R.; HORSWILL, A. R. agr-mediated dispersal of *Staphylococcus aureus* biofilms. **PLoS Pathogens**, v. 4, n. 4, p. 1-13, 2008.
- 84 FOSTER, T. J. et al. Adhesion, invasion and evasion: the many functions of the surface proteins of *Staphylococcus aureus*. **Nature Reviews Microbiology**, v. 12, n.1, p. 49-62, 2014.
- 85 FUX, C. A. et al. Survival strategies of infectious biofilms. **TRENDS in Microbiology**, v. 13, n. 1, p. 34-40, 2015.
- 86 PLATAFORMA BRASIL. Plataforma Brasil. Disponível em: <<http://aplicacao.saude.gov.br/plataformabrasil/login.jsf>>. Acesso em: 21 junho 2016.
- 87 PALAZZO, I. C. V.; REHDER, A.; DARINI, A. L. C. Quantitative disk diffusion as a convenient method for determining minimum inhibitory concentrations of oxacillin for staphylococci strains. **Journal of Microbiological Methods**, v. 71, n. 3, p. 186–190, 2007.

- 88 TENOVER, F. C. et al. Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by pulsed-field gel electrophoresis: criteria for bacterial strain typing. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 33, n.9, p. 2233–2239, 1995.
- 89 MURCHAN, S. et al. Harmonization of pulsed-field gel electrophoresis protocols for epidemiological typing of strains of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: a single approach developed by consensus in 10 european laboratories and its application for tracing, **Journal of Clinical Microbiology**, v. 41, n. 4, p. 1574–1585, 2003.
- 90 MCDOUGAL, L. K. et al. Pulsed-field gel electrophoresis typing of oxacillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates from the united states: establishing a national database. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 41, n. 11, p. 5113–5120, 2003.
- 91 MULTILOCUS SEQUENCING TYPING. MLST.. Disponível em: <<http://saureus.mlst.net/>>. Acesso em: 21 junho 2016.
- 92 FEIL, E. J. E. A. eBURST: inferring patterns of evolutionary descent among clusters of related bacterial genotypes from multilocus sequence typing data. **Journal of Bacteriology**, v. 186, n. 5, p. 1518–1530, 2004.
- 93 KONDO, Y. et al. Combination of multiplex PCRs for staphylococcal cassette chromosome *mec* type assignment: rapid identification system for *mec*, *ccr*, and major differences in junkyard regions. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 51, n. 1, p. 264 - 274, 2007.
- 94 JARRAUD, S. et al. Relationships between *Staphylococcus aureus* genetic background, virulence factors, agr groups (alleles), and human disease. **Infection and Immunity**, v. 70, n. 2, p. 631–641, 2002.
- 95 MELLES, D. C. et al. Natural population dynamics and expansion of pathogenic clones of *Staphylococcus aureus*. **Journal of Clinical Investigation**, v. 114, n. 12, p. 1732–1740, 2004.
- 96 MIORIN, L. et al. Antibacterial activity of honey and propolis from *Apis mellifera* and *Tetragonisca angustula* against *Staphylococcus aureus*. **Journal of Applied Microbiology**, v. 95, n. 5, p. 913–920, 2003.
- 97 VAN BELKUM, A. et al. Methicillin-resistant and -susceptible *Staphylococcus aureus* sequence type 398 in humans and pigs. **Emerging Infectious Diseases**, v. 14, n. 3, p. 479–483, 2008.
- 98 WETTERICH, C. B. **Uso de imagens de fluorescência para monitoramento da evolução do cancro cístico**. 2012.94p. Dissertação (Mestre em Ciências) - Instituto de Física de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2012.
- 99 GUZEK, et al. Comparison of in vitro efficacy of ertapenem, imipenem and meropenem by the Enterobacteriaceae strains family. **Anaesthesiology Intensive Therapy**, v. 45, n.2, p.67, 2013.
100. AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. ANVISA. **Descrição dos meios de cultura empregados nos exames microbiológicos- módulo IV**. Disponível em: <http://www.anvisa.gov.br/servicosauade/microbiologia/mod_4_2004.pdf>. Acesso em: 21 junho 2016.
- 101 TENDOLKAR, P. M. et al. Enterococcal Surface protein, *esp*, enhances biofilm formation by *Enterococcus faecalis*. **Infection and Immunity**, v. 72, n. 10, p. 6032–6039, 2004.
- 102 BAYER, A. S.; SCHNEIDER, T.; SAHL, H. G. Mechanisms of daptomycin resistance in *Staphylococcus aureus*: role of the cell membrane and the cell wall. **Annals of the New York Academy of Sciences**, 1277, p. 139–158, 2013. doi: 10.1111/j.1749-6632.2012.06819.x.

- 103 DABUL, A. N. G. **Estudo epidemiológico molecular de *Staphylococcus aureus* resistentes à meticilina (MRSA) isolados no Brasil e estudo da proteína reguladora de resposta GraR**. 2014. 134p. Tese (Doutorado em Ciências-opção Física Biomolecular). Instituto de Física de São Carlos, Universidade de São Paulo, 2014.
- 104 BUSTIN, S. et al. The MIQE guidelines: minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments. **Clinical Chemistry**, v. 55, n. 4, p. 611–622, 2009.
- 105 XIE, F. et al. miRDeepFinder: a miRNA analysis tool for deep sequencing of plant small RNAs. **Plant Molecular Biology**, v. 80, n. 1, p. 75-84, 2012.
- 106 VANDESOMPELE, J. et al. Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. **Genome Biology**, v.3, n.7, RESEARCH0034,2002.
- 107 HANAKI, H. et al. Activated cell-wall synthesis is associated with vancomycin resistance in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clinical strains Mu3 and Mu50. **Journal of Antimicrobial Therapy**, v. 42, n. 2, p. 199-209, 1998.
- 108 IMAGE J. **Imagej.net**, 2016. Disponível em: <<https://imagej.net/Welcome>>. Acesso em: 26 junho 2017.
- 109 DE JONGE, B. L.; DE LENCASTRE ; TOMASZ, A. Suppression of autolysis and cell wall turnover in heterogeneous Tn551 mutants of a methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strain. **Journal of Bacteriology**, v. 173, n. 3, p. 1105-1110, 1991. doi: 10.1074/jbc.274.1.29
- 110 WU, M.; HANCOCK, R. E. W. Interaction of the cyclic antimicrobial cationic peptide bactenecin with the outer and cytoplasmic membrane. **Journal of Biological Chemistry**, v. 274, p. 29-35, 1999.
- 111 HALL, B. G. et al. Growth rates made easy. **Molecular Biology and Evolution**, v. 31, n. 1, p. 232–238, 2014.
- 112 CAMPOS, G. B. E. A. Isolation, molecular characteristics and disinfection of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* from ICU units in Brazil. **New Microbiologica**, v. 35, p.183-190, 2012.
- 113 KOS, N. V. et al. Comparative genomics of vancomycin-resistant *Staphylococcus aureus* strains and their positions within the clade most commonly associated with methicillin-resistant *S. aureus* hospital-acquired infection in the United States. **mBio**, v. 3, n. 3, p. e00112-122012.
- 114 SHUENCK, R. P. E. A. Polyclonal presence of non-multiresistant methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates carrying SCCmec IV in health care-associated infections in a hospital in Rio de Janeiro. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v. 64, n. 4, p. 434-441, 2009.
- 115 TRINDADE, P. A. E. A. Prevalence of SCCmec type IV in nosocomial bloodstream isolates of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 43, n. 7, p. 3435-3437, 2005.
- 116 MIMICA, M. J. E. A. SCCmec type IV, PVL-negative, methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in cystic fibrosis patients from Brazil. **Current Microbiology**, v. 62, n. 2, p. 388-390, 2011.
- 117 REYES, J. E. A. Dissemination of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* usa300 sequence type 8 lineage in Latin America. **Clinical Infectious Diseases**, v. 49, n. 12, p. 1861-1877, 2009.
- 118 TATTEVIN, P. et al. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* USA300 clone in long-term care facility. **Emerging Infectious Diseases**, v. 15, n. 6, p. 953–955, 2009.

119 CANTÓN, R.; RUIZ-GARBAJOSA, P. Co-resistance: an opportunity for the bacteria and resistance genes. **Current Opinion in Pharmacology**, v. 11, n. 5, p. 1–9, 2011.

120 BAYER, A. S. et al. Dysregulation of *mprF* and *dltABCD* expression among daptomycin-non-susceptible MRSA clinical isolates. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 71, n. 8, p. 2100-2104, 2016.

121 JONES, T. et al. Failures in clinical treatment of *Staphylococcus aureus* infection with daptomycin are associated with alterations in surface charge, membrane phospholipid asymmetry, and drug binding. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 52, n. 1, p. 269-278, 2008.

122 MATSUO, M. et al. Mutation of RNA polymerase β subunit (*rpoB*) Promotes hVISA-to-VISA Phenotypic conversion of strain Mu3. **Antimicrobial Agents Chemotherapy**, v. 55, n. 9, p. 4188-4195, 2011.

APÊNDICE 1- primers utilizados para determinação do perfil de virulência

(*=sequenciado e confirmado por comparação com genomas disponíveis)

Toxina	Primer	Sequência de nucleotídeos	Gene	Tamanho (pb)	controle positivo
SEA	SEA-1	GAAAAAAGTCTGAATTGCAGGGAACA	<i>sea</i>	560	Mu3, Mu50
	SEA-2	CAAATAAATCGTAATTAACCGAAGGTTC			
SEB	SEB-1	ATTCTATTAAGGACACTAAGTTAGGGA	<i>seb</i>	404	ATCC 14458
	SEB-2	ATCCCGTTTCATAAGGCGAGT			
SEC	mpSEC-1	GTAAAGTTACAGGTGGCAAAACTTG	<i>sec</i>	297	Mu50, N315
	mpSEC-2	CATATCATACCAAAAAGTATTGCCGT			
SED	SED-1	GAATTAAGTAGTACCGCGCTAAATAATATG	<i>sed</i>	492	ATCC 13565
	SED-2	GCTGTATTTTTCCTCCGAGAGT			
SEE	SEE-1	CAAAGAAATGCTTTAAGCAATCTTAGGC	<i>see</i>	482	ATCC 27664
	SEE-2	CACCTTACCGCCAAAGCTG			
SEG	SEG-1	AATTATGTGAATGCTCAACCCGATC	<i>seg</i>	642	Mu50, N315
	SEG-2	AAACTTATATGGAACAAAAGGTACTAGTTC			
SEH	SEH-1	CAATCACATCATATGCGAAAGCAG	<i>seh</i>	376	ATCC 14458
	SEH-2	CATCTACCCAAACATTAGCACC			
SEI	SEI-1	CTCAAGGTGATATTGGTGTAGG	<i>sei</i>	576	Mu50, N315
	SEI-2	AAAAAACTTACAGGCAGTCCATCTC			
SEJ	mpSEJ-1	TAACCTCAGACATATATACTTCTTTAACG	<i>sej</i>	300	SCMSC28*
	mpSEJ-2	AGTATCATAAAGTTGATTGTTTTCATGCAG			
SEN	mpSEN-1	ATGAGATTGTTCTACATAGCTGCAAT	<i>sen</i>	680	Mu50, N315
	mpSEN-2	AACTCTGCTCCCACTGAAC			
SEO	mpSEO-1	AGTTTGTGTAAGAAGTCAAGTGTAGA	<i>seo</i>	180	Mu50, N315
	mpSEO-2	ATCTTTAAATTACAGCAGATATCCATCTAAC			
SEM	mpSEM-1	CTATTAATCTTTGGGTTAATGGAGAAC	<i>sem</i>	300	Mu50, N315
	mpSEM-2	TTCAGTTTCGACAGTTTGTGTGCAT			
TSST-1	TST-1	TTCATATTTGTAAGAGTGTACAGACCCACT	<i>tst</i>	180	Mu50, N315
	TST-2	TACTAATGAATTTTTTATCGTAAGCCCTT			
ETA	mpETA-1	ACTGTAGGAGCTAGTGCATTTGT	<i>eta</i>	190	<i>S. aureus</i> JCSC 6306
	mpETA-3	TGGATACTTTTGTCTATCTTTTTTCATCAAC			
ETB	mpETB-1	CAGATAAAGAGCTTTATACACACATTAC	<i>etb</i>	612	<i>S. aureus</i> JCSC 6307
	mpETB-2	AGTGAACTTATCTTTCTATTGAAAAACACTC			
Alfa hemolisina	HLA-1	CTGATTACTATCCAAGAAATTCGATTG	<i>hla</i>	209	Mu50, N315
	HLA-2	CTTTCCAGCCTACTTTTTTATCAGT			
Beta hemolisina	HLB-1	GTGCACTTACTGACAATAGTGC	<i>hla</i>	309	Mu50, N315
	HLB-2-2	GTTGATGAGTAGCTACCTTCAGT			
Delta hemolisina	HLD-1	AAGAATTTTATCTTAATTAAGGAAGGAGTG	<i>hld</i>	111	Mu50, N315
	HLD-2	TTAGTGAATTTGTTCACTGTGTGCGA			
Gama hemolisina	mpHLG-1	TTAAATGCATTATGGACTCTRTGAC	<i>hlg</i>	535	N315
	mpHLG-2	CACCTTAGGCTATACATTGGTG			

continua

Continuação

Toxina	Primer	Sequência de nucleotídeos	Gene	Tamanho (pb)	controle positivo
Gama hemolisina variante	mpHLG2-1	ACRAATGCATTATGGACTCTATGTC	<i>hlg</i>	390	Mu50
	mpHLG2-2	CTTTGTGAAACCTAATCCTAATGACTAT			
LukDE	LUKDE-1	TGAAAAAGGTTCAAAGTTGATACGAG	<i>lukDE</i>	269	N315
	LUKDE-2	TGTATTCGATAGCAAAAGCAGTGCA			
PVL	LukPV1	ATCATTAGGTAAAATGTCTGGACATGATCCA	<i>lukPV</i>	433	<i>S. aureus</i> 81/108
	lukPV2	GCATCAASTGTATTGGATAGCAAAAGC			

Fonte: Elaborada pela autora. *Primers* baseados em JARRAUD et al (94); LINA et al (81).

APÊNDICE 2 - DENDROGRAMA COM TODOS OS DADOS

* = Presença de resistência heterogênea, ST = tipo de sequência, DAP = Daptomicina, LDZ = linezolida, QDA = quinupristina-dalfopristina, TDZ = tedizolida, TEI = teicoplanina, TET = tetraciclina, TIG = tigeciclina, VAN = vancomicina.

Fonte: Elaborada pela autora.

ANEXO 1 – Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa

UNIVERSIDADE FEDERAL DE
SÃO CARLOS/UFSCAR

PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Caracterização fenotípica e genotípica de *Staphylococcus aureus* resistentes à metilicina (MRSA) isolados de infecção de um hospital em São Carlos

Pesquisador: Jessica Baleiro Okado

Área Temática:

Versão: 1

CAAE: 55310916.7.0000.5504

Instituição Proponente: UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

Patrocinador Principal: MINISTERIO DA CIENCIA, TECNOLOGIA E INOVACAO

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 1.556.620

Apresentação do Projeto:

Esta proposta tem como objetivo, caracterizar fenotípica e genotipicamente linhagens de *Staphylococcus aureus* resistentes à metilicina e betalactâmicos e avaliar possível disseminação entre os isolados de diversos tipos de infecções de pacientes internados em unidades hospitalares do

hospital Santa Casa da Misericórdia de São Carlos. O monitoramento da epidemiologia, disseminação e perfil de resistência e virulência deste

patógeno em ambiente hospitalar é de grande importância. Ainda assim, a ocorrência desses micro-organismos resistentes não se limitam apenas a

estes ambiente, são encontrados também na população em animais. A capacidade de aquisição de resistência à todas as classes de

antimicrobianos em uso clínico, limitando as opções de tratamento. Essa pesquisa contribuirá para o conhecimento de fenótipos e genótipos de

MRSA nesse hospital entre os pacientes, oferecendo ao hospital dados para otimizar uso de antibióticos e evitar pressão seletiva de linhagens

multiresistentes. As coletas serão realizadas de julho de 2011 a janeiro de 2012. Cada isolado bacteriano passará por testes fenotípicos para

Endereço: WASHINGTON LUIZ KM 235

Bairro: JARDIM GUANABARA

UF: SP

Município: SÃO CARLOS

CEP: 13.565-905

Telefone: (16)3351-9683

E-mail: cephumanos@ufscar.br

ANEXO 1- continuação

UNIVERSIDADE FEDERAL DE
SÃO CARLOS/UFSCAR

Continuação do Parecer: 1.556.620

determinação da concentração inibitória mínima (CIM) para antimicrobianos alternativos para o tratamento, teste fenotípico para hemólise, para produção de biofilme e triagem para presença de população heteroresistente à vancomicina, seguido por confirmação por Análise de População. Testes moleculares serão realizados para observar aclonalidade de isolados utilizando técnica de Pulsed-Field Gel Electrophoresis (PFGE) para averiguação de possível disseminação de alguma linhagem neste hospital e as linhagens de cada clone serão determinadas utilizando MLST (Multilocus Sequence Typing), além de determinação de perfil de virulência para presença de gene de 22 toxinas, realizado por PCR e determinação do tipo de elemento SCCmec, por Multiplex PCR e determinação da presença de famílias de plasmídeos. Em caso de encontrados perfis de resistência importantes, estes deverão ser caracterizados por busca de mecanismo de resistência.

Objetivo da Pesquisa:**Objetivo Primário:**

Caracterizar fenotípica e genotipicamente isolados de MRSA de infecções.

Objetivo Secundário:

- Traçar o perfil de sensibilidade a diversas drogas, incluindo as aprovadas mais recentemente no país (daptomicina, linezolida);
- Triagem de linhagens das amostras para detecção de linhagens hetero-VISA (h-VISA) e subsequente análise de população;
- Determinação dos tipos de elemento SCCmec de cada amostra ;
- Investigação quanto à presença do gene da Leucocidina Pantón-Valentine;
- Investigação do perfil de virulência dos isolados
- Determinação de produção de biofilme
- Tipagem molecular das amostras usando Eletroforese em Campos Pulsados (PFGE, Pulsed Field Gel Electrophoresis) para avaliar a similaridade genética das mesmas;
- Caracterização da linhagem de cada pulsotipo por tipagem por Sequenciamento de Multilocus (MLST, Multilocus Sequence Typing);

Endereço: WASHINGTON LUIZ KM 235

Bairro: JARDIM GUANABARA

CEP: 13.565-905

UF: SP

Município: SÃO CARLOS

Telefone: (16)3351-9683

E-mail: cephumanos@ufscar.br

ANEXO 1- continuação

UNIVERSIDADE FEDERAL DE
SÃO CARLOS/UFSCAR

Continuação do Parecer: 1.556.620

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Não existem riscos aos pacientes uma vez que não haverá acesso ao prontuário médico e sim somente as amostras de bactérias que foram isoladas dos pacientes.

Como benefícios indiretos a pesquisado cita o aumento do conhecimento científico sobre o perfil de amostras de MRSA encontradas no Brasil, em particular, na região de São Carlos. O hospital se beneficia por saber quais os tipos de linhagens estão circulando entre seus pacientes, e o perfil de resistência deste isolados, de forma a traçar melhores abordagens para evitar disseminação de clones multiresistentes e falhas em tratamento.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

- Trata-se de uma pesquisa com relevância científica e social e respeita os preceitos éticos estabelecidos pela Resolução CNS 466/2012 e suas complementares.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

- A folha de rosto confere com o título do projeto de pesquisa e apresenta a assinatura do pesquisador responsável e do responsável pela instituição conforme a resolução 466/12 do CNS/MS.
- Projeto de pesquisa apresentado conforme as normas científicas.
- carta justificando a dispensa do TCLE.
- Documento de PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO preenchido corretamente.
- Carta de autorização do Hospital.

Recomendações:

Sem novas recomendações.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Aprovado.

Considerações Finais a critério do CEP:

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_P ROJETO_685179.pdf	08/04/2016 11:47:28		Aceito
Folha de Rosto	folha_de_rostoassinada_2.pdf	08/04/2016 11:46:23	Jessica Baleiro Okado	Aceito

Endereço: WASHINGTON LUIZ KM 235

Bairro: JARDIM GUANABARA

CEP: 13.565-905

UF: SP

Município: SÃO CARLOS

Telefone: (16)3351-9683

E-mail: cephumanos@ufscar.br

ANEXO 1- continuação

UNIVERSIDADE FEDERAL DE
SÃO CARLOS/UFSCAR

Continuação do Parecer: 1.556.620

Outros	carta_hospital_autorizacao_uso_de_am ostras_2.pdf	08/04/2016 11:45:59	Jessica Baleiro Okado	Aceito
Outros	carta_hospital_autorizacao_desenvolvim ento_do_projeto_2.pdf	08/04/2016 11:45:00	Jessica Baleiro Okado	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	dispensa_TCLE_assinado.pdf	08/04/2016 11:42:04	Jessica Baleiro Okado	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Projeto_detalhado_Jessica_Okado.pdf	23/03/2016 10:43:56	Jessica Baleiro Okado	Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

SAO CARLOS, 23 de Maio de 2016

Assinado por:
Ricardo Carneiro Borra
(Coordenador)

Endereço: WASHINGTON LUIZ KM 235

Bairro: JARDIM GUANABARA

CEP: 13.565-905

UF: SP Município: SAO CARLOS

Telefone: (16)3351-9683

E-mail: cephumanos@ufscar.br

ANEXO 2 – Dados dos isolados que vieram do hospital

Isolado	Data Isolamento	Espécime Clínico	Penicilina	Ampicilina	Amoxicilina	Oxacilina	Cloxacilina	Dicloxacilina	Ácido Clavulânico	Ampicilina Sulbactam	Eritromicina	Claritromicina	Azitromicina	Sulfametoxazol Trimetoprim	Ciprofloxacina	Levofloxacina	Lomefloxacina	Norfloxacina	Ofloxacina	Clindamicina	Vancomicina
SCMSC04	26/07/2011	Pta. Cateter	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	R	R	R	R	R	R	S
SCMSC05	30/07/2011	Sec. Traqueal	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	R	R	R	R	R	R	S
SCMSC06	05/08/2011	Sec. Traqueal	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	R	R	R	R	R	R	S
SCMSC07	07/08/2011	Pta. Intracath	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	R	R	R	R	R	R	S
SCMSC08	07/08/2011	Sangue	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
SCMSC09	10/08/2011	Sangue	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	R	R	R	R	R	R	S
SCMSC10	13/08/2011	Sec. Traqueal	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	R	R	R	R	R	R	S
SCMSC11	15/08/2011	Sangue	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	R	R	R	R	R	R	S
SCMSC12	17/08/2011	Pta. Intracath	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	R	R	R	R	R	R	S
SCMSC13	17/08/2011	Pta. Intracath	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	R	R	R	R	R	R	S
SCMSC14	19/08/2011	Sec. Traqueal	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	R	R	R	R	R	R	S
SCMSC15	17/08/2011	Sangue	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	R	R	R	R	R	R	S
SCMSC16	19/08/2011	Sec. Traqueal	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	R	R	R	R	R	R	S
SCMSC17	02/09/2011	Sec. Traqueal	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	R	R	R	R	R	R	S
SCMSC18	10/09/2011	Sec. Traqueal	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	R	R	R	R	R	R	S
SCMSC19	10/09/2011	Pta. Cateter	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	R	R	R	R	R	R	S
SCMSC20	17/09/2011	Sec. Traqueal	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	R	R	R	R	R	R	S
SCMSC21	23/09/2011	Sec. Traqueal	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	R	R	R	R	R	R	S
SCMSC22	26/09/2011	Sec. Traqueal	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	R	R	R	R	R	R	S
SCMSC23	02/10/2011	Sec. Traqueal	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	R	R	R	R	R	R	S

Em negrito, isolados que foram caracterizados e em cinza, excluídos. R = Resistente; S= Sensível; nd= não determinado.

continua

continuação

Isolado	Paciente	Data Isolamento	Espécime Clínico	Penicilina	Ampicilina	Amoxicilina	Oxacilina	Cloxacilina	Dicloxacilina	Amoxicilina Ácido	Ampicilina Sulbactam	Eritromicina	Clarithromicina	Azitromicina	Sulfametoxazol Trimetoprim	Ciprofloxacina	Levofloxacina	Lomefloxacina	Norfloxacina	Ofloxacina	Clindamicina	Vancomicina
SCMSC24	AH	04/10/2011	Sec. Traqueal	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	R	R	R	R	R	R	S
SCMSC25	Z	09/10/2011	Pta. Cateter	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	R	R	R	R	R	R	S
SCMSC26	Z	09/10/2011	Hemoc/Sangue	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	R	R	R	R	R	R	S
SCMSC27	L	14/10/2011	Sec. Traqueal	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	R	R	R	R	R	R	S
SCMSC28	D	08/10/2011	Sangue	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	R	R	R	R	R	R	S
SCMSC29	AE	21/10/2011	Sec. Traqueal	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	R	R	R	R	R	R	S
SCMSC30	J	21/10/2011	Sec. Traqueal	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	R	R	R	R	R	R	S
SCMSC31	N	31/10/2011	Sec. Traqueal	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	R	R	R	R	R	R	S
SCMSC32	S	17/11/2011	Sec. Traqueal	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	R	R	R	R	R	R	S
SCMSC34	U	25/11/2011	Sec. Traqueal	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	R	R	R	R	R	R	S
SCMSC35	AA	01/12/2011	Sec. Traqueal	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	Nd
SCMSC36	F	30/11/2011	Hemoc/Sangue	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	R	R	R	R	R	R	S
SCMSC37	F	01/12/2011	Sangue	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	R	R	R	R	R	R	S
SCMSC39	R	18/12/2011	Sec. Traqueal	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	R	R	R	R	R	R	S
SCMSC40	S	22/12/2011	Sec. Traqueal	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	R	R	R	R	R	R	S
SCMSC42	V	29/12/2011	Sec. Traqueal	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	R	R	R	R	R	R	S
SCMSC43	AB	29/12/2011	Sec. Traqueal	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	R	R	R	R	R	R	S
SCMSC44	O	02/01/2012	Hemoc/Sangue	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	R	R	R	R	R	R	S
SCMSC46	O	02/01/2012	Pta. Cateter	R	R	R	R	R	R	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
SCMSC47	AB	05/01/2012	Sec. Traqueal	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	R	R	R	R	R	R	S
SCMSC48	V	05/01/2012	Sec. Traqueal	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	R	R	R	R	R	R	S
SCMSC49	E	05/01/2012	Sec. Traqueal	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	R	R	R	R	R	R	S

Em negrito, isolados que foram caracterizados e em cinza, excluídos. R = Resistente; S= Sensível; nd= não determinado. Fonte: Elaborado pela autora.