UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE FÍSICA DE SÃO CARLOS

JESSICA BALEIRO OKADO

Análise epidemiológica molecular de *Staphylococcus aureus*
resistentes à meticilina (MRSA) isolados de colonização de pacientes
HIV positivos internados em uma instituição de saúde da cidade de
Ribeirão Preto

São Carlos

2014

JESSICA BALEIRO OKADO

Análise epidemiológica molecular de *Staphylococcus aureus*
resistentes à meticilina (MRSA) isolados de colonização de pacientes
HIV positivos internados em uma instituição de saúde da cidade de
Ribeirão Preto

Dissertação 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
Mestre 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

2014

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

Okado, Jessica Baleiro

Análise epidemiológica molecular de *Staphylococcus aureus* resistentes à meticilina (MRSA) isolados de colonização de pacientes HIV positivos internados em uma instituição de saúde da cidade de Ribeirão Preto / Jessica Baleiro Okado; orientador Ilana Lopes Baratella da Cunha Camargo - versão corrigida -- São Carlos, 2014.

90 p.

Dissertação (Mestrado - Programa de Pós-Graduação em Física Aplicada Biomolecular) -- Instituto de Física de São Carlos, Universidade de São Paulo, 2014.

1. SCCmec. 2. MRSA. 3. HIV. 4. Resistência teicoplanina. 5. hVISA. I. Camargo, Ilana Lopes Baratella da Cunha, orient. II. Título.

A meus pais e Camila, pelo apoio
Incondicional

Agradecimentos

À Prof^a. Dra. Ilana L. B. C. Camargo, pela orientação, colaboração e por compartilhar seus conhecimentos.

Aos meus pais, Edson e Elaine, e a minha irmã, por sempre me apoiarem e acreditarem na decisão profissional e por darem todo apoio psicológico e financeiro para chegar até aqui.

Ao meu namorado, Felipe, por apoiar e aconselhar sempre que precisei, pela paciência e compreensão na ausência por causa do estudo.

À Eluci Gir e Lillian Reinato, pela colaboração e apoio e participação no projeto.

Aos meus amigos Thiago Corsi, Rafael Tuma, Rafael Dias, Isabela Oliveira, Ruan Neves, Caio Rimoli, Thaís Merlo, Karin Targas, pelas horas de descanso, pelos conselhos, por me animarem e continuarem presentes.

À técnica e amiga, Simoni Bogni, agradeço por sempre estar presente para ajudar, ensinar, conversar e também pelas noites de descanso e divertimento.

Aos meus colegas e amigos no LEMiMo, Fernanda, Jéssica, Vicente, Nicoli, Alexandre e Érika. Obrigada pela companhia na caminhada.

À Maria Amélia Oliva Dotta e Susana Sculaccio, por me encaminhar e ensinar primeiramente os bons hábitos no laboratório e pelos conselhos, sempre que precisei.

Otávio Thiemann, pela oportunidade de iniciar em pesquisa.

Aos funcionários da Pós-graduação, biblioteca e gráfica do IFSC, em especial, Patrícia Gianinni e Ricardo Vital, por serem sempre tão prestativos em tudo que precisei.

À Fundação de Amparo à Pesquisa de São Paulo (FAPESP) e CAPES pelo auxílio financeiro

“Talvez não tenha conseguido fazer o melhor,
mas lutei para que o melhor fosse feito.
Não sou o que deveria ser, mas Graças a Deus,
não sou o que era antes”. (Marthin L. King)

RESUMO

OKADO, J. B. Análise epidemiológica molecular de *Staphylococcus aureus* resistentes à meticilina (MRSA) isolados de colonização de pacientes HIV positivos internados em uma instituição de saúde da cidade de Ribeirão Preto. 2014. 90 p. Dissertação (Mestrado em Ciências)- Instituto de Física de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2014.

Estima-se que 30% da população mundial esteja colonizada por *Staphylococcus aureus*. Indivíduos portadores de HIV/AIDS possuem maiores riscos de colonização e infecções causadas por *S. aureus* resistente à meticilina (MRSA), devido a seu estado imunológico comprometido, frequente uso de antibióticos e reinternações hospitalares. Linhagens de MRSA emergiram na década de 60, logo após a introdução da meticilina, devido a aquisição de genes que codificam proteínas ligadoras de penicilinas modificadas, *mecA* e *mecC*, contidos no elemento genético móvel *SCCmec* (do inglês, *Staphylococcal Cassete Chromosome*). Este estudo buscou caracterizar amostras de MRSA de pacientes com HIV/AIDS, isoladas no primeiro e sétimo dia de internação no hospital, e de seus profissionais de saúde, do Hospital das Clínicas de Ribeirão Preto, no período de abril de 2011 a maio de 2013. Os objetivos foram caracterizar fenotípica e genotipicamente os isolados de MRSA e comparar as linhagens, a fim de observar se havia disseminação entre os pacientes ou entre estes e profissionais de saúde relacionados. Foi realizada caracterização por perfil de sensibilidade, determinação do elemento *SCCmec*, eletroforese em campos pulsados (PFGE, do inglês, *Pulsed Field Gel Electrophoresis*) e tipagem por sequenciamento de Multilocus (MLST). Foram pesquisados os tipos de hemólise produzidos e a presença de gene para produção da Leucocidina Pantone Valentine (PVL). Vinte pacientes encontravam-se colonizados no primeiro dia de internação, treze após uma semana e três profissionais da saúde estavam colonizados durante o estudo. Quando excluídas as amostras consideradas duplicatas, *SCCmecIV* foi o elemento predominante. Grande variedade clonal de MRSA foi encontrada nos pacientes, totalizando 11 pulsotipos. ST239-*SCCmecIII*, relacionado ao Clone Endêmico Brasileiro (BEC), foi isolado de pacientes logo no primeiro dia de internação, provavelmente devido à prévia internação. O profissional de saúde P1 apresentou colonização por MRSA caracterizado como pulsotipo E, que persistiu após o tratamento para

descolorização. P1 foi tratado novamente e posteriormente foi observado isolado com pulstipo J, sugerindo ser um clone diferente dos anteriores, mas ainda com linhagem ST105-SCCmecII. Apenas um isolado, do paciente 5, apresentou grande similaridade (92,3%) com um isolado do profissional de saúde (P1). Entretanto, houve intervalo de 10 meses entre as coletas e não há indício de transmissão direta de uma pessoa para outra. Presença do gene da PVL foi encontrada em apenas dois isolados. Três amostras de MRSA foram caracterizadas como hVISA (do inglês, *heterogeneous Vancomycin Intermediate Staphylococcus aureus*) e dois deles possuíam resistência intermediária à teicoplanina. Um isolado apresentou resistência à daptomicina em 48h de incubação com uma população heterogênea detectada. Todos foram sensíveis a quinupristina-dalfopristina, linezolida e tigeciclina. Concluímos que não houve disseminação de uma linhagem específica entre os pacientes, ou entre profissionais de saúde e pacientes e não foi observada relação entre o tempo de estadia no hospital e aquisição de uma linhagem em específico. No entanto, algumas linhagens com perfis de resistência muito preocupantes, como hVISA e com heterorresistência à daptomicina, foram isoladas e requerem atenção e monitoramento, com programas de vigilância e adoção de práticas de segurança e higiene no trabalho por parte dos profissionais de saúde.

Palavras-chave: SCCmec. MRSA. hVISA. Redução de sensibilidade à teicoplanina. Resistência heterogênea à daptomicina.

ABSTRACT

OKADO, J. B. Epidemiological molecular analysis of Methicilin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) isolated from HIV positive patient colonization, from a health institution at Ribeirão Preto, São Paulo. 2014. 90 p. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Instituto de Física de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2014.

It is estimated that 30 % of the world population is colonized by *Staphylococcus aureus*. Individuals with HIV/AIDS have a higher risk of colonization and infection caused by methicillin-resistant *S. aureus* (MRSA), due to their compromised immune system, frequent use of antibiotics and hospital readmissions. Strains of MRSA emerged in the 60's, shortly after the introduction of methicillin. Such resistance is caused by acquisition of genes encoding modified penicillin binding proteins, *mecA* and *mecC*, contained in the mobile genetic element *SCCmec* (Staphylococcal Cassette Chromosome). This study aimed to characterize MRSA isolated from patients with HIV/AIDS, in the first and seventh day of hospitalization, and their health care professionals, at the Clinical Hospital of Ribeirão Preto, in the period of April 2011 to May 2013. The objectives were to characterize phenotypic and genotypically MRSA isolates in order to observe if there was some lineage spread among patients or between these and related health professionals. MRSA isolates were characterized by susceptibility profile, *SCCmec* element typing, pulsed field gel electrophoresis (PFGE) and multilocus sequencing typing (MLST). Pattern of hemolysis and the presence of the gene for production of Leukocidin Pantón Valentine (PVL) were determined. Twenty patients were colonized on the first day of hospitalization, thirteen patients in a week and only three health care professionals were colonized during the study. *SCCmecIV* was the predominant element when samples considered duplicates were excluded. Large variety of MRSA clones was found in patients with 11 pulsotypes. ST239-*SCCmecIII*, related to Brazilian Endemic Clone (BEC), was isolated from patients on the first day of hospitalization, probably due to previous hospital admission. Professional P1 was colonized by MRSA isolate characterized as pulsotype E which persisted after treatment for decolonization. P1 was treated again and was observed with a pulsotype J isolate, which suggests being a different clone of the same lineage ST105-*SCCmecII*. Only one sample, from patient 5, showed high similarity (92.3 %)

with this health professional isolate (P1). However, there was an interval of 10 months between the collections and there is no evidence of direct transmission from one person to another. Presence of the PVL gene was found in only two isolates. Three MRSA isolates were characterized as hVISA (heterogeneous Vancomycin Intermediate *S. aureus*) and two of them were also intermediate resistant to teicoplanin. One isolate showed resistance to daptomycin in 48h incubation and heterogeneous population was detected. All isolates were susceptible to quinupristin-dalfopristin, linezolid and tigecycline. We conclude that no spread of a particular strain was found among patients or between health care professionals and patients, and no relationship between duration of hospital stay and acquisition of a specific lineage was observed. However, some strains with resistance profiles very threatening, as hVISA and heteroresistant to daptomycin, were isolated and require attention and monitoring, with surveillance programs and use of safety practices and hygiene by health professionals.

Keywords: SCCmec. MRSA. hVISA. Reduced susceptibility to teicoplanin. Heterogeneous resistance to daptomycin.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Estrutura geral dos elementos <i>SCC_{mec}</i>	30
Figura 2. Estrutura química da vancomicina.	34
Figura 3. Representação da estrutura química da teicoplanina.	35
Figura 4. Representação da estrutura química da daptomicina.	36
Figura 5. Distribuição global de CA-MRSA e possíveis rotas de disseminação.	40
Figura 6. Placa de microdiluição da teicoplanina.	59
Figura 7. Etest para teicoplanina.	59
Figura 8. Curva de análise de população com vancomicina	61
Figura 9. Análise de população para daptomicina.	61
Figura 10. Dendrograma com pulsotipos encontrados.	65

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Especificações dos tipos de SCCmec	311
Tabela 2. Pontos de corte dos antimicrobianos utilizados.....	48
Tabela 3. <i>Primers</i> utilizados para tipagem de SCCmec e verificação do gene da PVL.....	51
Tabela 4. <i>Primers</i> utilizados para amplificação de genes do MLST.....	56
Tabela 5. Valores de CIM para as amostras.....	57
Tabela 6. Valores de CIM ₅₀ e CIM ₉₀ para antimicrobianos testados.	60

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AIDS	<i>Acquired Immunodeficiency Syndrome</i>
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
BEC	<i>Brazillian Epidemic Clone</i>
BHI	<i>Brain Heart Infusion</i>
CA-MRSA	<i>Community-Acquired Methicillin-resistant <u>Staphylococcus aureus</u></i>
CC	Complexo Clonal
CIM	Concentração Inibitória Mínima
CIM₅₀	Concentração Inibitória Mínima para 50% das amostras
CIM₉₀	Concentração Inibitória Mínima para 90% das amostras
CLSI	<i>Clinnical and Laboratory Standarts Institute</i>
D-ala-D-Ala	D-alanil-D-alanina
DNA	Ácido Desoxirrinonucleico
dNTPs	Deoxynucleotide Triphosphate
EUA	Estados Unidos da América
EUCAST	<i>European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases</i>
HAART	<i>High Active Antiretroviral Therapy</i>
HA-MRSA	<i>Hospital acquired methicilin-resistant <u>Staphylococcus aureus</u></i>
HSB	Homens que fazem Sexo com Homens
hVISA	<i>heterogeneous Vancomycin Intermediate <u>Staphylococcus aureus</u></i>
IFSC	Instituto de Física de São Carlos
ISS	<i>Integration Site Sequence</i>
MLST	<i>Multilocus Sequence Type</i>
MPCR	<i>Multiplex Polymerase Chain Reaction</i>
MRSA	<i>Methicillin-resistant <u>Staphylococcus aureus</u></i>
MSSA	<i>Methicillin-susceptible <u>Staphylococcus aureus</u></i>
ORF	<i>Open Reading Frames</i>
PAP	<i>Population Analysis Profile</i>
PBP2a	<i>Penicilin Binding Protein 2a</i>
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i>
PFGE	<i>Pulsed Filed Gel Electrophoresis</i>
PVL	<i>Leukocidin Panton Valentine</i>

RNA	Ácido Rinonucleico
RND	<i>resistance-nodulation-division</i>
SCC<i>mec</i>	<i>Staphylococcal cassette chromossome mec</i>
SLV	<i>Single Locus Variant</i>
ST	<i>Sequence Type</i>
ST	<i>Sequence Type</i>
UFC	Unidade Formadora de Colônia
USP	Universidade de São Paulo
VISA	<i>Vancomycin Intermediate <u>Staphylococcus aureus</u></i>
VRSA	<i>Vancomycin Resistant <u>Staphylococcus aureus</u></i>

SUMÁRIO

1	Introdução.....	25
1.1	AIDS no mundo	3925
1.2	AIDS no Brasil.....	25
1.3	<i>Staphylococcus aureus</i>	25
1.4	<i>Staphylococcus aureus</i> resistentes	28
1.5	MRSA associados à comunidade	39
2	Objetivos	43
2.1	Objetivos específicos.....	43
3	Materiais e Métodos	45
3.1	Amostras.....	45
3.1.2	Extração do DNA	46
3.2	Perfil de sensibilidade	46
3.3	Triagem para hetero-VISA.....	48
3.4	Análise de população	49
3.5	Determinação do padrão de hemólise	50
3.6	Determinação da presença do gene da PVL.....	50
3.7	Tipagem Molecular	52
3.7.1	Determinação do elemento SCCmec	52
3.7.2	Eletroforese de Campos Pulsados (PFGE).....	53
3.7.3	Tipagem por Sequenciamento de MultiLocus (MLST)	54
4	Resultados	57
4.1	Determinação da presença do gene da PVL.....	57
4.2	Perfil de sensibilidade	57
	Fonte: Elaborada pela autora.....	60
4.3	Triagem para hVISA	60
4.5	Análise de população	60
4.6	Tipo de hemólise	62

4.5	Tipagem Molecular.....	62
4.5.1	Tipagem do elemento <i>SCCmec</i>	62
4.5.2	Tipagem PFGE e MLST.....	63
5	Discussão dos Resultados	67
6	Conclusões.....	71
Referencias		73
ANEXO 1- DADOS DAS AMOSTRAS		87
ANEXO 2- RESULTADOS GERAIS		88
ANEXO 3- DENDROGRAMA COM TODOS OS RESULTADOS		90

1 Introdução

1.1 AIDS no mundo

O vírus HIV (do inglês, *Human Immunodeficiency Virus*) que causa a síndrome da imunodeficiência adquirida (AIDS, do inglês *Acquired Immunodeficiency Syndrome*) foi primeiramente descrito em 1981. (1) Em 1977 e 1978, ocorreram primeiros descritos da doença do vírus no EUA, Haiti e África central, mas a doença ainda não havia sido caracterizada, o que ocorreu apenas em 1982. (2) No início do século era estimado no que no mundo, 40 milhões de pessoas viviam com HIV/AIDS, e que anualmente ocorriam 4 milhões de novas infecções e 2,8 milhões de mortes. (3) Em 2012, foi estimado 2,3 milhões de pessoas recentemente infectadas com HIV e que 1,6 milhões de pessoas morreram por causa da doença. Estima-se que 6300 pessoas são infectadas por dia. Desde o início da epidemia mundial, aproximadamente 36 milhões de pessoas morreram por causas relacionadas à AIDS e 75 milhões de pessoas contraíram o vírus. (4)

1.2 AIDS no Brasil

O primeiro caso clínico de AIDS no Brasil ocorreu em 1983. Estudos posteriores permitiram a identificação retrospectiva de casos nos anos de 1980 a 1982. (5) O primeiro caso descrito foi em São Paulo, em 1980. (2) A epidemia no país é considerada concentrada, classificação esta para países em que a prevalência da infecção pelo HIV é superior a 5% em pelo menos uma subpopulação de comportamento de risco e com prevalência entre gestantes abaixo de 5%. (3) Os primeiros casos descritos foram em São Paulo e se disseminaram pelo eixo Rio-São Paulo e metrópoles, e, no final da década de 80, com direção a grandes centros urbanos, espalhando-se pelo litoral e depois interior do país, sendo em 2001, registrados casos em 59% dos municípios do país. De 1987 a 1992, a velocidade de aumento do número de

casos foi de 36% ao ano, diminuindo para 12% de 92 a 96, devido à implementação de medidas profiláticas, como controle de bancos de sangue. (6, 3)

Após 1996, com a introdução de terapia com anti-retrovirais altamente potentes (HAART, do inglês, *high active antiretroviral therapy*), ocorreram mudanças nos níveis de mortalidade. (3) Nos primeiros casos relatados, a doença, que era descoberta tardiamente, levava à morte de modo rápido. Atualmente, com os tratamentos com antirretrovirais, a doença possui caráter crônico, com evolução prolongada, marcada por longos períodos assintomáticos, interrompidos por infecções oportunistas. Além das medidas preventivas, o governo brasileiro possui vários programas de prevenção, identificação e assistência a pessoas portadoras de HIV/AIDS. (6, 2)

A taxa da população contaminada no Brasil é de 0,4%. Entre as populações consideradas de risco, as taxas são de 10,5% entre homens que fazem sexo com homens (HSH), 4,9% entre profissionais do sexo e de 5,9% entre usuários de drogas. (7) Estes números são subestimados no Brasil, já que a pessoa, até recentemente, podia ser portadora de HIV e não ter caso relatado como AIDS. No país são notificados, em média, 36 mil casos por ano e estima-se que 30 mil pessoas vivam com HIV/AIDS. O número de óbitos causados pela doença é de aproximadamente 11,5 mil por ano.

Doenças infecciosas e causadas por parasitas eram as maiores associadas com mortes por AIDS, hoje doenças infecciosas são de especial importância, uma vez que estes pacientes vivem mais, e sepse tem sido causa crescente de mortalidade e letalidade na era HAART. (3) Dentre as etiologias das doenças, *Staphylococcus aureus* resistente à meticilina (MRSA) deve ser evidenciado, já que pode causar infecções e sepse. (8) Pessoas HIV positivas fazem parte da população de risco de infecções causadas por MRSA, principalmente devido alguns fatores como readmissões hospitalares, alta carga viral, baixa contagem de células T C4, presença de catéter venoso central, doenças de pele e comportamento de risco, por exemplo, uso de drogas ilícitas intravenosas. (9 – 10) Foi observado que pessoas com HIV/AIDS possuem risco seis vezes maior de adquirir infecções de pele e tecidos moles causadas por MRSA associados à comunidade, que a população em geral. (9) Foi demonstrado que em 27% dos casos, nova infecção pode ocorrer em cinco meses. Comparado com a população em geral, a taxa de recorrência é três vezes maior em pacientes com HIV/AIDS. (10)

1.3 *Staphylococcus aureus*

S. aureus é um patógeno de grande importância em infecções nosocomiais e na comunidade mesmo em indivíduos sem prévia hospitalização. (11- 13) Sua transmissão ocorre principalmente por contato direto com indivíduos colonizados ou infectados e também por contato com superfícies ou instrumentos contaminados. (14) Em alguns estudos, *S. aureus* é tratado como organismo comensal, pois cerca de 30% das pessoas saudáveis são colonizadas assintomaticamente por esta espécie. (11) Na população mundial cerca de 20% das pessoas são colonizadas cronicamente e 60%, intermitentemente. (11)

S. aureus foi identificado pela primeira vez relacionado a infecções, em 1880, no Reino Unido, por Alexander Ougston, em isolado de pus de abscesso e já causando surtos nos anos 1900's. (11) Existem indicações que este organismo afeta a humanidade desde tempos pré-históricos. (15) A infecção por *S. aureus* é diagnosticada por meio do isolamento da bactéria de culturas do sangue, tecido ou pus. Este organismo cresce em qualquer meio de cultura não seletivo (11), em forma de cocos, isolados ou em cachos (16), com condição ótima de crescimento a 37° C, podendo ter coloração variada, de clara a dourada, dependendo da temperatura em que é cultivado. Em meio sólido, possui colônias lisas, arredondadas e brilhantes. Por ser bactéria Gram positiva, catalase, coagulase e DNase positiva, pode ser isolada em laboratório clínico de hospitais e identificada por estes testes bioquímicos ou, por meios seletivos e diferenciais, como *Manitol Salt Agar*, no qual o crescimento de *S. aureus* muda o pH do meio devido produção de ácido, modificando sua coloração. (17) A identificação pode ser feita manualmente ou por testes automatizados, por exemplo, pelo sistema Vitek® (Biomérieux, França) e moleculares, que verificam a presença de genes exclusivos da espécie por PCR (do inglês, *Polymerase Chain Reaction*). (18 – 20)

Esta espécie pode causar infecções de pele, de simples a graves, sendo capaz de produzir choque séptico, pela interação e ativação com o sistema imunológico hospedeiro e suas vias de coagulação. Causam também bacteremia, osteomielite, carbúnculo, pneumonia e outras infecções. (21) A habilidade de causar infecções em humanos está ligada à resistência inata do sistema imune do hospedeiro, por meio dos neutrófilos. Por exemplo, *S. aureus* é capaz de produzir uma série de moléculas, que incitam uma resposta inflamatória excessiva do sistema imune. Além de produzir moléculas na superfície, produz toxinas que

são secretadas pela maior parte de linhagens de *S. aureus*, incluindo linhagens sensíveis à meticilina. (11)

S. aureus podem expressar uma ampla variedade de fatores de virulência, incluindo adesinas (proteínas ligadoras de fibronectinas - FnBPs) e proteína A, que medeia a ligação à células hospedeiras, além de enzimas (proteases e lipases) e toxinas como α -hemolisina e Leucocidina Pantón Valentine (PVL, do inglês *Leukocidin Pantón Valentine*), modulinas, polissacarídeos solúveis e fenol. É importante salientar que diferentes linhagens podem produzir diferentes toxinas e adesinas. 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. (22)

PVL é composta por duas subunidades, LukS-PV e LukF-PV, codificadas pelos genes *lukFS-PV*, que podem ser adquiridos por transferência horizontal de um bacteriófago que os contém. (23) Sua presença tem sido relatada em amostras resistentes à meticilina associada à comunidade e hospitalares. (11, 13) Há evidências de que a produção de PVL induz apoptose de neutrófilos, lise celular e agravamento de infecções, e, em altas concentrações, necrose do tecido infectado; maior resposta do sistema à inflamação e piora local de osteomielite. (22, 21, 25)

S. aureus possui alta capacidade de adaptação, podendo sobreviver e se multiplicar em vários ambientes, e, juntamente com a grande variedade genética, permite que as gerações sobrevivam em ambientes hostis. Vários eventos de resistência a antimicrobianos têm sido relatados após a introdução destas drogas na prática clínica, a chamada era dos antimicrobianos. (15) A resistência a antibióticos geralmente é adquirida por transferência horizontal de genes de outros organismos, embora casos de mutações e pressão seletiva por uso de antibióticos sejam importantes. (14)

1.4 *Staphylococcus aureus* resistentes

A penicilina foi descoberta em 1928 por Alexander Fleming (25) e a introdução da benzilpenicilina para tratamento de infecções ocorreu no início da década de 40 e já no meio da década de 50, crescia rapidamente o número de casos de *S. aureus* com alta resistência à

penicilina, causada pela aquisição de um gene carregado por um plasmídio que codificava uma penicilinase capaz de degradar o antibiótico antes que este se ligasse ao seu alvo. (15) Estas penicilinases hidrolisam o anel beta-lactâmico, essencial para atividade da penicilina. (14)

A meticilina, uma penicilina semissintética, foi introduzida em 1959-1960, e apenas um ano após seu uso, já foram relatados casos de *S. aureus* resistentes a essa droga. A resistência à meticilina é causada pela aquisição do gene *mecA* (2,1 kb), que codifica a proteína PBP2a ou PBP2a (proteína ligadora de penicilina 2a ou 2'), de 78 kDa. (15) Diferentemente da PBP normal de estafilococos, PBP2a possui baixa afinidade a todos antibióticos β -lactâmicos, exceto os chamados de quinta geração, ao contrário do que observado para betalactamase causadora de resistência apenas à penicilina. (14) Esse gene está presente em um elemento genético móvel, denominado “*Staphylococcal cassette chromossome mec*”- SCCmec. Além do gene *mecA*, recentemente foi descoberto um gene que codifica uma proteína homologa à PBP 2a, o gene *mecC*, que possui 70% de identidade com *mecA*.(26 -27) Este foi relatado primeiramente na Dinamarca, e já foi reportado na Inglaterra, Alemanha, Holanda, França, Irlanda, Noruega e Suécia. (27) O gene *mecC* está relacionado a reservatórios animais de MRSA. (28 – 29)

Amostras de *S. aureus* resistentes à meticilina podem ser caracterizadas por métodos clássicos ou automatizados, que identificam a espécie e determinam o perfil de sensibilidade. Os testes de sensibilidade, segundo o CLSI (2013), podem ser feitos por microdiluição com oxacilina e cefoxitina ou disco difusão com cefoxitina para determinação da resistência aos beta-lactâmicos. Para confirmar a resistência, pode-se detectar os genes *mecA* (30 – 31) ou *mecC* (27, 11) por métodos moleculares de PCR ou por teste de aglutinação em látex. No entanto, testes de aglutinação em látex não detectam a resistência caso seja causada pela presença do gene *mecC*. É recomendada a procura deste gene quando amostras possuem fenótipo MRSA, mas não há confirmação da presença do gene *mecA* (28).

A descoberta de que o gene *mecA* está contido nos elementos SCCmec foi fundamental para entender eventos evolucionários sobre aparecimento das linhagens MRSA.(32) É descrito que este elemento foi adquirido por transmissão genética horizontal, já que uma PBP encontrada em *S. sciuri* mostrou 87,6% de identidade com a sequência de aminoácidos de *S. aureus*. Acredita-se que esse elemento tenha se apresentado inicialmente em espécies de *Staphylococcus* coagulase-negativos. (21, 33) É provável que clones de

MRSA tenham surgido em ocasiões distintas, pela aquisição de elementos *SCCmec* por diferentes linhagens sensíveis à meticilina (MSSA). (34)

Todos os tipos de elementos *SCCmec* possuem em comum a presença de algumas partes: complexo *mec*, genes *ccr* de recombinases, contidos no complexo *ccr*, que integram o elemento *SCCmec* no cromossomo bacteriano, num sítio específico denominado ISS (do inglês, *Integration Site Sequence*) e a presença de sequências repetidas nas regiões flangeadoras do elemento, contendo o sítio de interação. A Figura 1 esquematiza a estrutura geral de um elemento *SCCmec*. Os tipos de elementos *SCCmec* são definidos pela combinação do tipo de complexo *mec* e complexo *ccr*. O complexo *ccr* é composto pelos genes de recombinases, que podem ser *ccrA*, *ccrB* ou *ccrC* (numerados de acordo com a ordem de descoberta) e regiões de leitura aberta (ORFs, do inglês *Open Reading Frames*). O complexo *mec* carrega os genes de resistência à meticilina e seus reguladores, é dividido nas classes A, B, C e E, em *S. aureus*, e pode conter sequências de inserção. Além dos complexos *mec* e *ccr*, os elementos *SCCmec* contêm regiões de junção, denominadas regiões J, que podem conter determinantes de resistência a antimicrobianos. (30, 35)

Figura 1 - Estrutura geral dos elementos *SCCmec*, exemplificado pelo *SCCmecIII*

Fonte: INTERNATIONAL... (36)

O primeiro elemento *SCCmec* foi identificado no Japão, na linhagem *S. aureus* N315, em 1999. Outros dois tipos foram identificados num curto intervalo de tempo, vindos de outras linhagens diferentes (32, 36) e foram classificados como tipo I e II. Desde então,

foram descobertos *SCCmecV* (37), *SCCmecVI* (38), *SCCmecVII* (39), *SCCmecVIII* (40), *SCCmecIX*, *SCCmecX* (42), *SCCmecXI* (36) e outras variantes e subtipos tem sido descritos. (42) Os elementos de cada tipo de *SCCmec* estão listados na Tabela 1.

Tabela 1 - Especificações dos tipos de *SCCmec* (*=*IS432* em direções opostas, **=*IS431* na mesma direção)

<i>SCCmec</i>	Tipo complexo <i>ccr</i>	Genes <i>ccr</i>	Tipo complexo <i>mec</i>	Partes do complexo <i>mec</i>	Algumas linhagens descritas
I	1	A1B1	B	<i>IS431-mecA-ΔmecR1-IS1272</i>	NCTC10442, COL
II	2	A2B2	A	<i>IS431-mecA-mecR1-mecI</i>	N315, Mu50, Mu3
III	3	A3B3	A	<i>IS431-mecA-mecR1-mecI</i>	85/2082
IV	2	A2B2	B	<i>IS431-mecA-ΔmecR1-IS1272</i>	81/108, EMRSA-15
V	5	C1	C2	<i>IS431-mecA-ΔmecR1-IS431</i>	WIS(WBG8318), TSGH17
VI	4	A4B4	B	<i>IS431-mecA-ΔmecR1-IS1272</i>	HDE288
VII	5	C1	C1	<i>IS431-mecA-ΔmecR1-IS431</i>	JCSC6082
IX	1	A1B1	C2	<i>IS431-mecA-ΔmecR1-IS431</i>	JCSC6943
X	7	A1B6	C1	<i>IS431-mecA-ΔmecR1-IS431</i>	JCSC6945
XI	8	A1B3	E	<i>blaZ-mecA_{LGA251}-mecR1_{LGA251}-mecI_{LGA251}</i>	LGA251

Fonte: INTERNATIONAL... (35)

É importante salientar que o tamanho dos elementos *SCCmec* podem influenciar na sua mobilidade. O *SCCmecIV*, por exemplo, possui tamanho de apenas 21-24 kb, comparado a 35 a > 60 kb, dos tipos I, II e III, sendo suficientemente pequeno para poder ser inserido em um bacteriófago e ser mais facilmente adquirido por transferência horizontal. (12)

Alguns dos clones de MRSA que foram bem sucedidos circularam nos hospitais a partir de 1970. Após 1980, foram substituídos por seus descendentes, linhagens muito mais bem adaptadas, causando surtos de infecções e que se tornaram endêmicos em ambientes hospitalares. (14) Até os anos 2000, praticamente cinco principais linhagens clonais foram definidas como clones bem sucedidos, por possuírem capacidade de causar infecção, persistir no ambiente e de se disseminar geograficamente em determinadas regiões, além de conseguirem “migrar” para outros locais, levadas por viajantes. Tais linhagens chegaram a representar cerca de 70% de todos os isolados de MRSA. (15) Elas foram denominadas de

acordo com os locais onde eram endêmicas e caracterizadas por várias técnicas moleculares. Alguns dos principais clones pandêmicos são o Ibérico (ST247-SCCmecI), Brasileiro (ST239-SCCmecIIIa), Húngaro (ST239-SCCmecIII), Nova York/Japão (ST5-SCCmecII), Pediátrico (ST5-SCCmecIV) e Cordobês-Chileno (ST5- SCCmecI). (15, 34)

No Brasil, a prevalência de MRSA em hospitais varia de 20 a 40%. (43 – 44) No Hospital das Clínicas de Ribeirão Preto, no período de agosto de 2011 a julho de 2012, 21,8%, dos pacientes com HIV/AIDS colonizados por *S. aureus*, estavam colonizados por MRSA, o que representava cerca de 6% do total estudado. (45) Até os anos 2000, o Clone Brasileiro Endêmico (BEC, do inglês *Brazilian Epidemic Clone*) era prevalente nos hospitais do país. Este clone adquiriu genes que conferem multirresistência, sendo observada resistência à cloranfenicol, cefalotina, ciprofloxacina, clindamicina, eritromicina, gentamicina, lincomicina, penicilina, e trimetoprima-sulfametoxazol. Em 1996, foi observado padrão de resistência heterogênea à vancomicina e teicoplanina, na região nordeste. (46) No Rio de Janeiro, isolados de BEC entre os anos de 1999 e 2000 de um hospital universitário também produziam a toxina Leucocidina Pantón Valentine (PVL). (46 – 47) O clone brasileiro também demonstrou potencial aquisição de genes para produção de biofilme, que pode causar agravamento de infecções em próteses. (46)

Vários estudos têm relatado a substituição do Clone Brasileiro Endêmico por outras linhagens, que variam dependendo da localidade. Mesmo em outros países, onde este clone era prevalente, foi observada sua substituição. Este fato observado em Portugal (48), Argentina, Paraguai e Chile. (46) No Brasil, em 2004, foi relatado no estado de São Paulo a prevalência de SCCmecIV em ambiente hospitalar, ao invés de SCCmecIII, correspondente ao BEC. (49) Em 2009, um estudo no Rio de Janeiro também mostrou a prevalência de SCCmecIV (50) e em 2011, em São Paulo, o mesmo SCCmec foi encontrado em 50% dos pacientes com fibrose cística. (53) Em 2009, em um hospital de Belo Horizonte e em outro de Ribeirão Preto houve prevalência de isolados com SCCmecII. (52-53)

Linhagens de MRSA adquiriram rapidamente resistência aos β -lactâmicos, que eram amplamente utilizados para tratar infecções por *S. aureus* resistentes à penicilina. A vancomicina, um glicopeptídeo, foi introduzida em uso clínico em 1958 e é usada como droga de última escolha para tratar infecções sérias causadas por MRSA. (54) O alto número de infecções causadas por MRSA aumentou o uso da vancomicina, causando pressão seletiva pelo aumento do uso deste antiótico e, em 1997, foi relatado no Japão o primeiro caso de redução de sensibilidade à vancomicina, apresentando resistência intermediária à vancomicina

(VISA, do inglês, *Vancomycin Intermediate Staphylococcus aureus*). (12, 54-55) O aparecimento desta redução de sensibilidade demorou muito tempo desde a introdução da vancomicina no uso clínico, comparado ao da meticilina, por ter sido usada muito menos frequentemente. Por ainda ser uma das drogas de última escolha para tratamento de infecções por MRSA, este fato se tornou bastante preocupante. (54)

A resistência a altas concentrações de vancomicina em *S. aureus* denominados VRSA (do inglês, *Vancomycin Resistant Staphylococcus aureus*) é causada pela aquisição do transposon Tn1546 de enterococos resistente à vancomicina. O primeiro caso de VRSA ocorreu nos Estados Unidos em 2002 (54) e até hoje apenas 13 casos ocorreram (56) naquele país, um no Irã (57), um na Índia (58) e um no Brasil, em 2012. (59) Este mecanismo de resistência é preocupante, entretanto não tem sido disseminado. Há ainda os casos de VISA e hVISA (do inglês, *heterogeneous Vancomycin Intermediate Staphylococcus aureus*) com presença de subpopulações resistentes à vancomicina. Casos de reduzida sensibilidade à vancomicina, hVISA e VISA, foram encontrados no Brasil. (60-62) O CLSI (*Clinical and Laboratory Standards Institute*) de 2013 (63) classifica como sensível à vancomicina amostras com CIM ≤ 2 $\mu\text{g/mL}$, como intermediário com CIM entre 4 e 8 $\mu\text{g/mL}$, e como resistente com CIM ≥ 32 $\mu\text{g/mL}$. (63) Já o EUCAST (do inglês, *European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*) considera sensíveis amostras com valores de CIM ≤ 2 $\mu\text{g/mL}$ e como resistentes, com CIM > 4 $\mu\text{g/mL}$. (64)

A vancomicina age inibindo a síntese da parede de celular em bactérias Gram positivas, do lado externo da membrana citoplasmática. Ao contrário dos beta-lactâmicos, que se ligam às transpeptidases PBP's, ela se liga ao resíduo C-terminal D-Ala-D-Ala, do peptídeoglicano precursor da parede celular, de forma não covalente, inibindo a elongação do peptídeoglicano. (54) Linhagens VISA possuem mutações nos genes *vraRS*, *graRS*, ou no operon *walKR*, que podem mudar a resposta dos reguladores celulares. Algumas modificações que podem ocorrer são espessamento da parede celular, redução de autólise, redução da expressão da proteína A, aumento de espessura da cápsula da bactéria, aumento da D-alanilação dos ácidos teicóicos da parede celular e redução da atividade do gene regulador *agr*. A adição de falsos ligantes do sítio de ligação da droga inibe sua atividade. (54) A estrutura da vancomicina é mostrada na Figura 2.

Figura 2 - Estrutura química da vancomicina.

Fonte: KAHNE et al. (65)

Linhagens hVISA são caracterizadas pela presença de uma subpopulação com reduzida sensibilidade à vancomicina. Em geral, são isolados de MRSA sensíveis à vancomicina, com CIM $\leq 2 \mu\text{g/mL}$, com uma pequena população de células resistentes, em geral na taxa de 10^{-5} a 10^{-6} . Esta frequência é tão baixa que não é perceptível por métodos recomendados para determinação da CIM. O método ouro para detecção deste fenótipo hVISA é a Análise de População (PAP, do inglês, *Population Analysis Profile*). (66 – 67) A caracterização de hVISA na análise de população pode ser feita de acordo com o crescimento de pelo menos 1 log₁₀ UFC/mL em meio BHI ágar contendo 4 μg de vancomicina por mL, (68) ou por comparação da área abaixo da curva de crescimento da amostra em relação ao controle hVISA, Mu3. (69)

Entre fatores de risco para aparecimento de linhagens VISA e hVISA estão infecções ou colonização prévia por MRSA e exposição à vancomicina. Algumas características de amostras hVISA são: morfologia heterogênea, com presença de colônias pequenas, espessamento da parede celular e redução de sensibilidade, quando cultura é selecionada por meio com droga. (54, 70 – 72) O mecanismo de aquisição do fenótipo de VISA e hVISA não é totalmente elucidado, mas trata-se de um fenômeno de vários passos. Os genes *murF* e *pbpB* estão ligados à síntese da parede celular e podem estar relacionados ao fenômeno de espessamento da parede. (54) Primeiramente, ocorreria uma mutação no sistema regulatório *vraSR*, que está intimamente ligado com o aparecimento de linhagens hVISA e uma subsequente mutação no sistema *graSR* estaria ligado ao surgimento de linhagens VISA. (73)

Outro antimicrobiano glicopeptídeo utilizado para tratamento de MRSA é a teicoplanina, naturalmente produzida por *Actinoplanes teichomyceticus*, sua estrutura é muito semelhante a da vancomicina com a adição de um grupo lipofílico (74) e está representada na Figura 3. Até 2003, ainda não havia sido aprovada nos EUA, mas era disponível na Europa. (75) No Brasil, é comercializada em pó, com o medicamento de referência sendo Targocid® (Sanofi-Aventis, França). A Teicoplanina age na etapa final da polimerização da cadeia de peptideoglicanos da parede celular e tem ação bactericida lenta para estafilococos. (76, 65) Embora em 1990 já houvesse sido descrito caso de redução de sensibilidade à teicoplanina (54, 77- 78), esta ainda continua eficiente na maior parte dos casos.

Figura 3 - Representação da estrutura química da teicoplanina

Fonte:KAHNE et al. (65)

Mutantes resistentes à teicoplanina são mais frequentes que à vancomicina e alguns isolados resistentes à teicoplanina podem apresentar redução de sensibilidade à vancomicina. (68) Foi descrito que pressão por uso de teicoplanina pode induzir mutações em *S. aureus*, que ocasiona resistência intermediária à vancomicina e teicoplanina. (54, 79) Entretanto, estudo em ratos mostrou que pode ocorrer redução de sensibilidade a glicopeptídeos, mesmo sem exposição a estas drogas, sugerindo que a bactéria muda em função da infecção persistente, podendo causar resistência intermediária a estes antimicrobianos. (80)

O mecanismo de resistência aos glicopeptídeos e suas diferenças de um glicopeptídeo para outro não foi completamente elucidado. É uma classe difícil de ser estudada, pois pode inibir várias enzimas em dois processos diferentes (polimerização e *crosslinking* de peptideoglicanos) ao mesmo tempo. Além disso, tem sido relatado que glicopeptídeos diferentes têm como alvo diferentes passos enzimáticos. (65)

Outras opções de tratamento para MRSA são: daptomicina, tigeciclina, linezolida, e quinupristina-dalfopristina, embora esta última ainda não seja aprovada no Brasil. A daptomicina é um lipopeptídeo, com ação bactericida. Sua estrutura está representada na Figura 4. Por possuir parte lipídica, é capaz de se inserir na membrana, numa reação cálcio dependente, e causar liberação de potássio e sua despolarização, queda do potencial de membrana, levando à inibição da síntese de DNA, RNA e morte da bactéria. (81 – 82) Em 2005 foi reportado caso de resistência de *S. aureus* à daptomicina. (83) A daptomicina foi aprovada no Brasil em 2008 e recentemente já existem casos de resistência confirmados no país. (52)

Figura 4 - Representação da estrutura química da daptomicina.

Fonte: PIGRAU et al. (84)

Diminuição de sensibilidade à daptomicina foi relacionada com linhagens VISA, pois o espessamento da parede celular nestas linhagens poderia impedir a daptomicina de alcançar a membrana celular, já que é uma molécula maior que a vancomicina. (81) Portanto, a redução de sensibilidade à daptomicina em alguns casos está relacionada ao aumento da parede celular. (81, 85) Em 2008, foi demonstrada a seleção de linhagens hVISA resistentes à daptomicina a partir de VSSA seleção por daptomicina. (86) Em 2009, foi descrito que mutação no gene *graR* pode também alterar a sensibilidade à daptomicina. (73) Tais indícios mostram que deve haver resistência cruzada de daptomicina e vancomicina. (86 – 87) Assim como para vancomicina, alguns isolados de MRSA têm resistência heterogênea à daptomicina, sendo caracterizada pela presença de subpopulação resistente à daptomicina e podem ser identificados por método de análise de população. (85, 87)

Ainda, entre os mecanismos de resistência, estão incluídas mutações em genes responsáveis pela regulação de cargas na membrana bacteriana (*mprF*, *yycG*, *rpoB* e *rpoC*). Além destes, outros mecanismos podem ser responsáveis pela diminuição de sensibilidade à daptomicina. (82, 88 – 91) Mutações no gene *rpoB* podem ser acompanhadas por espessamento da parede celular e redução da carga negativa na superfície celular. A redução da carga negativa é acompanhada pelo aumento da expressão do operon *dlt*, que aumenta a produção de carga positiva. Uma vez que a droga possui carga positiva em pH neutro, este fato dificulta sua ligação. (90 – 91) O locus *mprF* está envolvido em gerar cargas positivas da membrana celular e *yycFG* está envolvido na resposta da membrana celular à estresse causado pela presença de daptomicina, e mutações neste gene são acompanhadas pelo fenótipo de resistência à esse antimicrobiano. (82) As mutações que podem levar à diminuição de sensibilidade à daptomicina são variadas, mas o mecanismo completo e sua relação com a redução de sensibilidade à vancomicina não estão totalmente elucidados.

A tigeciclina, análoga às tetraciclinas, foi desenvolvida em 1993 e pertence à nova classe de antimicrobianos chamada de glicilciclinas. (92) Foi aprovada para uso clínico no Brasil em 2005 e é indicada para Gram positivos e infecções causadas por MRSA, embora em geral, seja testada apenas para Gram negativos no país. (52) Apesar de não ser recomendada pelo CLSI (63), é recomendada pelo EUCAST para os testes *in vitro*. (64, 93) A tigeciclina entra no citoplasma por difusão e rotas de transporte ativo, se liga a subunidades 30S do ribossomo, onde bloqueia entrada de moléculas tRNA no sítio A do ribossomo e impede, assim, a elongação de cadeias polipeptídicas. (92–93)

Apesar de raros casos de resistência à tigeciclina em MRSA, em 2013 foi relatada essa resistência no Brasil. (52) Casos de resistência às tetraciclinas, em geral, ocorrem por bombas de efluxo e proteção contra ligação das tetraciclinas no ribossomo por proteínas que se ligam no sítio destas drogas. Por ser uma molécula grande, a tigeciclina previne o transporte pela maior parte dessas proteínas de efluxo. Entretanto, no caso de algumas bactérias como *Proteus sp.* e *Providencia sp.*, o mecanismo de resistência à tigeciclina envolve bombas de efluxo da família chamada RND (do inglês, *resistance-nodulation-division*) que conferem multirresistência. Mutações nos genes dessas RNDs podem ocorrer em MRSA por aumento de concentrações do antimicrobiano para selecionar estes mutantes *in vitro*, por seleção usando antimicrobiano. Em MRSA também já foi descrito uma superexpressão do gene *mepA*, que codifica uma proteína de bomba de efluxo diferente, que

pertence a uma família de extrusão de toxinas e múltiplas drogas. (92, 94) O mecanismo de resistência à tigeciclina em MRSA ainda precisa ser elucidado.

A linezolida é um antimicrobiano da classe das oxazolidinonas, totalmente sintético, aprovado no Brasil em 2005. (95) Age por mecanismo bacteriostático, ao se ligar à unidade 50S do ribossomo, inibindo a síntese proteica. (96–98) Resistência à linezolida pode ser causada pela mutação G2576T do sítio ativo da droga, ou mediada pela mutação de um ou mais alelos do gene alvo, *rRNA 23S*.(22)

Quinupristina-dalfopristina é uma estreptogramina semissintética injetável, resultante da mistura de quinupristina e dalfopristina (na proporção 30:70). Estreptograminas constituem um grupo de antibióticos formados por uma mistura de duas classes de componentes quimicamente distintos, designados estreptograminas A e B. (99) A ligação desses componentes à subunidade 50S do ribossomo bacteriano causa inibição da síntese de proteínas. Isoladamente, cada componente apresenta moderada atividade bacteriostática, mas a combinação possui efeito bactericida, atribuído à ligação sinérgica desses componentes com seu sítio de ação localizado no ribossomo. (100) A atividade inibitória dos dois componentes das estreptograminas é conservada mesmo quando o RNAr 23S é modificado pela ação de metilases do gene *erm*. Entretanto, a atividade bactericida resultante da combinação das duas estreptograminas é alterada. Em contraste com essa situação, a resistência a estreptogramina A aparenta suprimir, pelo menos em parte, o sinergismo mostrado pela combinação das estreptograminas. (101)

Uma vez que as estreptograminas A e B são quimicamente distintas e têm diferentes sítios de ligação, os mecanismos de resistência dessas duas estreptograminas são diferentes. Tem sido relatada a resistência em *Staphylococcus* a cada componente das estreptograminas. (102) Níveis de resistência intermediários são devidos à resistência a uma das estreptograminas. (103) O tipo mais comum de resistência a estreptogramina B está relacionado com a produção de metilases ribossomais codificadas pelo gene *erm*, resultando na diminuição da ligação da estreptogramina B com o ribossomo bacteriano. Mutações no gene *vgb* também podem inativar as estreptograminas B.

A resistência à estreptogramina A é geralmente causada por genes que codificam acetiltransferases (*vatA*, *vatB* e *vatC*) ou genes que codificam bombas de efluxo (*vgaA* e *vgaB*) e é frequentemente associada à inativação da estreptogramina B por proteínas

codificadas pelos genes *vgb*, o que resulta em um alto nível de resistência à mistura de estreptograminas (101), podendo também ser devida bombas de efluxo, codificadas por genes como *mrsAB*, *mefA*, *lsa* e *vga*. (104) Mutações nos genes *satA* também podem inativar espectrograminas A. Detecção de resistência em *Staphylococcus aureus* durante a terapia com quinupristina-dalfopristina tem sido raramente relatada. Em um caso de falha após o tratamento com quinupristina-dalfopristina, a resistência se deu em virtude da aquisição do gene *vat*. (105)

1.5 MRSA associados à comunidade

Além dos crescentes casos de resistência em MRSA, outro evento importante na evolução deste organismo foi o aparecimento de MRSA associado à comunidade, os denominados CA-MRSA (do inglês, *Community-Acquired Methicillin-resistant Staphylococcus aureus*). A rápida disseminação de linhagens CA-MRSA é causa de grande preocupação. (14) Um dos primeiros casos relatados dessas linhagens foi em população indígena da Austrália no começo dos anos 90. (106) Rapidamente se espalharam por diversos locais; dentre eles, Estados Unidos, Canadá, Ásia, América do Sul, e mesmo em países que tradicionalmente não possuem altos níveis de MRSA, por exemplo, Holanda, Dinamarca e Finlândia. (14) Essas linhagens possuíam características diferentes dos clones espalhados pelos ambientes hospitalares, não sendo relacionadas com estes clones e carreando o elemento *SCCmecIV* ou *V*. Uma vez que a transmissão ocorre primariamente por contato, populações de risco incluem pessoas que tem contato físico frequente com outros indivíduos, dentre estas, atletas (107), população carcerária (108), militares (108) e crianças. (109) Além do contato direto entre indivíduos, outros fatores que influenciam a transmissão são: locais com grande aglomeração de pessoas, integridade da pele comprometida, contato com itens e superfícies contaminadas, falta de cuidados higiênicos e de limpeza (110) e prévia hospitalização dentro de seis meses. (12)

O primeiro caso relatado de infecção causada por CA-MRSA na América do Sul ocorreu em 2009, em infecções de pele, no sul do Brasil. (111) Epidemias e surtos causados por CA-MRSA avançaram mundialmente, mas clones específicos são relacionados com

localidades específicas. Como exemplo, ST80 é o clone de CA-MRSA predominante na Europa (112), USA400 (ST1) na América do Norte (11), ST59 é predominante em Taiwan (113) e ST30, na Austrália e Brasil. (114, 11) A Figura 5 mostra a distribuição global dos STs encontrados em CA-MRSA de cada localidade.

Figura 5 - Distribuição global de CA-MRSA e possíveis rotas de disseminação. +/- = PVL positivas/ PVL negativas.

Fonte: CHARLEBOIS et al. (13)

Linhagens de CA-MRSA são geralmente sensíveis a vários antibióticos e carregam elemento *SCCmec* tipo IV e V, além disso, são mais frequentemente produtoras de PVL. (14) Provavelmente por serem elementos menores, são mais fáceis de adquirir e por isso, esse elemento pode ser mais facilmente disseminado. MRSA associados à comunidade geralmente causam infecções de pele e tecidos, embora possam causar pneumonia com necrose. (14, 111) Uma vez que podem estar associadas a doenças graves e invasivas e à produção de toxinas, algumas destas linhagens podem ser mais virulentas, além de serem de especial importância devido ao tempo de persistência de colonização. (11) A taxa de isolados de CA-MRSA que produzem PVL varia de lugar para lugar. Ainda, colonização por CA-MRSA ocorre com maior frequência em sítios diferentes que o nasal que por HA-MRSA. (115)

Apesar de descritos acima alguns marcadores moleculares que evidenciam a relação de linhagens associadas à comunidade, surtos em hospitais devidos CA-MRSA já foram descritos. (12, 115 – 117) Tais linhagens continuam a se espalhar na comunidade e em hospitais, devido crescimento de contaminação na comunidade, que funciona como seu

reservatório. (117) Atualmente, devido ao alto fluxo de pessoas em hospitais e internações, inexistência uma definição precisa de diferenciação entre amostras hospitalares e associadas à comunidade, dada a mudança na epidemiologia de MRSA's, não sendo rígida esta separação em MRSA associado a ambientes hospitalares (HA-MRSA) e associados à comunidade (CA-MRSA). (118) Entretanto, tais marcadores moleculares são de grande utilidade para entender o perfil e comportamento geral de um grupo de amostras.

Além das populações de risco de colonização por CA-MRSA citadas acima, indivíduos portadores de HIV/AIDS possuem alguns fatores que levam maior taxa de colonização nestas pessoas, tais como sistema imune comprometido. (9) Mesmo em pessoas com contagem de CD4 bem controlada, as taxas de colonização e infecção se mostraram mais alta nesta população. (119) Pessoas com HIV/AIDS possuem seis vezes mais chances de infecções em pele e tecidos moles que a população sem HIV/AIDS. (120) Infecções recorrentes causadas por CA-MRSA são preocupantes e podem chegar à taxa de 20 a 41% em portadores de HIV/AIDS. (9)

As características moleculares de MRSA que colonizam pacientes com HIV/AIDS são ainda pouco estudadas no Brasil, sendo a maior parte dos estudos em relação aos micro-organismos envolvidos em infecções nestes pacientes. (65, 121 – 123) Assim, é importante estudar a epidemiologia de MRSA isolados destes pacientes, para conhecer quais linhagens colonizam esta população no país e verificar a disseminação entre pacientes tratados no mesmo hospital.

2 Objetivos

O objetivo geral deste projeto foi caracterizar fenotípica e genotipicamente os MRSA isolados dos pacientes HIV positivo no primeiro e no sétimo dia de internação no Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, bem como os MRSA isolados de seus profissionais de saúde e comparar as linhagens para observar se havia disseminação entre os pacientes ou entre os pacientes e os profissionais de saúde.

2.1 Objetivos específicos

- Caracterizar molecularmente as amostras de MRSA para avaliar possíveis disseminações na comunidade estudada.
- Traçar o perfil de sensibilidade a antimicrobianos, incluindo alternativas recentes de tratamento;
- Detectar possíveis hVISA;
- Determinar o padrão de hemólise;
- Investigar quanto à presença do gene da Leucidina Pantón-Valentine

3 Materiais e Métodos

3.1 Amostras

Foram isoladas 33 amostras de MRSA de saliva e/ou de secreção nasal de indivíduos HIV positivos colonizados, que foram internados nas Unidades de Internação de Moléstias Infecciosas (MI - 6ª. andar ala A) e Unidade Especial de Tratamento de Doenças Infecciosas (UETDI - 2ª. andar) do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, bem como de profissionais da enfermagem que atuaram nestas unidades, no período de agosto de 2011 a maio de 2013. Estas unidades dispõem de 6 e 18 leitos, respectivamente, destinados quase exclusivamente à internação de pacientes com HIV.

Além da discriminação dos locais de isolamento, amostras foram isoladas, mediante assinatura de permissão dos pacientes, nas primeiras 24 horas de internação e no sétimo dia de estadia no hospital, aproximadamente. Tais isolados dos pacientes foram mantidos estocados à -80°C, nas instalações do LEMiMo (Laboratório de Epidemiologia e Microbiologia Molecular) no Instituto de Física de São Carlos - USP. A pesquisa de vigilância epidemiológica no setor citado foi realizada pela Profª. Dra. Elucir Gir, da EERP- USP que cedeu gentilmente os isolados de MRSA. Estes foram identificados e caracterizados como MRSA pelo sistema automatizado Vitek (Biomérieux, Marcy l'Etoile, França) com cartões GP Vitek® 2 (BioMérieux, Marcy l'Etoile, França), no Laboratório de Microbiologia e Sorologia do HCFMRP-USP. O projeto foi apreciado e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Escola de Enfermagem de Ribeirão Preto - USP e Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto - USP (Protocolo no. 1304/2011).

Ao todo, foram 33 isolados de MRSA, sendo 28 isolados de 19 pacientes, e 5 isolados de 3 profissionais de saúde, entre os 73 profissionais de saúde que participaram do estudo (4,1%). Dos 28 isolados de pacientes, 15 foram coletados no primeiro dia de internação e 13 no sétimo dia. Durante o período do estudo, 426 pacientes HIV positivos foram hospitalizados nestas alas, sendo que 271 aceitaram participar da pesquisa, assinando termo de consentimento. Dos 271 pacientes, 101 apresentaram colonização por *S. aureus*, sendo 19 colonizados por MRSA, representando 18,8% dos pacientes colonizados por *S. aureus* e 7% dos pacientes que aceitaram participar do trabalho.

Os dados completos de cada amostra de MRSA utilizada estão dispostos no Anexo 1.

3.1.2 Extração do DNA

O DNA das amostras foi extraído por método de lise mecânica, segundo Palazzo et al (2007). (124) Resumidamente, cultura crescida em caldo BHI, a 37°C “overnight”, foi centrifugada, lavada com solução fisiológica estéril, e submetida à lise mecânica com tampão de extração (Tris-HCl 0,2 M pH 8,5; 1,5% NaCl; EDTA 25 mM pH 8; 0,5% SDS em água) e pérolas de vidro tratadas com ácido nítrico, com posterior adição de fenol-clorofórmio, precipitação com isopropanol absoluto e foi realizado tratamento com RNase (1 mg/mL).

Após a extração, o DNA foi quantificado utilizando-se o equipamento *NanoDrop* 2000 (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, EUA) e diluído para a concentração necessária para realizar as reações em cadeia da polimerase (PCR, do inglês *Polymerase Chain Reaction*) utilizadas neste estudo. O DNA diluído para uso foi estocado a -20 °C.

3.2 Perfil de sensibilidade

O perfil de sensibilidade de todas as amostras foi traçado a partir dos valores da Concentração Inibitória Mínima (CIM) determinada por microdiluição em caldo, indicado pelo CLSI (2013). (63) Foram determinadas as CIM's para: oxacilina (Sigma-Aldrich Co., St Louis, EUA), vancomicina (Sigma-Aldrich Co., St Louis, EUA), daptomicina (Novartis, Basileia, Suíça), linezolida (Pfizer Inc., Groton, EUA), tigeciclina (Pfizer Inc., Groton, EUA) e teicoplanina (Sanofi-Aventis, Paris, França). A CIM da quinupristina-dalfopristina foi realizada por Etest® (Biomérieux, Paris, França), uma vez que a droga em pó não é disponível no país. Foram utilizadas como controles sensíveis as linhagens de *S. aureus* ATCC 29213 e ATCC 25923. A CIM da oxacilina foi determinada para confirmação de que as amostras eram realmente MRSA.

Seguindo as recomendações do CLSI (63), as amostras foram crescidas em placas de BHI ágar (Becton, Dickinson and Company, Franklin Lakes, EUA). Após o crescimento, foram suspensas em solução fisiológica 0,85% estéril e foram ajustadas em turbidez de 0,5 na escala McFarland, com auxílio do Densimat (Biomeriéux, Paris, França). Em seguida, a suspensão foi diluída em caldo (63) na proporção de 1:10 e 5 µL foram inoculados em microplacas de 96 poços, para cada antimicrobiano, em caldo contendo o antimicrobiano em diferentes concentrações em diluições seriadas. Para a daptomicina foi usado caldo Mueller-Hinton Cátion Ajustado (Becton, Dickinson and Company, Franklin Lakes, EUA) suplementado com Cálcio para concentração final de 50mg/L. Para a oxacilina foi utilizado caldo Mueller-Hinton Cátion Ajustado suplementado com 2% de NaCl (p/v) (LabSynth, Diadema, Brasil). Para todas as outras drogas, utilizou-se caldo Mueller-Hinton Cátion Ajustado. Os testes para cada amostra foram feitos em duplicata.

Para determinar níveis de alta resistência para oxacilina e teicoplanina, foram utilizadas diluições seriadas de 256 µg/mL a 0 µg/mL. Para vancomicina e linezolida, as diluições começaram em 8 µg/mL, para daptomicina em 4 µg/mL e para tigeciclina, em 2 µg/mL.

Após a inoculação, as microplacas foram incubadas a 36 °C, o crescimento celular analisado entre 18 e 24 horas, seguindo recomendações para cada droga segundo o CLSI (63), e em 48 horas, para observar se continuou crescimento, já que é sabido que em determinados casos de diminuição de sensibilidade, pode ocorrer crescimento lento. (86) Considerou-se como CIM, por definição, a primeira concentração em que não ocorreu crescimento bacteriano após o período de incubação. Para facilitar a visualização do crescimento celular, após o período de incubação as placas foram coradas com 30 µL de resazurina (Sigma-Aldrich Co., St Louis, EUA) 0,01%. A resazurina passa da coloração azul para rosa no caso de crescimento bacteriano, devido a sua redução na presença de crescimento celular.(125)

Os pontos de corte utilizados foram os preconizando pelo CLSI para todas as drogas, exceto tigeciclina, cujo ponto de corte foi o definido pelo EUCAST (*European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing*). (63) Os valores de ponto de corte para cada droga encontram-se listados na Tabela 2.

Tabela 2 - Pontos de corte dos antimicrobianos utilizados. Concentrações em µg/mL

Antimicrobiano	S	I	R	Referência
Daptomicina	≤1		> 1	CLSI
Linezolida	≤ 4	-	≥ 8	CLSI
Oxacilina	≤ 2	-	≥ 4	CLSI
Quinupristina/Dalfopristina	≤1	2	≥ 4	CLSI
Teicoplanina	≤ 8	16	≥ 32	CLSI
Teicoplanina	≤ 2	-	>2	EUCAST
Tigeciclina	≤ 0,5	-	> 0,5	EUCAST
Vancomicina	≤ 2	4 a 8	≥16	CLSI
Vancomicina	≤ 2	-	>2	EUCAST

Fonte: Elaborada pela autora.

3.3 Triagem para hetero-VISA

Todos os isolados passaram por uma triagem para detecção da redução da sensibilidade à vancomicina por análise de população de ponto único, seguindo o método sugerido por Hiramatsu e colaboradores. (68) A cultura em BHI foi ajustada a 0,5 de turbidez na escala de McFarland (cerca de 10^8 UFC/mL), com o auxílio do Densimat (BioMérieux, Marcy l'Etoile, França). Sobre uma placa de BHI Agar contendo vancomicina a 4 µg/mL, 100 µL da suspensão celular foi espalhada e a placa foi incubada a 37 °C por 48 horas. Foi observado o crescimento em 24 e 48 horas. Consideramos suspeitas de serem VISA se houver crescimento de mais de 1000 colônias em 48 horas, e de serem hVISA se crescessem menos de 1000 colônias. Todos os isolados que cresceram na triagem foram considerados possíveis hVISA e estas amostras foram submetidas à análise de população (PAP) para vancomicina.

3.4 Análise de população

Para determinar se amostras que mostraram redução de sensibilidade à vancomicina e daptomicina possuíam subpopulação resistente a essas drogas, amostras que cresceram na triagem para hVISA ou que mostraram resistência após 48 horas foram submetidas à análise de população. O experimento da análise de população foi baseado na descrição da literatura. (66, 69) Para a análise de população, colônias da cultura incubada por 18 horas em placas BHI ágar foram inoculadas em caldo BHI. Após 24 horas de incubação, a cultura foi ajustada para a escala 0,5 de McFarland. Foi então preparada diluição seriada ($1:10$ a $1:10^7$) em solução fisiológica estéril. Cem microlitros de cada diluição foram semeados em cada uma das placas de BHI ágar contendo diferentes concentrações da droga. Para vancomicina foram utilizadas placas nas concentrações de 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 8 $\mu\text{g/mL}$. Para daptomicina, placas com concentrações de 0; 0,125; 0,25; 0,5; 1; 2; 3; 4; 5 $\mu\text{g/mL}$. As placas foram incubadas a 37 °C por 48 horas e após esse período, o número de colônias que cresceram em cada placa foi contado. Foram utilizadas as diluições em que houve crescimento de 30 a 300 colônias, e feito o gráfico do log do número de unidades formadoras de colônias por ml ($\log \text{UFC/mL}$) 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). As linhagens *S. aureus* Mu50, *S. aureus* Mu3 e *S. aureus* N315 foram usadas como controles de amostras VISA, hetero-VISA e sensível à vancomicina, respectivamente.

Para determinar se as amostras de MRSA testadas foram ou não hVISA, utilizamos o critério de Hiramatsu et al. (68), que considera como hVISA amostras que crescem pelo menos 10^1 UFC, na concentração de 4 $\mu\text{g/mL}$ de vancomicina, concentração esta de níveis de resistência intermediária, determinada pelo CLSI. Outro critério é o proposto por Wootton e colaboradores, onde é calculada a área abaixo da curva (AUC, do inglês *Area Under the Curve*) de cada amostra; caso a razão da AUC da amostra em relação ao controle hVISA Mu3 seja $\geq 0,9$, a amostra é considerada hVISA. (69) Para daptomicina, não existe um critério bem definido ou área sob a curva como para vancomicina, apesar de alguns estudos trazerem termo “hetero resistente à daptomicina (hDRSA)” e experimento de análise de população. (88, 92) Assim, consideramos como possível resistência heterogênea à daptomicina amostras que tiveram crescimento de pelo menos 10^1 UFC, na concentração de 2 $\mu\text{g/mL}$, onde o

crescimento indicaria amostras resistentes pelo CLSI, analogamente ao que é proposto no método de Hiramatsu et al. para análise de população para vancomicina.

3.5 Determinação do padrão de hemólise

Foi realizado teste para determinar se as linhagens produziam hemólise, segundo recomendações da ANVISA. (126) Foram feitas placas de ágar sangue 5%, utilizando meio base BHI e sangue de carneiro, cedido pela Embrapa Agropecuária de São Carlos, pela Dra. Ana Carolina de Souza Chagas. Como controles, para α -hemólise foi utilizada linhagem VRE16 do próprio laboratório, para β -hemólise foi utilizada a linhagem de *S. aureus* ATCC 25923. Após o preparo das placas, as amostras foram inoculadas em profundidade e foi observado o halo de hemólise, após 24 horas de incubação a 37°C.

3.6 Determinação da presença do gene da PVL

Para determinação da presença do gene da Leucocidina Pantón Valentine foi usado método de PCR descrito por Lina e colaboradores. (24) A linhagem usada como controle positivo para PVL foi a *S. aureus* 81/108, gentilmente cedida pelo Professor Keiichi Hiramatsu. Os *primers* descritos (24) foram usados para a co-amplificação de *lukS-PV* e *lukF-PV*. Estes não amplificam outra classe de genes S ou F. As sequências dos *primers* usados podem ser observadas na Tabela 3.

De forma breve, a PCR foi realizada usando concentração final dos *primers* a 10 μ M, mistura de dNTP's a 200 μ M, tampão para Taq (1x) (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, EUA), $MgCl_2$ (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, EUA) a 2 mM, 2,5 U de Taq Polimerase (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, EUA) e 100 ng de DNA para volume total da reação de 50 μ L. A reação foi realizada no termociclador *C1000 Thermal Cycler* (Bio-Rad Laboratories, EUA) para as seguintes condições: 94°C por 5 minutos, 30 ciclos de 94 °C por 30 segundos, 55 °C por 30 segundos e 1 minuto a 72 °C e, por último, 72°C por 10 minutos. Os produtos da PCR foram analisados por gel de agarose 1% (Sigma-Aldrich Co., St Louis, EUA), como descrito acima para visualização de amplificadores para MPCR-1 e MPCR-2.

Tabela 3 - Primers utilizados para tipagem de SCCmec e verificação do gene da PVL

Reação	Primer	Sequência de nucleotídeos	Gene Baseado	Gene detectado	Tamanho (bp)	Referência
MPCR1						
	mA1	TGCTATCCACCCTCAAACAGG	<i>mecA</i>	<i>mecA</i> (mA1-mA2)	286	(30)
	mA2	AACGTTGTAACCACCCAAGA	<i>mecA</i>			(30)
	α 1	AACCTATATCATCAATCAGTACGT	<i>ccrA1</i>	<i>ccrA1-ccrB</i> (α 1- β c)	695	(30)
	α 2	TAAAGGCATCAATGCACAAACACT	<i>ccrA2</i>	<i>ccrA2-ccrB</i> (α 2- β c)	973	(30)
	α 3	AGCTCAAAAGCAAGCAATAGAAT	<i>ccrA3</i>	<i>ccrA3-ccrB</i> (α 3- β c)	1791	(30)
	β C	ATTGCCTTGATAATAGCCITCT	<i>ccrB1, ccrB2, ccrB3</i>			(30)
	α 4.2	GTATCAATGCACCAGAACTT	<i>ccrA4</i>	<i>ccrA4-ccrB4</i> (α 4.2- β 4.2)	1287	(30)
	β 4.2	TTGCGACTCTCTTGGCGTTT	<i>ccrB4</i>			(30)
	YR	CCTTTATAGACTGGATTATTCAAAATAT	<i>ccrC</i>	<i>ccrC</i> (YR-YF)	518	(30)
	YF	CGTCTATTACAAGATGTTAAGGATAAT	<i>ccrC</i>			(30)
MPCR2						
	mI6	CATAACTTCCCATTCTGCAGATG	<i>mecI</i>	<i>mecA-mecI</i> (mA7-mI6)	1963	(30)
	IS7	CATAACTTCCCATTCTGCAGATG	<i>IS1272</i>	<i>mecA-IS1272</i> upstream do <i>mecA</i> (mA7-IS7)	2827	(30)
	IS2	CATAACTTCCCATTCTGCAGATG	<i>IS431</i>	<i>mecA-IS431</i> upstream do <i>mecA</i> (mA7-IS2)	804	(30)
	mA7	ATATACCAAACCCGACAACTACA	<i>mecA</i>			
PVL						
	luk-PV-1	ATCATTAGGTAAAATGTCTGGACATGATCCA			433	(24)
	luk-PV-2	GCATCAASTGTATTGGATAGCAAAAGC				(24)

Fonte: Elaborada pela autora

3.7 Tipagem Molecular

3.7.1 Determinação do elemento SCCmec

Para determinação do tipo de elemento SCCmec de cada amostra, foi utilizado método de Multiplex PCR (MPCR, *Multiplex Polymerase Chain Reaction*), proposto por Kondo et al. (2007). (30) Foram utilizadas as MPCR-1 e MPCR-2, sugeridas pelos autores para caracterizar o complexo *ccr* e confirmar presença do gene *mecA*, e, classe do complexo *mec*, respectivamente. Os *primers* utilizados nestas reações estão listados na tabela 3.

Para ambas as MPCRs foram utilizadas 10 ng de DNA cromossômico. Para a MPCR1 foram utilizados os primers a 0,1 µM, mistura de DNTP a 200 µM de cada, tampão para Taq 1x (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, EUA 2,5 U de Taq polimerase (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, EUA e 3,2 mM de cloreto de magnésio (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, EUA), para volume de 50 µL de reação total. As condições de amplificação no termociclador C1000 *Thermal Cycler* (Bio-Rad Laboratories, EUA) foram 94°C por 2 minutos, 30 ciclos de 94 °C por 2 minutos, 57°C por 1 minuto e 72°C por 2 minutos, com passo final de elongação a 72°C por 2 minutos. A MPCR2 seguiu os mesmos parâmetros da MPCR1, exceto pela concentração de MgCl₂ que mudou para 2 mM e a temperatura de *annealing* utilizada foi de 60 °C por 1 minuto.

Após a amplificação por PCR, foi realizada eletroforese (BioRad Laboratories, EUA) com gel de agarose 1% (Sigma-Aldrich Co., St Louis, EUA) a 9 V/cm, 300 mA, 40 minutos. Para visualização do gel foi utilizado o sistema de foto-documentação Gel Doc foto iluminador (Bio-Rad Laboratories, EUA) e marcador molecular *GeneRuler 1 kb Plus DNA Ladder* (Fermentas, Burlington, Canadá). Para preparação das amostras, foi utilizado o corante não tóxico *HydraGreen® Safe DNA Dye* (Sinapse Biotecnologia, Brasil) diluído na amostra 1: 5000 e *Gel Loading Buffer Blue Juice* (10%) (Life Technologies, Carlsbad, CA, EUA).

A partir dos complexos *ccr* e *mec* tipados, o elemento SCCmec de cada amostra foi determinado. Apenas uma amostra de cada linhagem de um paciente foi contabilizada para realizar o percentual de cada tipo de elemento. Desse modo, o critério de exclusão foi por tipo

de elemento SCCmec e de tipagem por PFGE. Amostras idênticas para estes critérios, que vieram de mesmo paciente, não foram contabilizadas para saber a prevalência de SCCmec, pois poderiam deixar os dados tendenciosos. Assim, no caso de existir duas amostras de um mesmo paciente, uma de saliva e outra nasal, de mesmo ST, mesmo SCCmec e pulsotipo idênticos, estas duas amostras foram consideradas apenas uma vez.

3.7.2 Eletroforese de Campos Pulsados (PFGE)

A análise da macrorrestrição de DNA genômico, seguida por eletroforese em gel de campos pulsados é o método mais usado em estudos de epidemiologia molecular para análise da clonalidade de isolados. (127) Esta técnica foi usada para análise das amostras de MRSA deste estudo. O experimento foi realizado e analisado como descrito. (128) Para preparação dos plugues uma suspensão de células, cultivada em caldo BHI a 37 °C por 24 horas foi misturada em agarose *Low Melting* (Bio-Rad Laboratories, EUA) segundo recomendado para a preparação de plugues. (129) Após tratamento com tampão T10E50 (Tris-HCl 10 mM, EDTA 50 mM, pH 8) e lisostafina 1,4% (Sigma-Aldrich Co., St Louis, EUA), os plugues foram tratados com solução de sarcosil 1% (N-lauril sarcosina- Sigma-Aldrich Co., St Louis, EUA, 100 g e 0,5 mL EDTA 0,5 M pH 8,0 - J.T.Baker 500 g), a 37 °C por uma hora , seguido por incubação com proteinase K a 1%, a 37 °C, por um período de 18 horas. Para o preparo do gel, estes plugues foram incubados com tampão T10E1 (Tris-HCl 10 mM, EDTA 1 mM, pH 8) e PMSF à concentração final de 1 mM (Sigma-Aldrich Co., St Louis, EUA), a 50 °C, por 30 minutos. Foi feita lavagem com tampão T10E1 e digestão com 40 U de *SmaI* (New England Biolabs, Ipswich, Massachusetts), a 30 °C, por 18 horas seguindo instruções do fabricante. Após esse período, foram acrescentadas mais 16 U de *SmaI*, e deixado incubar por 2 horas a 30 °C. Após incubação, foi adicionada proteinase K a concentração final de 1 mM e reincubado por uma hora a 37 °C. Após este procedimento, os plugues foram lavados com o tampão T10E1.

Posteriormente, os plugues foram colocados nos poços do gel de agarose *Pulsed Field Certified* (Bio-Rad Laboratories, EUA) 1,2 % previamente preparado com tampão TBE 0,5X (Tris 44,5 mM, ácido bórico 44,5 mM e EDTA 1 mM) e a eletroforese foi realizada em cuba de eletroforese com equipamento CHEF Mapper XA *Pulsed Field Electrophoresis*

System (Bio-Rad Laboratories, EUA), por 22 horas, gradiente de 6 V/cm, ângulo de 120 °, com pulsos de 5 a 40 segundos, em rampeamento linear.

Para visualização, o gel foi corado em solução de TBE 0,5X com corante *Sybr Safe* (Invitrogen, São Paulo, Brasil) diluído 10:1, por 60 minutos. O gel foi visualizado em fotodocumentador *Gel Doc* foto iluminador (Bio-Rad Laboratories, EUA).

Para a análise dos géis e de similaridade entre as amostras, foi utilizado o *software Bionumerics* (Applied Maths NV, Bélgica), com coeficiente de correlação *Dice* e parâmetros de otimização ajustados em 0,5% e tolerância em 1,25%. Foram consideradas como mesmo pulstipo, amostras com similaridade maior que 80% (130), mesmo subtipo apenas quando eram idênticas.

3.7.3 Tipagem por Sequenciamento de MultiLocus (MLST)

MLST permite definir a linhagem dos isolados e com o banco de dados é possível comparar o resultado de um laboratório com os de outro. (131) Os níveis de discriminação das técnicas de PFGE e MLST são comparáveis, sendo que amostras de um mesmo pulstipo pelo critério de Tenover (129) têm tendência a possuir mesmo tipo de sequência (ST) ou um Variante de Locus Único (SLV, do inglês, *Single Locus Variant*). (127) PFGE é a melhor ferramenta para análises de amostras bacterianas isoladas em curto período de tempo, no máximo um ano. Já a MLST pode ser usada com amostragens de um período de tempo maior, pois considera apenas fragmentos de sete genes. MLST pode ser aplicada para indicar a evolução das linhagens ao longo do tempo. Este método se baseia na amplificação de sete genes *housekeeping*, de aproximadamente 450 a 500 kb, que evoluem lentamente, sendo, portanto, bons genes para estimar filogenia de linhagens. Para cada sequência de gene, diferentes sequências possuem um número diferente para cada alelo. A combinação do perfil alélico dá origem a um tipo de sequência, denominado ST. Isolados não relacionados dificilmente possuem a mesma combinação de sequências de alelos, sendo agrupado em outro ST. (132)

Foi realizada MLST para uma amostra de cada pulstipo. Foram amplificados, por PCR, os genes de proteínas *housekeeping* definidos para *S. aureus*: *arcC* (Carbamato

quinase), *aroE* (shikimato desidrogenase) , *glpF* (glicerol quinase), *gmk* (guanilato quinase), *pta* (fosfato acetil transferase), *tpi* (triosefosfato isomerase) e *yqiL* (Acetil coenzima A acetiltransferase). Os *primers* utilizados na PCR estão listados na Tabela 4. Foi realizada uma reação para cada *primer*, segundo descrito (132). Sucintamente, foi usado 100 ng de DNA genômico extraído previamente, nucleotídeos (mistura dNTPs a 200 mM – Fermentas, Burlington, Canadá), Cloreto de magnésio (2 mM), 1x solução tampão (Tris 20 mM, KCl 50 mM), 2,5 U de Taq DNA polimerase (Fermentas, Burlington, Canadá), 50 pM de cada *primer* e água deionizada e purificado pelo sistema Milli-Q (Millipore Corporation, São Paulo, Brasil) para completar o volume. Foi utilizado termociclador *C1000 Thermal Cycler* (Bio-Rad Laboratories, EUA) com condições de temperatura: 95 °C por 5 minutos, seguido de 30 ciclos a 55 °C por 1 minuto, 72 °C por um minuto, 95 °C por um minuto e extensão final a 72 °C por 3 minutos.

A amplificação dos fragmentos foi confirmada por visualização por eletroforese (90 V, 300 mA, 45 min) em gel de agarose 1%, corado com *HydraGreen® Safe DNA Dye* (Sinapse Biotecnologia, Brasil) e visualizado no Gel Doc foto iluminador (Bio-Rad Laboratories, EUA). Após confirmação, o produto de PCR foi purificado utilizando Kit *Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System* (Promega Corporation, Fitchburg, EUA) e quantificado com *NanoDrop 2000* (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, EUA).

O sequenciamento dos alelos amplificados foi realizado no equipamento *Applied Biosystems® 3130 Genetic Analyzer* (Life Technologies, Carlsbad, EUA) com os mesmos *primers* usados para reação de PCR (Tabela 4). As sequências foram analisadas no *Contig Express*, do software *Vector NTI Advance 11.0* (Life Technologies, Carlsbad, EUA).

Os *contigs* formados foram analisados utilizando o banco de dados de *S. aureus* do site *Multilocus Sequence Typing* (<http://www.mlst.net/>)(133), para alinhar e foi anotado eu respectivo número de alelo.

A partir do perfil alélico, foi determinado o ST das amostras e feito um diagrama através do programa eBURSTv3 (<http://saureus.mlst.net/eburst/>) (134), para verificação da relação genética entre os ST's das amostras de MRSA do trabalho e das contidas no banco de dados

Tabela 4 - *Primers* utilizados para amplificação de genes do MLST.

Primer	Sequência de nucleotídeos	Baseado na proteína	Gene detectado	Tamanho amplicon (bp)
<i>arcC</i>	TTGATTACACCAGCGCGTATTGTC AGGTATCTGCTTCAATCAGCG	Carbamato quinase	<i>arc</i>	456
<i>aroE</i>	ATCGGAAATCCTATTTACATTC GGTGTTGTATTAATAACGATATC	Shikimato desidrogenase	<i>aro</i>	456
<i>glpF</i>	CTAGGAACTGCAATCTTAATCC TGGTAAAATCGCATGTCCAATTC	Glicerol quinase	<i>glp</i>	465
<i>gmk</i>	ATCGTTTTATCGGGACCATC TCATTAAC TACAACGTAATCGTA	Guanilato quinase	<i>gmk</i>	429
<i>pta</i>	GT TAAAATCGTATTACCTGAAGG GACCCTTTTGTTGAAAAGCTTAA	Fosfato acetil transferase	<i>pta</i>	474
<i>tpi</i>	TCGTTTCATTCTGAACGTCGTGAA TTTGACCTTCTAACAATTGTAC	Triosefosfato isomerase	<i>tpi</i>	402
<i>yqiL</i>	CAGCATACAGGACACCTATTGGC CGTTGAGGAATCGATACTGGAAC	Acetil coenzima A acetiltransferase	<i>yqi</i>	516

Fonte: STAPHYLOCOCCUS... (136)

4 Resultados

4.1 Determinação da presença do gene da PVL

Somente dois isolados de MRSA deste estudo (6,1%) foram positivos para a produção de PVL (199N e 273S).

4.2 Perfil de sensibilidade

Todas as amostras foram confirmadas sendo resistentes à oxacilina (Sigma-Aldrich Co., St Louis, EUA) e foram sensíveis para linezolida, tigeciclina, quinupristina-dalfopristina, daptomicina e vancomicina. Os valores de CIM de cada droga estão apresentados na Tabela 5.

Tabela 5 - **Valores de CIM para as amostras (em µg/mL).** (OXA = oxacilina; LNZ = linezolida; TCP = teicoplanina; TGC = tigeciclina; QDA = quinupristina/dalfopristina; DPC = daptomicina; VAN = vancomicina. * = resistente em 48 horas;).

Amostra	OXA	LNZ	TCP	TGC	QDA	DPC	VAN
61N	256	2	0,5	0,125	0,5	0,5	2
62N	256	4	0,5	0,125	0,5	0,5	1
62S	256	4	0,5	0,125	0,5	1	1
79N	>256	4	0,5	0,125	0,5	0,5	1
80N	>256	2	0,5	0,25	0,5	0,5*	1
82N	256	4	0,5	0,25	0,5	0,5	2
100N	128	2	4	0,5	0,5	0,25	2
157N	>256	4	0,5	0,125	0,5	0,5	1
158N	256	4	0,5	0,125	0,5	0,5	2
172N	>256	2	16*	0,5	0,5	0,25	1
176N	128	2	16*	0,25	0,5	0,25	2
199N	32	4	0,5	0,125	0,5	0,25	1
231N	256	4	0,5	0,125	0,5	1	1

Continua

Continuação							
Amostra	OXA	LNZ	TCP	TGC	QDA	DPC	VAN
231N	256	4	0,5	0,125	0,5	1	1
232N	128	4	0,5	0,125	0,5	1	1
251N	32	4	0,5	0,125	0,5	0,25	1
252N	16	4	0,5	0,125	0,25	0,25	1
259N	128	4	0,5	0,5	0,5	0,5	2
260N	16	4	1	0,125	0,5	0,25	1
273S	32	4	0,5	0,125	0,25	0,5	2
291N	128	4	0,5	0,125	0,25	0,25	1
324S	256	2	4	0,5	0,5	0,5	2
PAS65N	128	4	1	0,5	0,5	0,5	2
349N	128	4	2	0,125	0,5	0,5	1
355N	16	4	0,5	0,125	0,5	0,5	2
400N	128	2	8	0,5	0,5	0,5	2
413N	8	4	0,5	0,125	0,25	0,5	2
423N	256	4	0,5	0,5	0,5	0,5	2
439N	16	4	1	0,125	0,5	0,25	1
455S	64	4	0,5	0,5	0,5	0,5	1
PAS04 N	256	4	0,5	0,5	1	0,25	1
PAS23 N	>256	4	0,5	0,25	0,5	0,5	2
PAS31 N	>256	4	0,5	0,5	0,5	0,5	1
PAS63 N	>256	4	0,5	0,5	0,5	0,5	2

Fonte: Elaborada pela autora.

A amostra 80N apresentou resistência à daptomicina após 48h de incubação com CIM = 2µg/mL Esta observação é importante, pois este é um antimicrobiano bactericida e a CIM não deveria sofrer alteração.

As amostras 172N e 176N apresentaram CIM de teicoplanina equivalente aos níveis de resistência intermediária *in vitro* em 24 horas de incubação (Tabela 5), CIM = 16µg/mL e em 48 horas mudaram para resistentes com CIM = 32µg/mL(Figura 6). Estes resultados descritos são de acordo com os pontos de corte preconizados pelo CLSI (63). Para o EUCAST (64), amostras de *S. aureus* com CIM ≤ 2 µg/mL de teicoplanina são consideradas sensíveis e as com CIM maior que 2 µg/mL são consideradas resistentes. Se fosse considerado o EUCAST, cinco amostras de MRSA estudadas seriam consideradas resistentes em 24 horas: o isolado 100N, com CIM = 4µg/mL, 172N, 176N, 342S, com CIM = 4 µg/mL e 400N, com CIM = 8 µg/mL.

Figura 6. Placa de microdiluição da teicoplanina corada com resazurina para algumas amostras, em 48 horas, mostra resistência à teicoplanina para as amostras 172N e 176N. Valor da CIM é a primeira concentração que não houve crescimento bacteriano, marcado em azul pela resazurina.

Fonte: Elaborada pela autora.

Estas amostras foram selecionadas e submetidas à determinação da CIM por Etest, ilustrado na Figura 7, que confirmou os mesmos valores de CIM em 24 horas, com mudança para resistentes em 48 horas.

Figura 7 - Etest para teicoplanina. Halo de inibição em 24 horas das amostras a) 172N e b) 176N.

Fonte: Elaborado pela autora.

Os valores de CIM₅₀ e CIM₉₀ estão listados na Tabela 6.

Tabela 6 - Valores de CIM₅₀ e CIM₉₀ para antimicrobianos testados (em µg/mL).

Antimicrobiano	CIM ₅₀	CIM ₉₀	Intervalo CIM encontradas
Oxacilina	128	>256	8 - >256
Linezolida	4	4	2 - 4
Teicoplanina	0,5	4	0,5 - 16
Tigeciclina	0,125	0,5	0,125 - 0,5
Quinupristina-dalfopristina	0,5	0,5	0,25 - 1
Daptomicina	0,5	0,5	0,25 - 1
Vancomicina	1	2	1 - 2

Fonte: Elaborada pela autora.

4.3 Triagem para hVISA

Na triagem utilizando placas com vancomicina na concentração de 4 µg/mL, três amostras apresentaram crescimento de colônias com morfologia heterogênea (100N, 172N, 176N) em 48 horas. As amostras que apresentaram crescimento na triagem foram submetidas à análise de população.

4.5 Análise de população

As curvas da análise de população das amostras com vancomicina podem ser observadas na Figura 8.

Utilizado o critério de Hiramatsu et al.(68), o qual considera como hVISA isolados sensíveis a vancomicina, mas que crescem pelo menos dez unidades formadoras de colônias na concentração de 4 µg/mL de vancomicina, os três isolados de MRSA (100N, 172N, 176N) foram considerados hVISA. Pelo critério de Wootton et al.(69), utilizando a razão da área abaixo da curva da amostra e do controle hVISA Mu3, as amostras 100N, 172N e 176N obtiveram valores de 1,1, 1,2 e 1,1, respectivamente, sendo consideradas hVISA por também por este outro critério.

Figura 8. Curva de análise de população das amostras positivas na triagem com vancomicina para detecção de hVISA.

Fonte: Elaborada pela autora.

A amostra 80N, apresentou sensibilidade à daptomicina em 24 horas, mas resistência em 48 horas e foi submetida a uma análise de população com daptomicina para investigar se existia presença de subpopulação resistente, que seria tratada como uma resistência heterogênea. A curva obtida está representada na Figura 9.

Figura 9. Análise de população para daptomicina.

Fonte: Elaborada pela autora.

Analogamente ao critério utilizado para determinação de hVISA, houve crescimento na concentração de 2 µg/mL de daptomicina, portanto, consideramos a amostra 80N com resistência heterogênea à daptomicina.

4.6 Tipo de hemólise

O tipo de hemólise de cada isolado foi determinado em ágar sangue de carneiro. Não foi encontrado nenhum com alfa-hemólise (hemólise incompleta). A maior parte dos isolados (84,8%) apresentou beta-hemólise (hemólise completa). Apenas 15,2 % não apresentaram hemólise (gama-hemólise). O tipo de hemólise de cada amostra especificamente está listado no Anexo 2.

4.5 Tipagem Molecular

4.5.1 Tipagem do elemento SCC*mec*

Todas as amostras tiveram o gene *mecA* amplificado, confirmando resistência à beta-lactâmicos. Na análise global das amostras de MRSA, utilizando o critério citado na metodologia, foi observada a prevalência do SCC*mec*IV, representando 32,1% dos isolados de MRSA deste estudo, enquanto SCC*mec*III representou 25%, SCC*mec*II foi encontrado em 21,4%, e SCC*mec*V em 14,3% dos isolados. Não foi possível determinar o tipo de elemento de duas amostras (7,1%) por este método.

Contabilizando apenas as amostras de pacientes, encontramos 33,3% de SCC*mec*IV, seguido de 29,2% de SCC*mec*III, 16,7% SCC*mec*V e 12,5% SCC*mec*II. Dois isolados, representando 8,3% das amostras de pacientes, não tiveram seu elemento determinado. Em relação às quatro amostras de profissionais de saúde associados a estes pacientes, 75% (três isolados) possuíam elemento SCC*mec*II e 25%, SCC*mec*IV. O Anexo 2 mostra o tipo de elemento de cada amostra.

4.5.2 Tipagem PFGE e MLST

As análises por eletroforese de campos pulsados e pelo *software Bionumerics v6.5* (*Applied Maths NV*, Bélgica) agruparam as amostras em 11 pulsotipos diferentes. Foi separada uma amostra de cada pulsotipo para se determinar o seu ST. O dendrograma com os pulsotipos e características de cada amostra está ilustrado na Figura 10. Todos os resultados agrupados com o dendrograma estão listados nos anexos 2 e 3.

Os pulsotipos mais frequentes foram o A e F, com seis amostras em cada um e, em ambos, coletadas dentro de um período de seis meses. O pulsotipo A foi encontrado em cinco pacientes diferentes e dos seis isolados do pulsotipo F, quatro foram coletados após uma semana de estadia no hospital, num intervalo de cinco meses.

A maior parte dos pacientes apresentou cultura positiva para MRSA apenas uma vez resultando em apenas um isolado por paciente. Dentre os pacientes com mais de um isolado de MRSA, os pacientes 8 e 9 apresentaram MRSA no sétimo dia de internação com mesmo pulsotipo encontrado no primeiro dia de internação. Eles apresentaram os pulsotipos F e A, respectivamente. Ao contrário, os pacientes 2 e 10 apresentaram MRSA com pulsotipos diferentes no primeiro e sétimo dia de internação, sendo a mudança de pulsotipos de G para F e A para C, respectivamente.

No período deste estudo, dois pacientes passaram por reinternação. O paciente 1 foi internado em agosto e em novembro de 2011. Não há registro de quanto tempo ele permaneceu no hospital. Em cada internação, todos os isolados, mesmo de sítios de coleta diferentes, pertenciam ao mesmo pulsotipo. Entretanto, entre uma internação e outra, houve mudança de pulsotipo, sem alteração no *SCCmec*. O paciente 15 também passou por duas internações, em junho e agosto de 2012, mantendo nestes dois meses colonização nasal com a mesma linhagem: pulsotipo idêntico e mesmo elemento *SCCmec*.

Durante o mesmo período de coleta, três profissionais de saúde (P1, P2 e P3) que cuidavam destes pacientes estavam colonizados por MRSA. Foram isoladas ao todo cinco amostras de MRSA destes profissionais de saúde. Em três coletas em épocas diferentes, o profissional P1 apresentou contaminação por MRSA e passou por um tratamento de descolonização. Duas destas amostras (PAS4N e PAS63N) apresentaram o mesmo pulsotipo (E1) apesar de terem sido isoladas em intervalo de quase três meses uma da outra. A terceira

amostra de MRSA do profissional de saúde P1 (PAS65N), isolada sete meses depois da PAS63N, pertence ao pulsotipo J. PAS65N possui alta similaridade com a amostra 172N do paciente 5, com 92,3% de similaridade por PFGE. Apesar da similaridade, estas foram isoladas com dez meses de diferença, sendo a amostra do paciente (172N) isolada primeiro. Foi observada uma relação entre isolados de dois profissionais de saúde (P1 e P3) sendo caracterizados como mesmo pulsotipo E, mas em subtipos diferentes e não foram relacionados a nenhuma amostra de pacientes.

PAS4N e PAS65N são ambas do profissional P1, com SCC*mec*II e não relacionadas pelo PFGE. No entanto, as análises por MLST indicam que são clones diferentes da mesma linhagem, ST105.

É importante lembrar que recentemente, a observação do nosso grupo sobre a junção dos principais complexos clonais (CC1, CC5, CC8, CC15 e CC97) de infecções hospitalares em apenas um. (135) Por este motivo, neste trabalho, utilizamos a terminologia de linhagens em caracterização de clones levando em conta a combinação ST-SCC*mec* proposta por Enright e colaboradores em 2002 (34) e não mais complexos clonais, por ter se tornado uma nomenclatura pouco específica. Anteriormente, ST5, 105 e 148 pertenciam ao complexo clonal (CC) 5, ST239, parte do CC8, ST30 do CC30. Agora, portanto, as linhagens encontradas neste estudo fazem parte do CC1 e CC30.

A análise das linhagens de MLST de 11 amostras mostrou a existência dos ST's 5, 105, 239, 30 e 148. Foi escolhida uma amostra de cada pulsotipo para se determinar o ST. Dentre as amostras tipadas por todas as técnicas, observou-se a presença de: ST5 - SCC*mec*IV, ST5- SCC*mec*V, ST105- SCC*mec*II (SLV do clone Nova York/Japão), ST239 - SCC*mec*III, ST30 - SCC*mec*IV e ST148 - SCC*mec*IV. Das oito amostras de pacientes tipadas por MLST, três foram ST5, duas ST239 uma ST105, uma ST148 e uma ST30.

Figura 10. Dendrograma com classificação de pulsotipos encontrados. Traçado no *software Bionumerics*, coeficientes de otimização = 0,5% e tolerância de 1,25%.

Fonte: Elaborada pela autora.

5 Discussão dos Resultados

Em relação à investigação da presença do gene que codifica PVL, as duas amostras positivas continham o elemento *SCCmec* tipo IV. Tal combinação é descrita na literatura e relacionada com MRSA isolados de pacientes HIV positivos, estando dentro da frequência esperada da população em geral, que é em torno de 5%. (136 – 137) Além disso, o perfil PVL positivo - *SCCmecIV* é relacionado com amostras da comunidade. (11) Observando as análises de PFGE e MLST, uma destas amostras PVL positivas, possui perfil ST30-*SCCmecIV* e outra, apresenta *SCCmecIV*, pertence ao pulsotipo A, subtipo A4. Uma amostra deste pulsotipo foi tipada por MLST e apresentou ST5. Por isso, acredita-se que, pela relação entre elas apresentada por PFGE, sejam do mesmo ST ou um SLV do ST5. Ambas as combinações já foram descritas como amostras de MRSA PVL positivas na literatura, em um estudo na Itália. (138)

Em relação ao perfil de sensibilidade aos antimicrobianos testados, foram encontrados três isolados caracterizados como hVISA, um caso de hDRSA e duas amostras de MRSA teicoplanina resistentes em 48h, de acordo com o CLSI, mas de grande relevância. De acordo com o EUCAST, cinco amostras seriam consideradas resistentes em 24 horas. Observando o dendrograma gerado a partir do experimento de PFGE, observa-se que estes foram casos esporádicos e que não se disseminaram. Para as outras drogas testadas todos os isolados foram sensíveis. Apesar de sensíveis pelo critério da CIM, reportado em 24 horas, como recomendado pelo CLSI, amostras resistência podem crescer mais lentamente, como o caso de algumas linhagens resistentes à vancomicina e daptomicina (81), e por este motivo observamos crescimento também em 48 horas.

Foi confirmada presença de população heterogênea em relação à sensibilidade à vancomicina nas amostras 100N, 172N, 176N, sendo caracterizadas como hVISA, pelo experimento de análise de população. As amostras 172N e 176N também mostraram redução de sensibilidade a outro antimicrobiano glicopeptídeo, a teicoplanina, com CIM de resistência intermediária, em 24 horas, e resistente, em 48 horas. Se levado em conta o ponto de corte do EUCAST, a terceira amostra hVISA encontrada, 100N, também seria resistente à teicoplanina. Alguns estudos relacionam mecanismos de resistência a ambos os compostos, por terem mecanismos de ação praticamente iguais. Ainda é descrito, que uso vancomicina pode selecionar linhagens com reduzida sensibilidade à teicoplanina, mesmo que tais amostras possuam CIM de sensível para vancomicina. (65, 76, 139- 140) Ironicamente,

nenhum destes pacientes foi tratado com teicoplanina ou vancomicina neste período de internação.

A amostra 80N foi caracterizada como resistente à daptomicina em 48 horas, pelo experimento de microdiluição, método considerado padrão ouro. É sabido pela literatura que amostras com redução de sensibilidade à daptomicina e vancomicina podem apresentar crescimento lento e podem ocorrer por seleção com o uso da droga. (86) A análise de população para daptomicina confirmou a existência de uma subpopulação resistente, portanto pode-se afirmar que a amostra 80N possui heterorresistência à daptomicina.

Embora os mecanismos de resistência à daptomicina não estejam completamente elucidados (141), sabe-se de seleção de linhagens resistentes *in vitro* (86) e *in vivo* (142) e existe a possibilidade de haver resistência heterogênea à daptomicina, que, assim como para amostras hVISA, pode ser caracterizada por análise de população. (85, 87) Novamente, nenhum paciente foi tratado com daptomicina, porém tal fato não exclui a possibilidade deste paciente ter recebido tratamento anteriormente em outro hospital e se manter colonizado com linhagem que passou por seleção. Linhagens selecionadas por vancomicina também já apresentaram resistência à daptomicina, como por exemplo, a *S. aureus* Mu50. Portanto, um tratamento prévio com vancomicina também poderia ser responsável por esta seleção de amostra resistente à daptomicina.

Quanto a caracterização molecular feita por tipagem de elemento *SCCmec*, análise de similaridade por PFGE e identificação de ST's por MLST, de modo geral, observamos que nestes isolados estudados, não há a predominância do Clone Brasileiro Endêmico (BEC), ST239- *SCCmecIII*. Tal fato está de acordo com a literatura, em que tem sido observada a substituição de MRSA com *SCCmecIII* por MRSA com outros *SCCmec* em hospitais desde os anos 2000. Em 2012, Teixeira et al. reportou a emergência de MRSA's do complexo clonal 5 (143) no Rio de Janeiro e já foi observada substituição do BEC por linhagem ST1- *SCCmecIV*. (144) Ainda no Rio de Janeiro, em 2013, foi descrito emergência de linhagens USA800/ST5 - *SCCmecIV* e USA100/ST5- *SCCmecII*. (145) No mesmo ano, em São Paulo, foi descrita prevalência de *SCCmecII*, como causa de bacteremia. (146) Além destes, outros estudos descrevem a substituição do BEC por outras linhagens. (49, 147 – 148)

Tal observação no Brasil está de acordo com outras substituições do BEC por outros clones em países em que aquele era mais comum. Em Portugal, onde o BEC era prevalente até 2000, houve diminuição do mesmo e emergência da linhagem EMRSA 15 (ST22-

SCC*mec*II). (48) Na Argentina, Paraguai e Chile, BEC foi substituído pelo clone Cordobês Chileno (ST5-SCC*mec*I). (46)

As amostras destes pacientes podem ser ainda associadas a amostras da comunidade, sabidamente com heterogênea distribuição de linhagens, e observação de SCC*mec*IV em amostras de CA-MRSA, assim como observamos neste estudo. (11, 149 – 150)

Foi observada uma grande variedade clonal entre os isolados estudados. Os resultados de MLST mostraram a presença de linhagens do Clone Pediátrico ST5-SCC*mec*IV, SLV do clone Nova York/Japão ST105- SCC*mec*II, ST5-SCC*mec*V, ST148-SCC*mec*IV , este SLV do ST105 e descrito em usuários de drogas injetáveis (151 – 152), ST30-SCC*mec*IV e ainda, a presença do Clone Brasileiro Endêmico (ST239- SCC*mec*III), embora não prevalente. Todas estas combinações ST-SCC*mec* já foram descritas na literatura. (44, 138, 143, 149, 153 – 154)

A linhagem ST30-SCC*mec*IV já foi reportada como relacionada à comunidade, com isolados PVL positivos, condizente com o resultado encontrado para a amostra 273S, inclusive sendo separada em um pulsotipo único. Este tipo de linhagem é relacionado ao perfil de virulência contendo os genes *icaA*, *cna*, *fnbA* e *ebpS*, que podem estar relacionados a infecções invasivas e foi considerado clone de CA-MRSA predominante na América do Sul. (138, 44, 13, 11) As linhagens do Clone Pediátrico, ST5-SCC*mec*IV e ST5-SCC*mec*V já foram descritas como amostras relacionadas à comunidade, embora possam ser encontradas em amostras provenientes de ambientes hospitalares, já que devido ao fluxo de pessoas e contaminação, atualmente tal separação em CA-MRSA e HA- MRSA é imprecisa. (44,138, 143, 152, 153 – 154) No caso da linhagem ST148-SCC*mec*IV de paciente, foi observada em pacientes com readmissões em hospitais, sendo de acordo com o que encontramos. (155) A linhagem ST105-SCC*mec*II encontrada em pacientes e profissionais de saúde neste estudo, já foi descrita em um hospital em Minas Gerais. (52)

Quanto aos resultados de similaridade a partir do experimento de PFGE, pulsotipo A, um dos mais frequentes, possuiu quatro isolados de pacientes em um período de cinco meses, podendo se tratar de uma disseminação controlada dessa linhagem, nesta ala do hospital e neste período de tempo. De todos os pacientes, apenas os pacientes 1 e 15 passaram por reinternação e houve manutenção das linhagens de MRSA que os colonizavam, podendo ser uma colonização prévia as internações e que se manteve.

Entre os isolados de pacientes, não foi observada disseminação de uma linhagem. É importante salientar que no pulsotipo J, houve relação entre amostras de pacientes e profissionais de saúde. Apesar de três amostras de pacientes estar proximamente relacionadas com um isolado do profissional de saúde P1 (PAS 65N), a coleta neste profissional é posterior a de todos os pacientes, podendo não ter sido transmitidas diretamente dos pacientes ao profissional de saúde. Não há como afirmar se esta linhagem está se disseminando no ambiente hospitalar, pois coletas do ambiente não foram analisadas. Entretanto, o mesmo profissional de saúde P1 apresentou colonização por MRSA em três coletas em épocas distintas, uma vez em novembro de 2011, e novamente em março e outubro de 2012. Este profissional de saúde passou por procedimento de descolonização adotado no hospital, com sulfadizina de prata, aplicada 1 mL nas narinas e banho com clorexidina, ambos por 5 dias. (156) Mesmo após a descolonização houve reincidência de colonização neste profissional. Apesar de não poder ser estipulado um paciente neste contexto do estudo, a contaminação pode ter ocorrido nesta ou em outra ala que esse profissional trabalhou ou até mesmo fora do hospital.

Todas as outras amostras de profissionais de saúde foram agrupadas nos pulsotipos E e H, sendo este último com amostra única do profissional de saúde 2 e o primeiro com três amostras de dois profissionais, que não possuem relação com amostras de pacientes.

6 Conclusões

- Não foi encontrada disseminação de uma linhagem específica entre os pacientes, ou entre profissionais de saúde e pacientes.
- Não foi observada relação entre o primeiro e sétimo dia de internação no hospital e aquisição de uma linhagem específica.
- Foram encontrados dois isolados de pacientes com resistência intermediária à teicoplanina em 24 horas, que se tornaram resistentes em 48 horas, representando 7,1% do total estudado.
- Foi detectada presença de três isolados hVISA e um isolado com subpopulação hDRSA, sendo necessária cautela quanto ao uso dos antimicrobianos para evitar pressão seletiva no ambiente hospitalar para amostras multirresistentes
- O padrão de hemólise encontrado foi de hemólise completa (β hemólise).
- Dois isolados de pacientes foram positivos para presença do gene da Leucocidina Pantón Valentine, representando 6% do total das amostras e 7,1% de amostras de pacientes.
- Este trabalho contribuiu para aumentar o conhecimento sobre colonização por MRSA em indivíduos contaminados com HIV/AIDS, até então uma comunidade pouco explorada no Brasil, e fornecer subsídios para que o hospital adote/avalie as medidas de controle de disseminação de MRSA entre pacientes e profissionais da saúde. Deve-se ressaltar que se recomenda uma vigilância epidemiológica a fim de se verificar ou monitorar a disseminação das linhagens com diminuição de sensibilidade encontradas neste estudo.¹

¹ De acordo com a Associação Brasileira de Normas Técnicas. NBR 14 724.

Referencias

- 1 DOURADO, I. et al. HIV-1 seroprevalence in the general population of Salvador, Bahia State, Northeast Brazil. **Cadernos de Saúde Pública**, v. 23, n. 1, p. 25- 32, 2007.
- 2 DEPARTAMENTO de DST, AIDS e hepatites virais. Disponível em: <<http://www.aids.gov.br/pagina/historia-da-aids>>. Acesso em: 25 fev. 2014.
- 3 FONSECA, M. G. P.; BASTOS, F. Twenty-five years of the AIDS epidemic in Brazil: principal epidemiological findings, 1980-2005. **Cadernos de Saúde Pública**, v. 23, supl.3, p. S333-S343, 2007.
- 4 amfAR, The Foundation for AIDS research. Disponível em: <<http://www.amfar.org/about-hiv-and-aids/facts-and-stats/statistics--worldwide/>>. Acesso em: 28 fev. 2014.
- 5 SADALA, M. L. A.; MARQUES, S. A. Vinte anos de assistência a pessoas vivendo com HIV/AIDS no Brasil: a perspectiva de profissionais da saúde. **Cadernos de Saúde Pública**, v. 22, n. 11, p. 2369- 2378, 2006.
- 6 BRITO, A. M.; CASTILHO, E. A.; SZWARCZALD, C. L. AIDS e infecção pelo HIV no Brasil: uma epidemia multifacetada. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 34, n. 2, p. 207- 217, 2000.
- 7 AIDS no Brasil. Disponível em: <www.aids.gov.br> .Acesso em: 29 dez. 2012.
- 8 SILVA, J. M.; DOS SANTOS, S. E. S. Sepsis in AIDS patients: clinical etiological and inflammatory characteristics. *J Int AIDS Soc*, v. 16, p. 17344, 2013.
- 9 COLE, J.; POPOVICH, K. Impact of community-associated methicilin-resistant *Staphylococcus aureus* on HIV-infected patients. **Current HIV/AIDS Reports**. v. 10, n.3, p. 244- 253, 2013.
- 10 VYAS, K. J. et al. Trends and factors associated with initial and recurrent methicilin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) skin and soft-tissue infections among HIV-infected persons: an 18-year study. **Journal of the International Association of Providers of AIDS Care (JIAPAC)**. Disponível em: <<http://jia.sagepub.com/content/early/2013/04/18/2325957412473780.full.pdf+html>>. Acesso em: 05 jan. 2014
- 11 DELEO, F. R. et al. Community associated methicilin-resistant *Staphylococcus aureus*. **Lancet**. v. 375, n. 9735, p. 1557- 1568, 2010.
- 12 CHARLEBOIS, E. D. et al. Origins of community strains of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. **Clinical Infectious Diseases**, v. 39, n.1, p. 47 - 54, 2004.
- 13 OTTER, J. A.; FRENCH, G. L. Molecular epidemiology of community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in Europe. **Lancet**, v. 10, n. 4, p.227 - 239, 2010.

- 14 CHAMBERS, H. F.; DELEO, F. Waves of resistance : *Staphylococcus aureus* in the antibiotic era. **Nature Reviews Microbiology**, v. 7, p. 629 - 641, 2009.
doi:10.1038/nrmicro2200.
- 15 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.
- 16 VANNUFFEL, P. et al. Rapid and specific molecular identification of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in endotracheal aspirates from mechanically ventilated patients. **Clinical Microbiology**, v. 38, n. 8, p. 2366 - 2368, 1998.
- 17 KONEMAN, E. et al. **Diagnóstico microbiológico**. 6. ed, Rio de Janeiro: Ed. Guanabara Koogan, 2008. v.1, cap. 12, p.637 - 643.
- 18 CORBIERE MOROT-BIZOT, S.; TALON, R.; LEROY, S. Development of a multiplex PCR for the identification of *Staphylococcus* genus and four staphylococcal species isolated from food. **Journal of Applied Microbiology**, v. 97, n. 5, p. 1087 - 1094, 2004.
- 19 MARTINEAU, F. et al. Species-specific and rapid identification of *Staphylococcus aureus*. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 36, n. 3, p. 618 - 623, 1998.
- 20 POYART, C. et al. Rapid and accurate species-level identification of coagulase-negative staphylococci by using the *sodA* gene as a target. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 39, n. 12, p. 4296 - 4301, 2001.
- 21 GORDON, R. J.; LOWY, F. D. Pathogenesis of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infection. **Clinical Infectious Diseases**, v. 46, supl. 5, p. S350 - S 359 . 2008.
- 22 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.
- 23 MCCARTHY, A. J.; WITNEY, A. A.; LINDSAY, J. *Staphylococcus aureus* temperate bacteriophage: carriage and horizontal gene transfer is lineage associated. **Cellular and Infection Microbiology**, 2012. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3417521/pdf/fcimb-02-00006.pdf>> . Acesso em: 07 jan. 2014.
- 2 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.
- 25 LIGON, B. L. Penicillin its discovery and early development. **Seminars in Pediatric Infectious Diseases**, v. 15, n. 1, p. 52 - 57, 2004.
- 26 GARCIA-ALVAREZ, L. et al. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* with a novel *mecA* homologue in human and bovine populations in the UK and Denmark: a descriptive study. **Lancet Infectious Diseases**, v. 11, n. 8, p. 595 - 603, 2011.

- 27 BECKER, K. et al. Evaluation of a modular multiplex-PCR methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* detection assay adapted for *mecC* detection. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 51, n. 6, p. 1917 - 1919, 2013.
- 28 PETERSEN, A. et al. Epidemiology of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* carrying the novel *mecC* gene in Denmark corroborates a zoonotic reservoir with transmission to humans. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 19, n. 1, p. E11 - E22, 2012.
- 29 LAURENT, F. et al. MRSA harboring *mecA* variant gene, *mecC*, France. **Emerging Infectious Diseases**, v. 18, n. 9, p. 1465 - 1467, 2012.
- 30 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.
- 31 MILHEIRICO, C.; OLIVEIRA, D. C.; LENCASTRE, H. Update to the multiplex PCR strategy for assignment of *mec* element types in *Staphylococcus aureus*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 51, n. 9, p. 3374 - 3377, 2007.
- 32 ITO, T. et al. Structural comparison of three types of staphylococcal cassette chromosome *mec* integrated in the chromosome in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 45, n. 5, p. 1323 - 1336, 2001.
- 33 DEURENBERG, R. H. et al. The molecular evolution of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. **Clinical Microbiology Infections**, v. 13, n. 3, p. 222 - 235, 2007.
- 34 ENRIGHT, M. C. et al. The evolutionary history of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). **National Acad Sciences**, v. 99, n. 11, p. 7687 - 7692, 2002.
- 35 INTERNATIONAL Working Group on the Staphylococcal Cassete Chromosome elements. Disponível em: <http://www.sccmec.org/Pages/SCC_ClassificationEN.html. www.sccmec.org>. Acesso em: 25 fev. 2014.
- 36 ITO, T.; KARAYAMA, Y.; HIRAMATSU, K. Cloning and nucleotide sequence determination of the entire *mec* DNA of pre-methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* N315. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 43, n. 6, p. 1449 - 1458, 1999.
- 37 ITO, T. et al. Novel type V staphylococcal cassette chromosome *mec* driven by a novel cassette chromosome recombinase, *ccrC*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 48, n. 7, p. 2637- 2651, 2004.
- 38 OLIVEIRA, D. C. et al. Assessment of allelic variation in the *ccrAB* locus in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clones. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v 58, n. 1, p.23- 30, 2006.
- 39 BERGLUND, C. et al. Genetic diversity of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* carrying type IV SCC*mec* in Orebro county and the western region of Sweden. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 63, n. 1, p. 32 - 41, 2009.

- 40 ZHANG, K. et al. Novel staphylococcal cassette chromosome *mec* type, tentatively designated type VIII, harboring class A *mec* and type 4 *ccr* gene complexes in a Canadian epidemic strain of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 53, n. 2, p. 531 - 540, 2009.
- 41 MCCARTHY, A. J.; LINDSAY, J. A. Genetic variation in *Staphylococcus aureus* surface and immune evasion genes is lineage associated: implications for vaccine design and host-pathogen interaction. **BMC Microbiology**, 2010. Disponível em: < <http://www.biomedcentral.com/content/pdf/1471-2180-10-173.pdf>>. Acesso em: 08 jan. 2014.
- 42 TURLEJ, A.; HRYNIEWICZ, W.; EMPEL, J. Staphylococcal cassette chromosome *mec* (SCC*mec*) classification and typing methods: an overview. **Polish Journal of Microbiology**, v. 60, n. 2, p. 95 - 103, 2011.
- 43 CAMPOS, G. B. et al. Isolation, molecular characteristics and disinfection of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* from ICU units in Brazil. **New Microbiologica**, 2012. Disponível em: < http://www.newmicrobiologica.org/pub/allegati_pdf/2012/2/183.pdf>. Acesso em: 30 abr. 2014.
- 44 SCHUENCK, R. P. et al. *Staphylococcus aureus* isolates belonging to different multilocus sequence types present specific virulence profiles. **Immunology & Medical Microbiology**, v. 65, n. 3, p. 501 - 504, 2012.
- 45 REINATO, L. A. F. et al. Nasal colonization with *Staphylococcus aureus* in individuals with HIV/AIDS attended in a Brazilian teaching hospital. **Revista Latino-Americana de Enfermagem**, v. 21, n. 6, p. 1235 - 1239, 2013.
- 46 RODRIGUEZ-NORIEGA, E. et al. Evolution of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clones in Latin America. **International Journal of Infections Diseases**, v. 14, n. 7, p. e560 - e566, 2010.
- 47 VIVONI, A. M. et al. Clonal composition of *Staphylococcus aureus* isolates at a Brazilian university hospital: identification of international circulating lineages. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 44, n. 5, p. 1686 - 1691, 2006.
- 48 AMORIM, M. L. et al. Changes in the clonal nature and antibiotic resistance profiles of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates associated with spread of EMRSA-15 clone in a tertiary care Portuguese hospital. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 45, n. 9, p. 2881 - 2888, 2007.
- 49 TRINDADE, P. A. et al. Prevalence of SCC*mec* type IV in nosocomial bloodstream isolates of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 43, n. 7, p. 3435 - 3437, 2005.
- 50 SHUENCK, R. P. et al. Polyclonal presence of non-multiresistant methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates carrying SCC*mec* IV in health care-associated infections in a hospital in Rio de Janeiro, Brazil. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v. 64, n. 4, p. 434 - 441, 2009.

- 51 MIMICA, M. J. et al. SCCmec type IV, PVL-negative, methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in cystic fibrosis patients from Brazil. **Current Microbiology**, v. 62, p. 388 - 390, 2011.
- 52 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 & Infection**, 2013. Disponível em: <http://journals.cambridge.org/download.php?file=%2FHYG%2FHYG142_03%2FS0950268813001325a.pdf&code=43beb85635058ad5589a28152cc6112a>. Acesso em: 07 jan. 2014.
- 53 OKADO, J.; MARTINEZ, R.; CAMARGO, I. L. B.C. Análise de MRSA's de infecções de um hospital de Ribeirão Preto-SP. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE MICROBIOLOGIA, 27, 2013, Natal. **Resumos...** Natal: Sociedade Brasileira de Microbiologia, 2013. v. 1, n. 1, p. 93.
- 54 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.
- 55 HIRAMATSU, K. et al. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clinical strain with reduced vancomycin susceptibility. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, 1997. Disponível em: <<http://jac.oxfordjournals.org/content/40/1/135>>. Acesso em: 30 abr. 2014.
- 56 PREVENTION Centers for Disease Control. Disponível em: <http://www.cdc.gov/HAI/settings/lab/vrsa_lab_search_containment.html. Clinical Laboratories Role in the Search and Containment of VRSA-HAI>. Acesso em: 2 abr. 2014.
- 57 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 Sciences**, v. 15, n. 2, p. 803 - 806, 2012.
- 58 SAHA, B. et al. 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.
- 59 ROSSI, F. et al. Transferable vancomycin resistance in a community-associated MRSA lineage. **New England Journal of Medicine**, v. 370, n. 16, p. 1524 - 1531.
- 60 OLIVEIRA, G. M. et al. Isolation in Brazil of nosocomial *Staphylococcus aureus* with reduced susceptibility to vancomycin. **Infection Control and Hospital Epidemiology**, v. 22, n. 7, p. 443- 448, 2001.
- 61 MARQUES, J. B. et al. Detection of *Staphylococcus aureus* with an intermediate profile to vancomycin (VISA) isolate from Santa Maria, RS. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 44, n. 1, p. 277 - 279, 2013.

- 62 MELO, G. B., et al. Analysis of the genetic diversity of vancomycin-resistant *Staphylococcus aureus*. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 36, n. 2, p. 126 - 130, 2005.
- 63 CLINICAL AND LABORATORIAL STANDARDS INSTITUTE. **M100- S23: Performance standards for antimicrobial susceptibility testing: twenty-third. informational supplement**. Wayne, PA: CLSI, 2013.
- 64 EUROPEAN COMMITTEE ON ANTIMICROBIAL SUSCEPTIBILITY TESTING. **Breakpoint tables for interpretation of MICs and zone diameters**. Basel, 2012. Disponível em:
>http://www.eucast.org/fileadmin/src/media/PDFs/EUCAST_files/Breakpoint_tables/Breakp
>. Acesso em: 28 fev. 2014.
- 65 KAHNE, D. et al. Glycopeptide and lipoglycopeptide antibiotics. **Chemical Reviews**, v. 105, p. 425–448, 2005. doi 10.1021/cr030103a.
- 66 SATOLA, S. W. et al. Comparison of detection methods for heteroresistant vancomycin-intermediate *Staphylococcus aureus*, with the population analysis profile method as the reference method. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 49, n. 1, p. 177 - 183, 2011.
- 67 RIEDERER, K. et al. Detection of intermediately vancomycin-susceptible and heterogeneous *Staphylococcus aureus* isolates: comparison of Etest and agar screening methods. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 49, n. 6, p. 2147 - 2150, 2011.
- 68 HIRAMATSU, K. et al. Dissemination in Japanese hospitals of strains of *Staphylococcus aureus* heterogeneously resistant to vancomycin. **Lancet**, v. 350, n. 9092, p. 1670-1673, 1997.
- 69 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. 43, n. 4, p. 399-413, 2001.
- 70 DAUM, R. S. et al. Characterization of *Staphylococcus aureus* isolates with decreased susceptibility to vancomycin and teicoplanin: isolation and purification of a constitutively produced protein associated with decreased susceptibility. **Journal of Infectious Diseases**, v. 166, n. 5, p. 1066 - 1072, 1992.
- 71 PFELTX, R. F. et al. Characterization of passage-selected vancomycin-resistant *Staphylococcus aureus* strains of diverse parental backgrounds. **Antimicrobial Agents Chemotherapy**, v. 44, n. 2, p. 294 - 303, 2000.
- 72 SAKOULAS, G. et al. *Staphylococcus aureus* accessory gene regulator (*agr*) group II: is there a relationship to the development of intermediate-level glycopeptide resistance? **Journal of Infectious Diseases**, v. 187, n. 6, p. 929 - 938, 2003.
- 73 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.

- 74 HERDORN, A. et al. Biosynthetic studies of the glycopeptide teicoplanin by ^1H and ^{13}C NMR*. **Journal of Biological Chemistry**, v. 275, n. 9, p. 6201 - 6206, 2000.
- 75 GOODMAN, A.; GILMAN, A. **As bases farmacológicas da terapêutica**. 10. ed. Rio de Janeiro: Ed. Guanabara Koogan, 2003.v.1, cap. 7, p. 929 - 955.
- 76 JUNG, H. et al. Biosynthesis, biotechnological production, and application of teicoplanin: current state and perspectives. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 48, n. 3, p. 417 - 428, 2009.
- 77 MAINARD, J. L. et al. Decreased teicoplanin susceptibility of methicillin-resistant strains of *Staphylococcus aureus*. **Journal of Infectious Diseases**, v. 171, n. 6, p. 1646 - 1650, 1995.
- 78 KAATZ, G. et al. Emergence of teicoplanin resistance during therapy of *Staphylococcus aureus* endocarditis. **Journal of Infectious Diseases**, v. 162, n. 1, p. 103 - 108, 1990.
- 79 BISCHOFF, M. ; BERGER-BACHI, B. Teicoplanin stress-selected mutations increasing sigma(B) activity in *Staphylococcus aureus*. **Antimicrobials Agents and Chemotherapy**, v. 45, n. 6, p. 1714 - 1720, 2001.
- 80 VAUDAUX, P. et al. In vivo emergence of subpopulations expressing teicoplanin or vancomycin resistance phenotypes in a glycopeptide-susceptible, methicillin-resistant strain of *Staphylococcus aureus*. **Journal of Antimicrobials and Chemotherapy**, v. 47, n. 2, p. 163 - 170, 2001.
- 81 CUI, L. et al. Correlation between reduced daptomycin susceptibility and vancomycin resistance in vancomycin-intermediate *Staphylococcus aureus*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 50, n. 3, p. 1079 - 1082, 2006.
- 82 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.
- 83 MANGILI, A. et al. Daptomycin-resistant, methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* bacteremia. **Clinical Infectious Diseases**, v. 40, n. 7, p. 1058 - 1060, 2005.
- 84 PIGRAU, C.; ALMIRANTE, B. Oxazolidinonas, glucopéptidos y lipopéptidos cíclicos. **Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica**, v. 27, n. 4, p. 236 - 246, 2009.
- 85 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.
- 86 CAMARGO, I. L. B.C. et al. Serial daptomycin selection generates daptomycin-nonsusceptible *Staphylococcus aureus* strains with a heterogeneous vancomycin-intermediate phenotype. **Antimicrobial Agents Chemother**, v. 52, n. 12, p. 4289 - 4299, 2008.
- 87 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.

88 VAN HAL, S. J.; PATERSON, D. L.; GOSBELL, I. B. Emergence of daptomycin resistance following vancomycin-unresponsive *Staphylococcus aureus* bacteraemia in a daptomycin-naïve patient a review of the literature. **European Journal of Clinical Microbiol Infectious Diseases**, v. 30, n. 5, p. 603 - 610, 2011.

89 PATEL, J. B. et al. An association between reduced susceptibility to daptomycin and reduced susceptibility to vancomycin in *Staphylococcus aureus*. **Clinical Infectious Diseases**, v. 42, n. 11, p. 1652 - 1653, 2006.

90 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.

91 CAFISO, V. et al. *dltA* overexpression: a strain-independent keystone of daptomycin resistance in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 43, n. 1, p. 26 - 31, 2014.

92 SEPUTIENE, V. et al. Tigecycline – how powerful is it in the fight against antibiotic-resistant bacteria? **Medicina (Kaunas)**, v. 46, n. 4, p. 240 - 248, 2010.

93 AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. **Detalhe do produto:** tygacil. Brasília, 2005. Disponível em: :
<http://www7.anvisa.gov.br/datavisa/consulta_produto/rconsulta_produto_detalhe.asp>.
Acesso em :28 fev. 2104.

94 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.

95 AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. **Detalhe do produto:** zyvox. Brasília, 2005. Disponível em: :
<http://www7.anvisa.gov.br/datavisa/consulta_produto/rconsulta_produto_detalhe.asp>.
Acesso em: 20 fev. 2014.

96 JOHNSON, M. D.; DECKER, C. F. Antimicrobial agents in treatment of MRSA infections. **Disease a-Month**, v. 54, n. 12, p. 793 - 800. 2008.

97 BOUCHER, H.; MILLER, L. G.; RAZONABLE, R. R. Serious infections caused by methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. **Clinical Infectious Diseases**, v. 51, n. S2, p. S183- S197, 2010.

98 VAN HAL, S. J.; LODISE, T. P.; PATERSON, D. L. The clinical significance of vancomycin minimum inhibitory concentration in *Staphylococcus aureus* infections: a systematic review and meta-analysis. **Clinical Infectious Diseases**, v. 54, n. 6, p.755 - 771 2012.

- 99 TAVARES, W. **Manual de antibióticos e quimioterápicos anti-infecciosos**. 3. ed. São Paulo: Ed Atheneu. 2002. v. 1.
- 100 BEYER, D.; PEPPER, K. The streptogramin antibiotics: up-date on their mechanism of action. **Expert Opin Investig Drugs**, 1998. Disponível em: <<https://www.revistas.ufg.br/index.php/iptsp/article/view/2134>>. Acesso em 04 abr. 2014.
- 101 SOUZA, M. V.; REIS, C.; PIMENTA, F. C. Revisão sobre a aquisição gradual de resistência de *Staphylococcus aureus* aos antimicrobianos. **Revista de Patologia Tropical**, v. 34, n.1, p. 27 - 36, 2005.
- 102 LINA, G. et al. Distribution of genes encoding resistance to macrolides, lincosamides and streptogramins among staphylococci. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 43, n. 5, p. 1062 - 1066, 1999.
- 103 ELIOPOULOS, G. M.; SARAVOLATZ, I. D. Quinupristin-dalfopristin and linezolid: evidence and opinion. **Clinical Infectious Diseases**, v. 36, n. 4, p. 473 - 481, 2003
- 104 MAST, Y.; MOHLLEBEN, W. Streptogramins- two better than one. **International Journal of Medical Microbiology**, v. 304, n. 1, p. 44 - 50, 2014.
- 105 KEHOE, L. E. et al. Structural basis of Synercid® (quinupristin-dalfopristin) resistance in Gram-positive bacterial pathogens. **Journal Biology Chemistry**, v. 278, p. 29963 - 29970, 2003. doi: 10.1074/jbc.M303766200
- 106 UDO, E. E.; PEARMAN, J. W.; GRUBB, W. B. Genetics analysis of community isolates of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in Western Australia. **Journal of Hospital Infections**, v. 25, n. 2, p. 97 - 108, 1993.
- 107 KASAKOVA, S. V. et al. A clone of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* among professional football players. **New Journal of England Medicine**, v. 352, p. 468 - 475, 2005. doi: 10.1056/NEJMoa0428
- 108 AIELLO, A. E. et al. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* among US prisoners and military personnel: review and recommendations for future studies. **Lancet Infectious Diseases**, v. 6, n. 6, p. 355 - 341, 2006.
- 109 ADCOCK, P. M. et al. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in two child care centers. **Journal of Infectious Diseases**, v. 178, n. 2, p. 577 - 580, 1998.
- 110 CRUM, N. F. et al. Fifteen-year study of the changing epidemiology of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. **American Journal of Medicine**, v. 119, n. 11, p. 943 - 951, 2006.
- 111 RIBEIRO, A. et al. First report of infection with community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in South America. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 43, n. 4, p. 1985 - 1988, 2005.

- 112 STAM-BOLINK, E. M. et al. Spread of a methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* ST80 strain in the community of the northern Netherlands. **European Journal of Clinical Microbiology Infectious Diseases**, v. 26, n. 10, p. 723 - 727, 2007.
- 113 HUANG, Y. C. et al. Prevalence of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* nasal colonization among Taiwanese children in 2005 and 2006. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 45, n. 12, p. 3992 - 2995, 2007.
- 114 NIMMO, G. R.; COOMBS, G. W. Community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) in Australia. **International Journal of Antimicrobials Agents**, v. 31, n. 5, p. 401 - 410, 2008.
- 115 OTTER, J. A.; FRENCH, G. L. Community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains as a cause of healthcare-associated infection. **Journal of Hospital Infection**, v. 79, n. 3, p. 189 - 193, 2011.
- 116 TAVARES, A. et al. High prevalence of hospital-associated methicillin-resistant in the community in Portugal: evidence for the blurring of community-hospital boundaries. **European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases**, v. 32, n. 10, p. 1269 - 1283, 2013.
- 117 D'AGATA, E. M.C. et al. Modeling the invasion of community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* into hospitals. **Clinical Infectious Diseases**, v. 48, n. 3, p. 274 - 284, 2009.
- 118 OTTER, J. A.; FRENCH, G. L. Nosocomial transmission of community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: a emerging threat. **Lancet Infectious Diseases**, v. 6, n. 12, p. 753 - 755, 2006.
- 119 SHET, A. et al. Colonization and subsequent skin and soft tissue infection due to methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in a cohort of otherwise healthy adults infected with HIV type 1. **Journal of infectious Diseases**, v. 200, n. 1, p. 88 - 93, 2009.
- 120 POPOVICH, K. J. et al. Community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and HIV: intersecting epidemics. **Clinical Infectious Diseases**, v. 50, n. 7, p. 979 - 987, 2010.
- 121 TEIXEIRA, L. A.; LOURENÇO, M. C. S.; FIGUEIREDO, A. Emergence of a methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clone related to the Brazilian epidemic clone III::B:A causing invasive disease among AIDS patients in a Brazilian hospital. **Microbial Drug Resistance**, v. 4, n. 2, p. 393 - 399, 1996.
- 122 PANIS, C.; MATSUO, T.; REICHE, E.M.V. Nosocomial infections in human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) infected and AIDS patients: major microorganisms and immunological profile. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 40, n. 1, p. 155 - 162, 2009.
- 123 PADOVEZE, M. C.; TRABASSO, P.; BRANCHINI, M. L. M. Nosocomial infections among HIV-positive and HIV-negative patients in a Brazilian infectious diseases unit. **American Journal of Infection Control**, v. 30, n. 6, p. 346 - 350, 2002.

- 124 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.
- 125 MANN, C. M.; MARKHAM, J. L. A new method for determining the minimum inhibitory concentration of essential oils. **Journal of Applied Microbiology**, v. 84, n. 4, p. 538 - 544, 1998.
- 126 AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA-. **Descrição dos meios de cultura empregados nos exames microbiológicos: módulo IV**. Disponível em: <www.anvisa.gov.br/servicos/audite/manuais/.../mod_4_2004.pdf>. Acesso em: 4 nov. 2013.
- 127 PEACOCK, S. J. et al. Comparison of multilocus sequence typing and pulsed-field gel electrophoresis as tools for typing *Staphylococcus aureus* isolates in a microepidemiological setting. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 40, n. 10, p. 3764 - 3770, 2002.
- 128 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.
- 129 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 the spread of related strains. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 41, n. 4, p. 1574 - 1585, 2003.
- 130 MCDOUGAL, L. 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.
- 131 PEREZ-LOSADA, M. et al. Pathogens typing in genomics era: MLST and future of molecular epidemiology. **Infections, Genetics and Evolution**, v. 16, p. 38 - 53, 2013. doi:org/10.1016/j.meegid.2013.01.009
- 132 ENRIGHT, M. C. et al. Multilocus sequence typing for characterization of methicillin-resistant and methicillin-susceptible clones of *Staphylococcus aureus*. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 38, n. 3, p. 1008 - 1015, 2000.
- 133 STAPHYLOCOCCUS aureus database: multi locus sequence typing home page.: Disponível em:<<http://saureus.mlst.net/>>. Acesso em: 25 nov. 2013.
- 134 FEIL, E. J. et al. e BURST: 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.
- 135 DABUL, A. N.G.; CAMARGO, I. L. B. C. Clonal complexes of *Staphylococcus aureus*: all mixed and together. **FEMS Microbiology Letters**, v. 351, n. 1, p. 7 - 8, 2014.

136 GRUMANN, D.; NÜBEL, U.; BRÖKER, B. M. *Staphylococcus aureus* toxins – their functions and genetics. **Infection, Genetics and Evolution**, 2013. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1567134813000865>>. Acesso em: 30 mar. 2014.

137 SHADYABAD, A. H.; CRUM-CIANFLONE, N. F. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) infections among HIV-infected persons in the era of highly active antiretroviral therapy: a review of the literature. **HIV Medicine**, v. 13, n. 6, p. 319 - 332, 2012.

138 ASCHBACHER, R. et al. High clonal heterogeneity of Pantone Valentine leukocidin-positive methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains from skin and soft-tissue infections in the province of Bolzano, Northern Italy. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 39, n. 6, p. 522 - 525, 2012.

139 MAINARD, J. et al. Decreased teicoplanin susceptibility of methicillin-resistant strains of *Staphylococcus aureus*. **Journal of Infection Diseases**, v. 171, n. 6, p. 1646 - 1650, 1995.

140 ANDRADE-BAIOCCHI, S. et al. Endocarditis due to glycopeptide-intermediate *Staphylococcus aureus*: case report and strain characterization. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v. 45, n. 2, p. 149 - 152, 2003.

141 POGLIANO, J.; POGLIANO, N.; SILVERMAN, J. A. Daptomycin-mediated reorganization of membrane architecture causes mislocalization of essential cell division proteins. **Journal of Bacteriology**, v. 194, n. 17, p. 4494 - 4504 2012.

142 HAYDEN, M. K. et al. Development of daptomycin resistance in vivo in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 43, n. 10, p. 5285 - 5287, 2005.

143 TEIXEIRA, M. M. et al. Emergence of clonal complex 5 (CC5) methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) isolates susceptible to trimethoprim-sulfamethoxazole in a Brazilian hospital. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 45, n. 7, p. 637 - 643, 2012.

144 SILVA-CARVALHO M. C. et al. Emergence of multiresistant variants of community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* lineage ST1-SCCmec IV in 2 hospitals in Rio de Janeiro, Brazil. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v. 65, n. 2, p. 300 - 305, 2009.

145 CABOCLO, R. M. F. et al. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in Rio de Janeiro hospitals: dissemination of the USA400/ST1 and USA800/ST5 SCCmec type IV and USA100/ST5 SCCmec type II lineages in a public institution and polyclonal presence in a private one. **American Journal of Infection Control**, v. 41, n. 3, p. e21 - e26, 2013.

146 CAIAFFA-FILHO, H. H. et al. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* carrying SCCmec type II was more frequent than the Brazilian epidemic clone as a cause of nosocomial bacteremia. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v. 76, n. 4, p. 518 - 520, 2013.

- 147 PACHECO, R. L. et al. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) carriage in a dermatology unit. clinics (São Paulo). **Journal of Bacteriology**, v. 6, n. 12, p. 2071 - 2077, 2011.
- 148 MIMICA, M. J. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in Brazil. **New Microbiologica**, 2013. Disponível em: < http://www.newmicrobiologica.org/PUB/allegati_pdf/2013/1/107.pdf>. Acesso em: 23 mar. 2014.
- 149 DURAND, G. et al. Detection of new methicillin-resistant *Staphylococcus* clones containing the toxic shock syndrome toxin1 gene responsible for hospital and community-acquired infections in France. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 44, n. 3, p. 847 - 853, 2006.
- 150 BABA, T. et al. Genome and virulence determinants of high virulence community-acquired MRSA. **Lancet**, v. 39, n. 9320, p. 1819 - 1827, 2002.
- 151 ZARAKET, H. et al. Molecular characterization of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in hospitals in Niigata, Japan: divergence and transmission. **Journal of Microbiology Immunology**, v. 51, n. 2, p. 171 - 176, 2007.
- 152 MONK, A. B. et al. Genetic analysis of *Staphylococcus aureus* from intravenous drug users lesions. **Journal of Medical Microbiology**, v. 53, n. 3, p. 223 - 227, 2004.
- 153 URUSHIBARA, N.; KAWAGUCHIYA, M.; KOBAYASHI, N. Two novel arginine catabolic element and staphylococcal chromosome cassette *mec* composite islands in community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* genotypes ST5-MRSA-V and ST-5-MRSA-II. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 67, n. 8, p 1828 - 1834, 2012.
- 154 WILLIANMSON, D. A. et al. Clinical and molecular epidemiology of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in New Zeland:Rapid emergene of sequence type (ST5)-SCC*mec*-IV as the dominant community-associated MRSA clone. **Plos one**, 2013. Disponível em: < <http://www.plosone.org/article/info%3Adoi%2F10.1371%2Fjournal.pone.0062020>>. Acesso: em 20 dez. 2013.
- 155 EGHBARIA, S.; SCHINITSER, K.; DANIAL-FARRA, N. Molecular characterization of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolated from patients with hospital readmissions. **Journal of Clinical Microbiology**. 2014. Disponível em: <<http://jcm.asm.org/content/early/2014/01/23/JCM.03449-13.short>>. Acesso em: 3 fev. 2014.
- 156 ROSSINI, F. P. et al. Protocolo para descolonização de pacientes colonizados ou infectados por *Staphylococcus spp* multidroga por *Staphylococcus spp* multidroga resistentes (MDR). **Revista Qualidade HC**, p. 41 - 44, 2009.

ANEXO 1- DADOS DAS AMOSTRAS

(Amostras de profissionais foram nomeadas com as iniciais PAS e numeração destes foi feita iniciando com P)

Amostra	espécime	Dia/Internação	Coleta	nº paciente
61N	nasal	1 /1 ^a	25/08/2011	1
62N	nasal	8/1 ^o	01/09/2011	1
62S	saliva	8/1 ^a	01/09/2011	1
79N	nasal	1/1 ^a	09/09/2011	2
80N	nasal	7/1 ^a	15/09/2011	2
82N	nasal	7/1 ^a	15/09/2011	3
100N	nasal	7/1 ^a	04/10/2011	4
157N	nasal	1/2 ^a	26/11/2011	1
158N	nasal	8/2 ^a	03/12/2011	1
172N	nasal	8/1 ^a	10/12/2011	5
176N	nasal	8/1 ^a	10/12/2011	6
199N	nasal	1/1 ^a	01/01/2012	7
231N	nasal	1/1 ^a	03/02/2012	8
232N	nasal	10/1 ^a	13/02/2012	8
251N	nasal	1/1 ^a	13/02/2012	9
252N	nasal	5/1 ^a	17/02/2012	9
259N	nasal	1/1 ^a	19/02/2012	10
260N	nasal	8/1 ^a	26/02/2012	10
273S	saliva	1/1 ^a	15/03/2012	11
291N	nasal	1/1 ^a	24/03/2012	12
324S	saliva	7/1 ^a	07/05/2012	13
349N	nasal	1/1 ^a	06/06/2012	14
355N	nasal	1/1 ^a	10/06/2012	15
400N	nasal	7/1 ^a	08/08/2012	16
413N	nasal	1/ 2 ^a	16/08/2012	15
423N	nasal	1/1 ^a	27/08/2012	17
439N	nasal	1/ 1 ^a	03/09/2012	18
455S	saliva	1/1 ^a	08/10/2012	19
PAS04 N	nasal	1 ^a coleta	30/11/2011	P1
PAS23 N	nasal	1 ^a coleta	03/12/2011	P2
PAS 31 N	nasal	1 ^a coleta	06/12/2011	P3
PAS 63 N	nasal	2 ^a coleta	05/03/2012	P1
PAS65N	nasal	3 ^a coleta	11/10/2012	P1

Fonte :Elaborada pela autora.

ANEXO 2- RESULTADOS GERAIS

* = resistência em 48 horas

Amostra	espécime	Dia	Coleta	nºpaciente	PVL	SCCmec	ST	Pulsotipo	OXA	LNZ	TCP	TGC	QDA	DPC	VAN	Triagem	PAP	Hemólise
61N	nasal	1	25/08/2011	1	não	III	239	G	256	2	0,5	0,125	0,5	0,5	2	negativo	-	Υ
62N	nasal	7	01/09/2011	1	não	III	-	G	256	4	0,5	0,125	0,5	0,5	1	negativo	-	β
62S	saliva	7	01/09/2011	1	não	III	-	G	256	4	0,5	0,125	0,5	1	1	negativo	-	β
79N	nasal	1	09/09/2011	2	não	III	-	G	>256	4	0,5	0,125	0,5	0,5*	1	negativo	-	Υ
80N	nasal	7	15/09/2011	2	não	III	-	F1	>256	2	0,5	0,25	0,5	0,5	1	negativo	-	Υ
82N	nasal	7	15/09/2011	3	não	III	239	F1	256	4	0,5	0,25	0,5	0,5	2	negativo	-	β
100N	nasal	7	04/10/2011	4	não	V	-	J3	128	2	4	0,5	0,5	0,25	2	positivo	hVISA	β
157N	nasal	1	26/11/2011	1	não	III	-	F3	>256	4	0,5	0,125	0,5	0,5	1	negativo	-	β
158N	nasal	7	03/12/2011	1	não	III	-	F2	256	4	0,5	0,125	0,5	0,5	2	negativo	-	β
172N	nasal	7	10/12/2011	5	não	nd	-	J2	>256	2	16*	0,5	0,5	0,25	1	positivo	hVISA	β
176N	nasal	7	10/12/2011	6	não	nd	-	C2	128	2	16*	0,25	0,5	0,25	2	positivo	hVISA	β
199N	nasal	1	01/01/2012	7	sim	IV	-	A4	32	4	0,5	0,125	0,5	0,25	1	negativo	-	β
231N	nasal	1	03/02/2012	8	não	III	-	F2	256	4	0,5	0,125	0,5	1	1	negativo	-	β
232N	nasal	7	13/02/2012	8	não	III	-	F2	128	4	0,5	0,125	0,5	1	1	negativo	-	β
251N	nasal	1	13/02/2012	9	não	IV	5	A1	32	4	0,5	0,125	0,5	0,25	1	negativo	-	β
252N	nasal	7	17/02/2012	9	não	II	-	A1	16	4	0,5	0,125	0,25	0,25	1	negativo	-	β
259N	nasal	1	19/02/2012	10	não	IV	-	C3	128	4	0,5	0,5	0,5	0,5	2	negativo	-	β
260N	nasal	7	26/02/2012	10	não	IV	-	A2	16	4	1	0,125	0,5	0,25	1	negativo	-	β
273S	saliva	1	15/03/2012	11	sim	IV	30	I	32	4	0,5	0,125	0,25	0,5	2	negativo	-	β
291N	nasal	1	24/03/2012	12	não	IV	148	D	128	4	0,5	0,125	0,25	0,25	1	negativo	-	β
324S	saliva	7	07/05/2012	13	não	V	5	K	256	2	4	0,5	0,5	0,5	2	negativo	-	β
349N	nasal	1	06/06/2012	14	não	IV	-	A3	128	4	2	0,125	0,5	0,5*	1	negativo	-	β

Fonte: elaborada pela autora.

continua

Continuação

ANEXO 2- RESULTADOS GERAIS

Amostra	espécime	Dia	Coleta	nºpaciente	PVL	SCCmec	ST	Pulsotipo	OXA	LNZ	TCP	TGC	QDA	DPC	VAN	Triagem	PAP	Hemólise
355N	nasal	1	10/06/2012	15	não	V	5	C1	16	4	0,5	0,125	0,5	0,5	2	negativo	-	β
400N	nasal	7	08/08/2012	16	não	V	-	J3	128	2	8	0,5	0,5	0,5	2	negativo	-	β
413N	nasal	1	16/08/2012	15	não	V	-	C1	8	4	0,5	0,125	0,25	0,5	2	negativo	-	β
423N	nasal	1	27/08/2012	17	não	II	105	B1	256	4	0,5	0,5	0,5	0,5	2	negativo	-	β
439N	nasal	1	03/09/2012	18	não	IV	-	B2	16	4	1	0,125	0,5	0,25	1	negativo	-	β
455S	saliva	1	08/10/2012	19	não	II	-	A5	64	4	0,5	0,5	0,5	0,5	1	negativo	-	β
PAS04 N	nasal	1	30/11/2011	P1	não	II	105	E1	256	4	0,5	0,5	1	0,25	1	negativo	-	β
PAS23 N	nasal	1	03/12/2011	P2	não	IV	5	H	>256	4	0,5	0,25	0,5	0,5	2	negativo	-	Υ
PAS31 N	nasal	1	06/12/2011	P3	não	II	-	E2	>256	4	0,5	0,5	0,5	0,5	1	negativo	-	β
PA 63 N	nasal	1	05/03/2012	P1 P1	não	II	-	E1	>256	4	0,5	0,5	0,5	0,5	2	negativo	-	Υ β
PAS65N	nasal	1	11/10/2012		não	II	105	J1	128	4	1	0,5	0,5		2	negativo	-	

Fonte: elaborada pela autora.

ANEXO 3- DENDROGRAMA COM TODOS OS RESULTADOS

Fonte: Elaborada pela autora, utilizando softwater Bionumerics v.6.5.