UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
Programa de Pós-Graduação em Farmácia
Área de Análises Clínicas

Avaliação da funcionalidade do locus *accessory gene regulator*
(*agr*) em cepas de *Staphylococcus aureus* brasileiras com
suscetibilidade reduzida aos glicopeptídeos

John Anthony McCulloch

Tese para obtenção do grau de
DOUTOR

Orientador:
Profa. Dra. Elsa Masae Mamizuka

São Paulo
2006

John Anthony McCulloch

Avaliação da funcionalidade do locus *accessory gene regulator*
(*agr*) em cepas de *Staphylococcus aureus* brasileiras com
suscetibilidade reduzida aos glicopeptídeos

Comissão Julgadora
da
Tese para obtenção do grau de Doutor

Profa. Dra. Elsa Masae Mamizuka
orientador/presidente

1°. examinador

2°. examinador

3°. examinador

4°. examinador

São Paulo, _____ de _____.

À minha mãe, Annette McCulloch, exemplo que sempre seguirei.
Ao meu avô, o Eng. Carlos Alberto Pereira Duarte,
que me mostrou que ciência explica tudo,
sempre da forma mais bela e simples.

À Ana Paula, pela companhia de meia vida.
Às alegrias da minha vida:
Tasha, Samantha, Portia e Julie.

Agradecimentos

A Profa. Dra. Elsa Mamizuka, pela confiança, perseverança, amizade e paciência em sua orientação.

A Marina Barreira, minha estagiária, sempre ávida por informação, cuja disposição, paciência e inquietude científica foram capitais para o desenvolvimento de parte deste trabalho.

A Cristina, Juliana, Antônio Fernandes e Lucas, meus colegas do laboratório, que sempre me encorajaram em momentos turbulentos.

Aos meus colegas de laboratório, Patrícia Neves, Andyara, Nilton, Marco, José Antônio, Carol, Elisabeth, Renato, Ricardo, Priscila, Anna Paula e Gabriela pelo convívio sempre agradável.

Ao meu colega Geraldo Alécio de Oliveira, por ter me deixado a herança científica do seu trabalho pioneiro.

À Profa. Dra. Marina Martinez pelo convívio agradável de todos estes anos, e pelas oportunidades que sempre me ofereceu.

À Vanessa Naomi e Katia, técnicas do Centro de Estudo do Genoma Humano da USP, pela paciência com que receberam as minhas intermináveis amostras, nem sempre diluídas corretamente....

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), por ter acreditado na idéia do projeto e por ter investido em ciência básica de forma tão abrangente.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela bolsa de doutorado.

Ao National Center for Biotechnology Information (NCBI) por ter disponibilizado de forma tão ampla e democrática um mundo de informações essenciais a este trabalho e a tantos outros.

Estudo realizado com o apoio financeiro da Fundação de Amparo
à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP)
projeto nº 02/13904-0.

Resumo

O tratamento de infecções por *Staphylococcus aureus* tem sido problemático devido ao surgimento de cepas resistentes a múltiplos antibióticos. O antibiótico de escolha para o tratamento de infecções por *S. aureus* resistente a oxacilina é o glicopeptídeo vancomicina. Desde o primeiro isolamento de cepas com sensibilidade reduzida a vancomicina (VISA) em 1997, tem havido crescente preocupação com a disseminação da resistência a este antibiótico. Os mecanismos moleculares que levam à resistência de baixo nível a vancomicina ainda não foram elucidados. A detecção deste fenótipo na rotina de laboratório clínico é laboriosa, pois as técnicas disponíveis são de difícil execução e interpretação. Até agora, não há relato de transmissão horizontal de infecção por VISA, e todas as cepas com este fenótipo foram isoladas de pacientes que faziam o uso prolongado de vancomicina. Uma deficiência no locus regulador de genes acessórios (*agr*) foi postulado como fator de risco para a aquisição do fenótipo VISA por uma cepa sensível a este antibiótico. Para este estudo, foram selecionadas 47 cepas de *S. aureus*, com sensibilidades variadas a vancomicina, inclusive 5 cepas VISA isoladas no Brasil. Determinou-se nas cepas as concentrações inibitórias mínimas de vancomicina e oxacilina, a atividade hemolítica em ágar sangue de carneiro e de coelho, a capacidade de aderir ao poliestireno e o polimorfismo do locus *agr*. Determinou-se a integridade do locus *agr* por PCR-RFLP e sequenciamento de bases em 13 cepas representativas das 47 estudadas. A integridade do locus regulador acessório *sarA* também foi avaliada por sequenciamento de bases nestas 13 cepas. Foram escolhidas 18 cepas sensíveis a vancomicina com variadas características fenotípicas e estas foram submetidas à indução de resistência a vancomicina através da passagem seriada em concentrações crescentes deste antibiótico. A taxa de mutação que leva à capacidade de crescimento em 6 µg/mL de vancomicina foi avaliada em 8 cepas através de ensaios de flutuação. Não observou-se correlação entre a aquisição de resistência a vancomicina com as atividades hemolíticas ou capacidade de adesão das cepas. A maioria das cepas (82,9%) apresentou-se como pertencente ao grupo polimórfico *agr* I, inclusive as cepas VISA. Duas cepas não conseguiram ser induzidas à resistência a vancomicina. O tempo levado para a aquisição de resistência não se correlacionou com nenhuma característica fenotípica ou genotípica de um grupo de cepas. A taxa de mutação que leva à capacidade de crescimento em 6 µg/mL de vancomicina apresentou-se maior para uma cepa pertencente ao clone endêmico brasileiro (CEB) cujo locus *agr* pertence ao grupo I e não apresentou variação de acordo com funcionalidade ou tipo do locus *agr*. Apenas uma das cepas VISA apresentou uma mutação no locus *agr* que o torna disfuncional. Os loci *agr* das outras cepas estudadas apresentaram-se íntegros. O locus *sarA* das cepas estudadas apresentou-se íntegro e com polimorfismos funcionais agrupados de acordo com a linhagem clonal das cepas. Pôde-se concluir que a integridade funcional do locus *agr* não é uma condição *sine qua non* para a aquisição de resistência de baixo nível a vancomicina por parte de

uma cepa sensível a este antibiótico. O grupo polimórfico *agr* II não tem maior predisposição à aquisição de resistência de baixo nível a vancomicina, como havia sido sugerido por alguns trabalhos disponíveis na literatura.

Abstract

The treatment of staphylococcal infections has lately been a strenuous undertaking due to the resistance of *Staphylococcus aureus* to multiple antibiotics. The antimicrobial drug of choice for the treatment of methicillin resistant *S. aureus* (MRSA) is the glycopeptide vancomycin. Since the first isolation of *S. aureus* with reduced susceptibility to vancomycin (VISA) in 1997, there has been growing concern as to the dissemination of this resistance phenotype among isolates of this species. The molecular mechanisms that result in low level resistance to vancomycin have not yet been completely elucidated. The correct detection of this phenotype in the clinical laboratory is tricky, for the techniques available for this purpose are hard to execute and interpret. Until now, lateral transmission (dissemination) of VISA has not been reported and all strains bearing this phenotype have been isolated from patients who had been making prolonged use of vancomycin. A deficiency in the accessory gene regulator (*agr*) has been proposed as a risk factor for the acquisition of a VISA phenotype by a susceptible strain. For this study, 47 nosocomial VISA strains, that had been isolated in another study, were used. These strains were isolated from multiple geographical regions of Brazil, and included 5 VISA strains. The minimal inhibitory concentrations (MIC) of vancomycin and oxacillin, as well as haemolysis in sheep and rabbit agar, adhesion to polystyrene and *agr* polymorphism were determined in all of these strains. The integrity of the *agr* locus was determined by PCR-RFLP and by nucleotide sequencing in a sample of 13 strains chosen to be representative of the 47 strains studied. The integrity of the Staphylococcal accessory regulator *sarA* was also determined by nucleotide sequencing in these 13 strains. Another representative sample of 18 strains that were susceptible to vancomycin were submitted to induction of resistance to vancomycin by serial passage in increasing concentrations of this drug. The mutation rate of a mutation that leads to the ability of growing in a concentration of 6 µg/mL of vancomycin was determined for 8 strains by fluctuation assays. There was no correlation between the acquisition of resistance to vancomycin with either haemolysis or adhesion to polystyrene. Most strains (82.9%) bore a group I *agr* polymorphism, including all of the VISA strains. Two strains could not be induced to resistance. The time taken for each strain to acquire resistance to vancomycin did not correlate with any phenotypic or genotypic characteristic pertaining to a group of strains. The rate of mutation that leads to the ability of growing in 6µg/mL of vancomycin proved to be higher for a strain belonging to the Brazilian Endemic Clone (BEC) bearing an *agr* group I polymorphism, and did not vary according to presence or type of *agr* locus. Only one of the VISA strains presented a mutation in the *agr* locus that renders it dysfunctional. The *agr* loci of the other strains studied presented themselves to be intact. The *sarA* loci of the strains evaluated were intact however presented functional polymorphisms that were groups according to the clonal lineage of the strains. It can thus be concluded that the functional

integrity of the *agr* locus is not a *sine qua non* condition for the acquisition of low level resistance to vancomycin by a susceptible strain. Bearing of an *agr* group II polymorphism does not predispose a strain to acquire resistance to vancomycin, as has been previously suggested in literature.

SUMÁRIO

	Página
1. Introdução	01
1.1 Características microbiológicas da espécie <i>Staphylococcus aureus</i>	01
1.2 Importância clínica da espécie	02
1.3 Resistência aos antibióticos	03
1.3.1 Resistência à metilina	03
1.3.2 Tratamento de infecções por MRSA	04
1.3.3 Resistência à vancomicina	05
1.3.3.1 Surgimento da resistência à vancomicina	05
1.3.3.2 Mecanismo de resistência à vancomicina em <i>S. aureus</i>	07
1.3.3.2.1 Síntese da parede celular	07
1.3.3.2.2 Mecanismo de ação da vancomicina	10
1.3.3.2.3 Mecanismos de resistência à vancomicina	13
1.4 Papel do locus regulador de genes acessórios (<i>agr</i>) no surgimento da resistência à vancomicina	18
1.4.1 Arquitetura e funcionamento do locus <i>agr</i>	18
1.4.2 Efeito do locus <i>agr</i> sobre adesão	22
1.4.3 Papel do locus <i>agr</i> no surgimento da resistência à vancomicina	22
1.5 <i>SarA</i> e outros loci reguladores	25
2. Objetivos	31
3. Material e Métodos	32
3.1 Amostras bacterianas	32
3.2 Técnicas Fenotípicas	35

3.2.1 Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) de vancomicina	35
3.2.2 Determinação das propriedades hemolíticas das cepas	36
3.2.3 Avaliação da expressão de delta-hemolisina	40
3.2.4 Ensaio de adesão ao poliestireno	42
3.2.5 Indução de resistência à vancomicina em cepas sensíveis	43
3.2.6 Determinação da taxa de mutação que leva à resistência a vancomicina	45
3.3 Técnicas Genotípicas	51
3.3.1 Extração do DNA cromossômico das cepas	51
3.3.2 Determinação do grupo <i>agr</i> por PCR multiplex	52
3.3.3 Análise da integridade do locus <i>agr</i> por análise de polimorfismo de restrição (PCR-RFLP)	55
3.3.4 Sequenciamento de DNA	59
4. Resultados	62
4.1 Técnicas Fenotípicas	62
4.1.1 Determinação da CIM de vancomicina	62
4.1.2 Determinação das propriedades hemolíticas das cepas	64
4.1.3 Adesão ao poliestireno	66
4.1.4 Indução da resistência à vancomicina	67
4.1.5 Determinação da taxa de mutação que leva à capacidade de crescimento em 6µg/mL de vancomicina.	69
4.2 Técnicas genotípicas	71
4.2.1 Determinação do grupo <i>agr</i> por PCR.	71
4.2.2 PCR-RFLP do locus <i>agr</i>	73
4.2.3 Sequenciamento de DNA	74

4.2.3.1 Locus <i>agr</i>	74
4.2.3.2 Locus <i>sarA</i>	78
5. Discussão	81
5.1 Determinação da CIM de vancomicina	81
5.2 Determinação da capacidade hemolítica das cepas	83
5.3 Capacidade de adesão ao poliestireno	86
5.4 Indução <i>in vitro</i> da resistência à vancomicina	88
5.5 Determinação da taxa de mutação que leva à capacidade de crescimento em 6µg/mL de vancomicina.	90
5.6 Determinação do grupo <i>agr</i> por PCR	93
5.7 PCR-RFLP dos segmentos do locus <i>agr</i> .	94
5.8 Sequenciamento de DNA	94
6. Conclusões	98
7. Referências Bibliográficas	102

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

Abs	Absorbância
<i>agr</i>	Regulador de Genes Acessórios
AIP	Peptídeo Auto-Indutor
BHI	Infusão de Coração e Cérebro
BSAC	<i>British Society for Antimicrobial Chemotherapy</i>
CEB	Clone Endêmico Brasileiro
CIM	Concentração Inibitória Mínima
CLSI	<i>Clinical and Laboratory Standards Institute</i>
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
DP	Desvio Padrão
EDTA	Ácido Etileno-Diamino Tetra-Acético
hetero-VISA	<i>Staphylococcus aureus</i> com Resistência Heterogênea Intermediária a Vancomicina
MH	Müller-Hinton
MLST	Tipagem por Sequenciamento Multilocus
mRNA	Ácido Ribonucleico Mensageiro
MRSA	<i>Staphylococcus aureus</i> Resistente a Meticilina
MSSA	<i>Staphylococcus aureus</i> Sensível a Meticilina
n/a	Não se Aplica
NI	Não Informado

pb	Pares de Base
PBP	Proteína Ligadora da Penicilina
PBS	Solução Salina Fosfato-Tamponada
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase
PFGE	Eletroforese em Gel por Campo Pulsado
RFLP	Polimorfismo de Tamanho de Fragmento de Restrição
RNA	Ácido Ribonucléico
<i>sar</i>	Regulador Acessório Estafilocócico
SCC <i>mec</i>	Cassete Cromossômico Estafilocócico <i>mec</i>
Tris	Tris-hidroximetilaminometano (2-amino-2-(hidroximetil)propano-1,3-diol)
UF	Unidade Federal
UV	Ultra-violeta
VISA	<i>Staphylococcus aureus</i> com Resistência Intermediária a Vancomicina
VRSA	<i>Staphylococcus aureus</i> Resistente a Vancomicina
VSSA	<i>Staphylococcus aureus</i> Sensível a Vancomicina

LISTA DE SÍMBOLOS UTILIZADOS

∞	Infinito
m	Número de gerações celulares mutantes
m_{obs}	Número de gerações celulares mutantes observado
m_{ver}	Número verdadeiro de gerações celulares mutantes
N_0	Número Inicial de Células
N_F	Número Final de Células
N_G	Número Total de Gerações
P_0	Probabilidade de haver 0 mutações
r_m	Mediana do número de células mutantes de todas as culturas
T_M	Taxa de Mutação
z	Fator de diluição do inóculo no meio seletivo em relação ao volume da cultura

LISTA DE FIGURAS

	Página
Figura 1.1 – Dissacarídeo decapeptídeo.	09
Figura 1.2 – Ligação da vancomicina ao terminal D-alanil-D-alanina do pentapeptídeo através de pontes de hidrogênio.	11
Figura 1.3 – Dimerização da vancomicina.	12
Figura 1.4 – Estrutura e funcionamento do locus <i>agr</i> .	19
Figura 1.5 – Estrutura secundária do RNAIII.	21
Figura 1.6 – Arquitetura molecular do locus <i>sarA</i> .	27
Figura 3.1 – Curva de calibração para determinação do volume de sobrenadante a ser utilizado.	38
Figura 3.2 – Avaliação da expressão de delta-hemolisina.	41
Figura 3.3 – Local de anelamento dos iniciadores utilizados para a determinação do grupo <i>agr</i> na técnica de PCR multiplex.	53
Figura 3.4 – Mapa de anelamento de diversos iniciadores no locus <i>agr</i> .	56
Figura 3.5 – Mapa de anelamento de diversos iniciadores no locus <i>sarA</i> .	59
Figura 4.1 – Desempenho de cada cepa no estudo da indução da resistência à vancomicina.	68
Figura 4.2 – T_M obtida para cada cepa.	71
Figura 4.3 – RFLP da seção C do locus <i>agr</i> de cepas selecionadas usando a enzima <i>AluI</i> .	73
Figura 4.4 – Sequência de aminoácidos da proteína AgrB.	75
Figura 4.5 – Sequência de aminoácidos da proteína AgrB.	75

Figura 4.6 – Sequência de aminoácidos da proteína AgrC.	76
Figura 4.7 – Sequência de aminoácidos da proteína AgrA.	77
Figura 4.8 – Sequência de aminoácidos da proteína SarA.	78
Figura 4.9 – Sequência de DNA compreendida entre o início do promotor P2 e o início do gene <i>sarA</i>.	80

LISTA DE TABELAS

	Página
Tabela 1.1 – Principais sistemas reguladores de genes acessórios.	21
Tabela 1.2 – Efeitos dos sistemas <i>agr</i> e <i>sar</i> sobre a expressão de diversos genes.	29
Tabela 3.1 – Características das cepas clínicas utilizadas no estudo.	33
Tabela 3.2 – Cepas padrão utilizadas no estudo.	34
Tabela 3.3 – Características das cepas submetidas à indução <i>in vitro</i> da resistência à vancomicina.	43
Tabela 3.4 – Características das cepas submetidas ao cálculo da taxa de mutação que leva à capacidade de crescer em 6µg/mL de vancomicina por ensaio de flutuação.	48
Tabela 3.5 – Iniciadores utilizados para a determinação do grupo <i>agr</i> por PCR.	54
Tabela 3.6 – Características de cepas escolhidas para a análise de restrição do locus <i>agr</i> .	56
Tabela 3.7 – Iniciadores utilizados para a amplificação de segmentos do locus <i>agr</i> .	57
Tabela 3.8 – Iniciadores utilizados para a amplificação de segmentos do locus <i>sarA</i> .	59
Tabela 4.1 – Concentrações inibitórias mínimas de oxacilina e vancomicina das cepas usadas neste estudo.	63
Tabela 4.2 – Propriedades hemolíticas, resistência à vancomicina e linhagem das cepas usadas neste estudo.	65
Tabela 4.3 – Capacidade de adesão ao poliestireno expressa como absorbância do sobrenadante a 540nm.	66
Tabela 4.4 – Número de dias levados para crescer em uma concentração de 8µg/mL de vancomicina.	69

Tabela 4.5 – Distribuição do número de mutantes detectados no estudo de flutuação de cada cepa.	69
Tabela 4.6 – P_0 , N_G , m e T_M obtidos para cada cepa.	70
Tabela 4.7 – Grupo <i>agr</i> de cada cepa.	72

1. Introdução

O tratamento de infecções por *Staphylococcus aureus* sempre foi um problema para a clínica médica. Desde o advento da quimioterapia antibacteriana, *S. aureus* conseguiu tornar-se resistente a praticamente todos os agentes antimicrobianos já desenvolvidos (HIRAMATSU *et al.*, 2001).

1.1 Características microbiológicas da espécie *Staphylococcus aureus*

A espécie *Staphylococcus aureus* é um coco gram-positivo, catalase positiva, produtor de coagulase. O gênero *Staphylococcus* faz parte da família *Staphylococcaceae*, que inclui também os gêneros *Gamella*, *Macrococcus* e *Salinicoccus* (GARRITY, 2006). Todas as espécies do gênero *Staphylococcus* são produtoras da enzima catalase e se reproduzem por fissão binária em todos os planos espaciais. A divisão celular em vários planos espaciais resulta em um agrupamento das células bacterianas em conformações que lembram cachos de uvas, o que é característico e evidente especialmente quando as células são cultivadas *in vitro* e observadas por microscopia óptica (TRABULSI, 2004).

As espécies do gênero *Staphylococcus* conseguem prevalecer nos mais variados ambientes. São anaeróbias facultativas, conseguem crescer em meios hipertônicos (em concentrações de até 15% de NaCl), numa ampla gama de pHs (de 4,2 a 9,3) e em temperaturas entre 7°C e 48,5°C (LELOIR *et al.*, 2003).

A espécie *S.aureus* é produtora de inúmeros fatores de virulência,

dentre os quais estão a coagulase, a proteína A estafilocócica, desoxirribonucleases (DNAses), adesinas, hemolisinas e toxinas tal como a toxina da síndrome do choque tóxico (TSST-1) e as enterotoxinas estafilocócicas (SEs) (TRABULSI *et al.*, 2004).

1.2 Importância clínica da espécie

Apesar de ser encontrada com frequência (em aproximadamente 30% da população em geral) como parte da microbiota de indivíduos saudáveis (LINA *et al.*, 2003), esta espécie pode, em determinadas situações, causar uma ampla gama de infecções no ser humano. *Staphylococcus aureus* é um agente infeccioso de grande importância clínica, pois pode estar envolvido em inúmeras e diversas síndromes e infecções tanto em pacientes comunitários como hospitalizados. De acordo com o programa SENTRY, que monitora sensibilidade bacteriana aos antimicrobianos em vários centros de terapia (SADER *et al.*, 2004), na América Latina, entre janeiro de 1997 e dezembro de 2000, a espécie mais frequentemente isolada de infecções de corrente sanguínea foi *S. aureus*, representando 21,3% dos 7.207 isolados estudados. Durante o período de estudo, a prevalência de *S. aureus* como causa de infecção de corrente sanguínea aumentou de 20,5% em 1997 a 23,3% em 2000.

Esta espécie é particularmente um empecilho quando encontrada em infecções hospitalares, pois já conseguiu vencer praticamente todos os agentes antimicrobianos desenvolvidos desde o advento da quimioterapia antibacteriana (HIRAMATSU *et al.*, 2001).

1.3 Resistência aos antibióticos

1.3.1 Resistência à meticilina

Um dos marcos na terapia antiestafilocócica foi o surgimento do *Staphylococcus aureus* resistente à meticilina (MRSA), reportado por Jevons (1961). Os MRSA são resistentes a todos os antibióticos beta-lactâmicos pois expressam um receptor com baixa afinidade a estes antibióticos. Os antibióticos beta-lactâmicos se ligam a enzimas constitutivas das bactérias que participam da síntese da parede celular bacteriana, as proteínas ligadoras de penicilina (PBPs), e impedem o seu funcionamento. O MRSA tem a capacidade de sintetizar uma variante da PBP2, a PBP2a, que, apesar de manter a sua função fisiológica, tem baixa afinidade pelos antibióticos beta-lactâmicos (ITO *et al.*, 2003).

A antibioticoterapia contra infecções estafilocócicas é especialmente complicada quando a infecção é causada por uma cepa resistente à meticilina. As cepas de *Staphylococcus aureus* resistentes à meticilina são geralmente resistentes à maioria dos outros antibióticos normalmente disponíveis (CHAMBERS, 1997).

Isto ocorre porque o gene que codifica a proteína PBP2a, o gene *mecA*, juntamente com os seus genes reguladores, encontra-se em um elemento genético móvel, o Cassete Cromossômico Estafilocócico *mec* (SCC*mec*). Já foram descritos 5 tipos de SCC*mec*, que diferem entre si no número de genes que carregam e em sua arquitetura gênica (HIRAMATSU *et al.*, 2001). Alguns tipos de SCC*mec* contêm genes que determinam

resistência a outros grupos de antibióticos além dos beta lactâmicos, tal como macrolídeos, lincosaminas, estreptograminas, aminoglicosídeos e tetraciclina (ITO *et al.*, 2003). Assim, quando uma célula de *S. aureus* adquire estes SCCmec, ela de uma vez só adquire um fenótipo de multi-resistência a antibióticos.

1.3.2 Tratamento de infecções por MRSA

Devido à natureza multi-resistente de MRSA, o tratamento de infecções por este patógeno torna-se complicado devido ao número limitado de opções terapêuticas seguras. A opção terapêutica depende do perfil de sensibilidade a antibióticos de cada isolado, mas em geral, um glicopeptídeo é uma boa opção especialmente contra isolados que carregam o SCCmec tipo III, pois este é o que confere o fenótipo mais multi-resistente (REINERT, 2004). As cepas com SCCmec tipo IV são geralmente mais sensíveis aos antibióticos do que as cepas com outros tipos de SCCmec, e o seu tratamento pode ser feito com várias drogas comumente disponíveis no mercado (REINERT, 2004). Todavia, o SCCmec tipo III é o mais prevalente em infecções nosocomiais por MRSA no Brasil, portanto, a demanda por um glicopeptídeo nos casos destas infecções é alta. Até o momento, apenas dois antibióticos glicopeptídeos estão disponíveis no mercado brasileiro para uso humano: a vancomicina e a teicoplanina.

Novos antibióticos que atuam contra infecções por MRSA estão sendo lançados no mercado, ampliando portanto, as opções terapêuticas. Já foram comprovados ser eficazes contra MRSA a oxazolidinona linezolida (KIM *et*

al., 2004; STEVENS *et al.*, 2002), as estreptograminas sinérgicas quinupristina-dalfopristina (KIM *et al.*, 2004), os novos glicopeptídeos dalbavancina (JABÉS *et al.*, 2004) e telavancina (REYES *et al.*, 2006; STRYJEWSKI *et al.*, 2006), o lipopeptídeo daptomicina (AKINS *et al.*, 2001), e notavelmente, até mesmo um novo beta lactâmico, a cefalosporina ceftobiprol (BOGDANOVICH *et al.*, 2005).

Apesar do avanço na terapia anti-estafilocócica, de um ponto de vista de saúde pública, o problema da restrição terapêutica para infecções contra MRSA ainda persiste, uma vez que estes novos antibióticos estão longe de estarem disponíveis em todos os hospitais do Brasil, e além disso os seus custos são, por ora, proibitivos. Há ainda preocupação com o surgimento de cepas resistentes a estes antibióticos, considerando que foram lançados recentemente e, portanto, houve pouca exposição de bactérias a eles. De fato, já há descrição de resistência de *Staphylococcus aureus* à linezolida apenas 1 ano após o seu lançamento (TSIODRAS *et al.*, 2001) e à quinupristina-dalfopristina (LUH *et al.*, 2000).

A demanda por vancomicina nos casos de infecção por MRSA será considerável por algum tempo ainda, pelo menos até estes novos antibióticos tornarem-se ubíquos.

1.3.3 Resistência à vancomicina

1.3.3.1 Surgimento da resistência à vancomicina

Lançada no mercado no início da década de 1960, a vancomicina

vem sendo usada com sucesso no tratamento de infecções causadas por cocos Gram positivos, inclusive MRSA (MOELLERING, 1998). Todavia, o sentimento de confiança quanto ao sucesso da terapêutica com vancomicina foi rescindido com a descoberta de uma cepa de *Staphylococcus aureus* com resistência intermediária à vancomicina (VISA) por Hiramatsu *et al.* (1997), no Japão.

Nos anos subseqüentes, o isolamento de cepas VISA foi também relatado nos Estados Unidos, na França e na Coréia. (KIM *et al.*, 2000; PLOY *et al.*, 1998; ROTUN *et al.*, 1999; SIERADZKI *et al.*, 1999; SMITH *et al.*, 1999). No ano de 2001, foi relatado o isolamento de cepas VISA no Brasil por Oliveira *et al.* (2001), sendo o primeiro isolamento na América Latina. Neste estudo, foram isoladas várias cepas oriundas de pacientes diferentes, em um mesmo hospital, caracterizando um possível surto. Desde então, foi reportado apenas mais um isolamento de VISA no Brasil por ANDRADE-BAIOCCHI *et al.* (2003).

De acordo com as recomendações da *British Society for Antimicrobial Chemotherapy*, (BSAC, 1991), as cepas de *S. aureus* que apresentarem uma concentração inibitória mínima (CIM) de vancomicina $> 4 \mu\text{g/mL}$ deverão ser consideradas resistentes à vancomicina, uma vez que não respondem ao tratamento com a droga. Entretanto, o *Clinical and Laboratory Standards Institute* dos Estados Unidos (CLSI, 2006) determina que as cepas de *S. aureus* que apresentarem uma CIM de vancomicina entre 8 e $16 \mu\text{g/mL}$ são consideradas como tendo resistência intermediária à vancomicina (e devem portanto serem chamadas de VISA) e que apenas as cepas que

apresentarem uma CIM ≥ 32 $\mu\text{g/mL}$ são consideradas resistentes à vancomicina (devendo ser chamadas de VRSA).

Todavia, pacientes infectados por cepas que apresentam uma CIM ≥ 8 $\mu\text{g/mL}$ já não respondem ao tratamento com vancomicina (HIRAMATSU, *et al.*, 1997; KIM *et al.*, 2000; OLIVEIRA *et al.*, 2001; PLOY *et al.*, 1998; ROTUN *et al.*, 1999; SIERADZKI *et al.*, 1999; SMITH *et al.*, 1999), portanto, uma infecção por VISA é uma ocorrência preocupante.

1.3.3.2 Mecanismo de resistência à vancomicina em *S. aureus*

1.3.3.2.1 Síntese da parede celular

Os antibióticos glicopeptídeos inibem a formação da parede celular bacteriana através do impedimento de certas etapas da síntese de peptidoglicano. O peptidoglicano, também conhecido como mureína, é um polímero grande que é responsável por pelo menos 50% da massa da parede celular de bactérias Gram-positivas. A arquitetura do peptidoglicano confere à bactéria a sua forma e rigidez e possibilita a manutenção da alta pressão osmótica presente no citoplasma (GEISEL *et al.*, 2001).

Cadeias poliméricas de peptidoglicano são dispostas em várias camadas e são ligadas entre cadeias da mesma camada e entre cadeias de outras camadas. A síntese de peptidoglicano inicia-se no citoplasma, com a formação de UDP-N-acetilmuramilpentapeptídeo. Este composto é o ácido N-acetilmurâmico (um produto da transformação de N-acetilglicosamina)

ligado a um pentapeptídeo, composto pelos aminoácidos L-alanina, ácido D-glutâmico, L-lisina, D-alanina e D-alanina (GEISEL *et al.*, 2001, MOELLERING, 1998).

Estes aminoácidos são adicionados de forma específica, um a um, começando pela L-alanina, seguido de ácido D-glutâmico e L-lisina. A L-lisina é um diaminoácido, e portanto fica com um grupamento amino livre após a formação da ligação peptídica com os aminoácidos subsequêntes. Este terceiro aminoácido não é necessariamente sempre L-lisina, dependendo da espécie, pode ser outro diaminoácido (GEISEL *et al.*, 2001).

Os últimos dois aminoácidos do pentapeptídeo são adicionados de uma vez só. A L-alanina é isomerizada para D-alanina por uma racemase, e então é dimerizada em D-alanil-D-alanina. Esta D-alanil-D-alanina é adicionada à L-lisina para completar o pentapeptídeo.

Os próximos passos da síntese de peptidoglicano ocorrem ligados à membrana celular, na sua superfície interna. O N-acetilmuramilpentapeptídeo formado no citoplasma é ligado a um carreador lipídico transmembrânico undecaprenólico (lipídeo I).

Ainda ligado ao lipídeo I, porção ácido N-acetilmurâmico recebe N-acetilglicosamina, e o complexo agora é chamado de lipídeo II. A L-lisina do pentapeptídeo recebe uma cadeia de aminoácidos formada pela adição sucessiva de 5 glicinas, chamada de pentaglicina (figura 1.1).

Figura 1.1 - Dissacarídeo decapeptídeo (com uma pentaglicina e um pentapeptídeo). Esta é a unidade monomérica do peptidoglicano. Adaptado de Nagarajan (1994).

Este dissacarídeo com um pentapeptídeo e uma pentaglicina, ligado ao lipídeo II é translocado para a porção externa da membrana citoplasmática, onde então é polimerizado (GEISEL *et al.*, 2001). Esta reação é chamada de transglicolação.

A estrutura geral, todavia, ainda é pouco resistente à tração mecânica. A finalização da síntese de peptidoglicano é feita através da formação de ligações cruzadas pela transpeptidação dos terminais peptídicos (pentapeptídeo e pentaglicina), ligando as cadeias de peptidoglicano dentro de uma camada bem como entre outras camadas (GEISEL *et al.*, 2001).

A natureza da transpeptidação varia de acordo com a espécie de bactéria. Em *Staphylococcus aureus*, ela ocorre entre o grupo amino-terminal da cadeia pentaglicina e o quarto aminoácido do pentapeptídeo (D-alanina). A ligação peptídica original D-alanil-D-alanina do pentapeptídeo é rompida, liberando D-alanina, numa reação exotérmica, que financia a energia necessária para a transpeptidação.

Pode-se então considerar que a porção terminal D-alanil-D-alanina do pentapeptídeo é uma importante fonte de energia que possibilita a transpeptidação, uma vez que esta reação ocorre no meio externo, onde há carência de ATP ou outra fonte de energia disponível (GEISEL *et al.*, 2001).

É importante perceber que o processo de formação de peptidoglicano é dinâmico, em que ao mesmo tempo em que há síntese, há a atuação de enzimas que degradam o peptidoglicano formado conferindo plasticidade à megamolécula rígida que compõe a parede celular (CUI *et al.*, 2000).

A diferença entre o que é sintetizado e o que é degradado é que vai determinar se a bactéria está acumulando parede celular (quando a célula está em divisão ou crescimento) ou não.

1.3.3.2.2 Mecanismo de ação da vancomicina

Os antibióticos glicopeptídeos têm uma afinidade específica pelo terminal D-alanil-D-alanina do pentapeptídeo. São formadas pontes de hidrogênio entre o antibiótico e os aminoácidos. A figura 1.2 mostra a ligação entre a vancomicina e o terminal D-alanil-D-alanina.

O complexo formado é volumoso e impede a ação das enzimas envolvidas na transpeptidação e transglicolação do N-acetilmuramilpentapeptídeo. O resultado é que a síntese de peptidoglicano fica comprometida, o que leva ao enfraquecimento da parede celular, tornando a bactéria susceptível à lise (GEISEL *et al.*, 2001).

Figura 1.2 - Ligação da vancomicina ao terminal D-alanil-D-alanina do pentapeptídeo através de pontes de hidrogênio. Adaptado de Nagarajan (1994).

É importante notar que devido ao seu alto peso molecular, a vancomicina atua apenas do lado externo da célula bacteriana, não conseguindo penetrar até o citoplasma.

Diferentemente dos outros antibióticos que atuam na síntese da parede celular, o mecanismo de ação dos antibióticos glicopeptídeos é baseado no bloqueio de um substrato (D-ala-D-ala) ao invés do bloqueio de uma determinada enzima envolvida no metabolismo da parede. Os glicopeptídeos agem, portanto, por causar o impedimento estérico destas enzimas.

No caso específico da vancomicina, pode ocorrer a dimerização do antibiótico, que atua simultaneamente em duas cadeias pentapeptídicas quando estão alinhadas para a transpeptidação (figura 1.3).

Figura 1.3 - A vancomicina pode dimerizar-se (representado aqui pela elipse) e bloquear dois terminais D-alanil-D-alanina ao mesmo tempo. Adaptado de Nagarajan (1994).

Assim como os beta-lactâmicos, a vancomicina age como inibidor da síntese da parede celular da célula bacteriana, todavia por um outro mecanismo. A vancomicina age por impedimento estérico da enzima transglicosilase que transfere o precursor do peptidoglicano para a cadeia do peptidoglicano. Especificamente, a vancomicina liga-se à porção D-alanil-D-alanina do precursor peptidoglicano, impedindo a ação das enzimas transpeptidase e transglicosilase em seu substrato. O mecanismo de ação da vancomicina envolve portanto a inibição das enzimas transglicosilase e transpeptidase, envolvidas na síntese total do peptidoglicano da bactéria (NAGARAJAN, 1991).

1.3.3.2.3 Mecanismos de resistência à vancomicina

A prevalência da resistência à vancomicina em *Staphylococcus aureus* é muito menor do que em bactérias do gênero *Enterococcus* (SADER *et al.*, 2004). A resistência à vancomicina em bactérias do gênero *Enterococcus* dá-se devido à síntese de uma porção terminal do precursor do peptidoglicano diferente do normal. Ao invés da porção terminal usual D-alanil-D-alanina, a porção terminal em *Enterococcus sp.* resistente à vancomicina é o D-alanil-D-lactato (em *E. faecium* e *E. faecalis*), ou D-alanil-D-serina (em *E. gallinarum*, *E. casseliflavus* e *E. flavescens*). Estes terminais são codificados pelos genes *van*. O tropismo da vancomicina a estas porções terminais cai drasticamente em comparação ao tropismo por D-alanil-D-alanina, o que resulta numa ineficiência da vancomicina como agente antimicrobiano contra bactérias portadoras dos genes *van* (MOELLERING, 1998).

Como os genes *van* de *Enterococcus* encontram-se muitas vezes em elementos genéticos móveis, tal como o transposon Tn551, uma das maiores preocupações quanto ao futuro da terapia anti-estafilocócica é a disseminação destes genes para a espécie *S. aureus*. Noble *et al.* (1992) demonstrou que a passagem interespecífica de genes *van* entre *E. faecalis* e *S. aureus* é possível, pelo menos *in vitro*. Restava saber se esta transferência genética ocorreria *in vivo*.

As cepas que apresentam um fenótipo VISA (são intermediárias à vancomicina) têm a porção terminal D-alanil-D-alanina preservada (GEISEL *et al.*, 2001; HANAKI *et al.*, 1998; HIRAMATSU *et al.*, 1997; OLIVEIRA *et al.*,

2001), e ademais não são portadoras de qualquer gene *van* de *Enterococcus* (HANAKI *et al.*, 1998; HIRAMATSU *et al.*, 1997; OLIVEIRA *et al.*, 2001).

Todavia, no ano de 2002, foram isoladas 2 cepas clínicas de *S. aureus* que carregavam genes *van* de *Enterococcus* (CDC, 2002a; CDC, 2002b), e parecem ter surgido em eventos independentes, apesar de terem sido isoladas com uma diferença temporal de apenas 3 meses entre elas. Mais uma cepa portadora de genes *vanA* foi isolada no ano de 2004 (WHITENER *et al.*, 2004). Até agora, somente estas 3 cepas foram isoladas em pacientes clínicos mas teme-se que a prevalência delas aumente no futuro. Estas cepas são denominadas *Staphylococcus aureus* resistente a vancomicina (VRSA), por sua resistência de alto nível a vancomicina (as CIMs de vancomicina variam entre 32µg/mL e 1024 µg/mL) e também para que sejam diferenciadas das cepas de *S. aureus* intermediárias a vancomicina (VISA).

O mecanismo de resistência à vancomicina em *S. aureus* que leva a um fenótipo VISA, ou seja com uma CIM entre 3 e 15 µg/mL de vancomicina até hoje não foi completamente elucidado, mas postula-se que seja devido a ao esgotamento da vancomicina do meio, causado pelo engrossamento da parede celular e conseqüente aumento do número de sítios de ligação D-alanil-D-alanina (CUI *et al.*, 2000; GEISEL *et al.*, 2001; HANAKI *et al.*, 1998; OLIVEIRA *et al.*, 2001).

A resistência à vancomicina em *S. aureus* nem sempre é homogênea, podendo ocorrer o fenômeno de resistência heterogênea (hetero-resistência)

em algumas cepas. As cepas de *S. aureus* com resistência heterogênea à vancomicina (hetero-VISA) apresentam uma concentração inibitória mínima (CIM) de vancomicina $\leq 4\mu\text{g/mL}$, quando esta é medida por diluição em caldo ou por Etest, todavia, a cepa contém sub-populações de células que apresentam uma CIM $\geq 8\mu\text{g/mL}$, numa frequência de aproximadamente 10^{-6} ou mais células. Por estarem presentes em número muito reduzido, estas células não são detectadas em tubos com concentrações maiores que $2\mu\text{g/mL}$ de vancomicina em caldo, pois apesar de estarem presentes, não conseguem atingir número suficiente para turvar o caldo, o que torna a técnica de diluição em caldo inadequada para a detecção de hetero-VISA por ter uma sensibilidade muito baixa, de apenas 11% (WALSH *et al.*, 2001).

O isolamento de cepas hetero-VISA é bem mais frequente do que o de cepas VISA, e tem sido relatada por diversos autores, inclusive no Brasil, por Oliveira *et al.* (2001). Assim como com cepas VISA, a terapia com vancomicina em pacientes infectados por cepas hetero-VISA também resultou em falhas na resposta do paciente ao antimicrobiano (ARIZA *et al.*, 1999; GUERIN *et al.*, 2000; HIRAMATSU *et al.*, 1997; MARCHESE *et al.*, 2000; SOARES *et al.*, 2000; TRAKULSOMBOON *et al.*, 2001).

De acordo com as recomendações do CLSI (2006), a presença de VISA ou hetero-VISA deve ser investigada por meio da utilização de triagem em ágar BHI adicionado de $6\mu\text{g/mL}$ de vancomicina (ágar screening vancomicina) além da determinação da CIM em meio líquido ou disco difusão em ágar (HIRAMATSU, 1998; CLSI, 2006; TENOVER *et al.*, 1998, 2001). Uma alternativa à triagem em ágar screening vancomicina é a

determinação da CIM de vancomicina através da técnica de Etest tomando o cuidado de semear a amostra utilizando-se uma suspensão bacteriana igual à escala 2 de McFarland ao invés de uma suspensão igual à escala 0,5 (WALSH *et al.*, 2001).

A detecção sensível e específica de cepas de *S. aureus* com sensibilidade reduzida a glicopeptídeos é portanto trabalhosa porque requer métodos alternativos ou suplementares que fogem da rotina usual de um laboratório de microbiologia. A confecção de placas de BHI suplementadas com vancomicina é complicada uma vez que é necessário que cloridrato de vancomicina em pó esteja disponível no laboratório, o que nem sempre é o caso. Ademais, há outras dificuldades relacionadas a estas placas, como por exemplo a necessidade da incorporação do antibiótico no ágar a uma temperatura abaixo de 55°C e a possibilidade de armazenamento das placas por apenas algumas semanas - procedimentos que se não forem realizados corretamente podem invalidar o método porque abaixam a sua especificidade. Placas de ágar screening vancomicina não estão comercialmente disponíveis, o que obriga os laboratórios a confeccioná-las, caso as adotem em suas rotinas. A outra alternativa para identificar corretamente *S. aureus* com sensibilidade reduzida a glicopeptídeos é o Etest, cujo custo unitário é alto, chegando a ser proibitivo para certos laboratórios especialmente para os pequenos e com orçamento limitado em cidades brasileiras pequenas.

A identificação correta de um fenótipo VISA numa infecção por *S. aureus* prevê a falha da terapia anti-estafilocócica com vancomicina e

condena a terapia em curso, o que leva à necessidade da adoção de uma conduta terapêutica alternativa. Idealmente, o tratamento de infecções por MRSA com glicopeptídeos deve evitar ou minimizar o surgimento de redução na sensibilidade a glicopeptídeos por parte da cepa MRSA envolvida na infecção.

A elucidação do mecanismo de resistência à vancomicina em *Staphylococcus aureus* seria de suma importância para o direcionamento da conduta terapêutica em pacientes infectados por MRSA que farão uso de vancomicina, bem como auxiliaria no diagnóstico molecular precoce de VISA e hetero-VISA, cuja detecção é complexa, e apenas possível por técnicas fenotípicas. Um marcador genético confiável do fenótipo VISA traria facilidade e rapidez à sua identificação.

Inúmeros estudos com o objetivo de identificar quais eventos genéticos são responsáveis pela redução da sensibilidade à vancomicina já foram conduzidos, mas todos conseguiram apenas contribuir para o entendimento do mecanismo, e não elucidá-lo por completo. Fica evidente, através dos trabalhos descritos na literatura, que o mecanismo molecular de resistência à vancomicina em *S. aureus* não é tão simples tal como é em *Enterococcus*, e postula-se que vários genes estejam envolvidos (KURODA *et al.*, 2000).

1.4 Papel do locus regulador de genes acessórios (*agr*) no surgimento da resistência à vancomicina.

Um estudo publicado por Sakoulas *et al.* (2002), implica o

envolvimento da região *agr* (*accessory gene regulator*) de *Staphylococcus aureus* na emergência de cepas com sensibilidade reduzida à vancomicina.

1.4.1 Arquitetura e funcionamento do locus *agr*

O locus *agr* é um agrupamento de genes com atividade de *quorum-sensing*, constituída por dois operons que regulam a expressão de vários fatores de virulência. "*Quorum sensing*" é o nome dado ao mecanismo pelo qual uma bactéria consegue "perceber" o número de bactérias em seu meio, ou seja, a densidade celular do meio em que se encontra. Isto permite com que uma única célula reaja fenotipicamente de acordo com a fase de crescimento em que a cultura se encontra. O efeito *quorum sensing* é conseguido pela bactéria através da comunicação entre células presentes no mesmo ambiente, por meio de moléculas secretadas por uma célula e detectadas por outras, similar ao sistema endócrino em animais. *Quorum sensing* é importante em *Staphylococcus aureus* porque certas proteínas acessórias (tal como fatores de virulência) só devem ser expressas em determinadas fases de crescimento. A regulação da expressão de fatores de virulência em *Staphylococcus aureus* está intimamente ligada ao *quorum sensing* nesta bactéria.

O locus *agr* é composto por 2 operons divergentes, controlados pelos promotores P2 e P3. O operon cujo promotor é o P2 contém 4 genes: *agrA*, *agrB*, *agrC* e *agrD*. O operon cujo promotor é o P3 contém apenas o gene da δ -hemolisina, *hld* e o gene para um RNA mensageiro denominado RNAIII, que é o efetor do sistema *agr* (figura 1.4).

Os produtos dos genes *agrB* e *agrD*, respectivamente as proteínas AgrB e AgrD, se juntam formando um peptídeo auto-indutor (AIP). AgrC é uma proteína transmembrânica, com receptor para AIP. Quando AIP liga-se em AgrC, este fosforila a proteína AgrA, ativando-a (figura 1.4). A proteína AgrA fosforilada age como indutor dos promotores P2 e P3. O produto da transcrição do operon P3 é um RNA denominado RNAIII. O RNAIII é um mRNA que funciona como indutor ou repressor da transcrição de genes acessórios. Este mRNA nunca chega a ser traduzido a proteína, pois ele mesmo é o efetor a resposta do *agr*.

Figura 1.4 - Estrutura e funcionamento do locus *agr*.

Existem 4 polimorfismos conhecidos do locus *agr*, descritos por Ji *et al.* (1997), em que há variação nos genes *agrD*, *agrB* e *agrC*, que correspondem ao peptídeo auto-indutor e ao seu receptor transmembrânico, respectivamente, de forma que a ligação entre o AIP e a proteína AgrC é

específica para cada grupo alélico. Estes quatro grupos alélicos são denominados grupos *agr* I, II, III e IV. Quando há a ligação de um AIP de um grupo alélico no receptor AgrC de um outro grupo, o AIP não possui fator intrínseco e não transduz o sinal através da proteína AgrC, funcionando portanto, como um antagonista. Um AIP só é agonista para o seu próprio grupo alélico, de forma que bactérias de grupos *agr* diferentes interferem na regulação de proteínas acessórias uma com a outra.

O gene da δ -hemolisina, *hld*, está contido dentro do produto transcricional RNAIII, todavia, o RNAIII logo se enovela numa conformação não-traduzível (figura 1.5). Este RNAIII enovelado tem uma ação indutora sobre certos genes acessórios. Quais genes são estimulados pelo sistema *agr* e quais não são pode ser visto na tabela 1.1. Para que o gene da δ -hemolisina seja traduzido, o RNAIII se desenovela com o auxílio de algum co-fator ainda desconhecido e então retorna à sua conformação original.

Figura 1.5 - Estrutura secundária do RNAIII. Os nucleotídeos marcados em vermelho compõem o gene da delta-hemolisina (*hld*). Adaptado de NOVICK (2003).

Tabela 1.1 - Principais sistemas reguladores de genes acessórios. Adaptado de Novick (2003).

Nome do sistema	Descrição	Genes que regula o sistema
<i>Agr</i>	Sistema quorum-sensing com peptídeo auto-indutor extracelular.	Vide tabela 1.2
<i>SarA</i>	Fator de transcrição necessário para a expressão de RNAIII. Aumenta a expressão de alguns genes diretamente, independentemente de <i>agr</i> .	Vide tabela 1.2
<i>SarS</i>	Sistema análogo ao <i>sarA</i> .	Ativa a transcrição do gene <i>spa</i> e algumas outras proteínas de superfície.
<i>SarT</i>	Sistema análogo ao <i>sarA</i> .	Inibe a transcrição de <i>hla</i> e outras exoproteínas.
<i>SarR</i>	Sistema análogo ao <i>sarA</i> .	Aumenta a transcrição de <i>sarA</i> e <i>sarS</i> .
<i>Rot</i>	Fator de transcrição	Aumenta a transcrição de <i>hla</i> e outras exoproteínas.
<i>SaeRS</i>	Sistema de dois componentes independente de <i>agr</i> e <i>sar</i> .	Aumenta a expressão de <i>hla</i> , <i>hly</i> , <i>nuc</i> e <i>coa</i> (GOERKE <i>et al.</i> , 2005)
σ^B	Fator de transcrição ativado quando a célula entra em condições de estresse ambiental.	Aumenta a transcrição de <i>coa</i> , <i>sarA</i> , <i>sarS</i> e genes constitutivos envolvidos em metabolismo. Gertz <i>et al.</i> (2000)
<i>ArlRS</i>	Sistema de dois componentes dependente de <i>agr</i> e <i>sar</i> .	Aumenta a transcrição de autolisinas e reprime a expressão de exoproteínas (<i>hla</i> , <i>hly</i> , <i>spa</i> , <i>coa</i> e outras) bem como a adesão a poliestireno. Inibe a transcrição de RNAII e aumenta a transcrição de <i>sarA</i> . (FOURNIER <i>et al.</i> , 2000, 2001)

Em suma, o produto final da cascata do locus *agr* é o RNAIII. Um locus *agr* funcional acarreta, através do RNAIII, num aumento da transcrição dos genes de fatores de virulência secretados. O seu efeito sobre certos genes, em especial genes envolvidos em adesão ainda não é conhecido.

1.4.2 Efeito do locus *agr* sobre adesão

Foi postulado por Sakoulas *et al.*, 2002 que o produto final do sistema *agr*, o RNAIII, inibiria a transcrição de genes que expressam proteínas envolvidas na adesão da bactéria. O papel exato que o locus *agr* tem na regulação da adesão bacteriana ainda está para ser elucidado, mas sabe-se que cepas que têm uma mutação que leva à disfunção do locus *agr* apresentam uma maior facilidade de adesão ao poliestireno e à produção de biofilme (VOUNG *et al.*, 2000). Neste estudo, 78% das cepas com um locus *agr* disfuncional tinham a capacidade de produzir biofilme, contra apenas 6% de cepas com o locus *agr* intacto.

1.4.3 Papel do locus *agr* no surgimento da resistência à vancomicina

Em vários estudos (HANAKI *et al.*, 1998; HIRAMATSU *et al.*, 1997; OLIVEIRA *et al.*, 2001; ROTUN *et al.*, 1999; SIERADZKI *et al.*, 1999, SMITH *et al.*, 1999) observou-se que a emergência de cepas VISA e hetero-VISA estava associada não apenas a uma longa terapia com vancomicina, mas também com a presença de material plástico invasivo, tal como catéteres venosos, catéteres de diálise, *stents* e válvulas prostéticas do coração.

A formação de biofilme e a adesão ao plástico teriam um efeito protetor para a bactéria na presença de vancomicina, pois a concentração de antibiótico que atinge as células aderidas é menor do que concentração que atinge células soltas. Isto deve ocorrer porque as células agrupadas têm uma superfície exposta menor do que células livres e ainda podem estar totalmente protegidas por uma barreira de células que impede a penetração do antibiótico. As células aderentes podem usar catéteres, válvulas e outro material prostético como suporte. Estes objetos inanimados são utilizados com frequência em pacientes que recebem tratamento com vancomicina por período prolongado. Adicionalmente, cepas com um locus *agr* disfuncional tendem a secretar um menor número de fatores de virulência extracelulares (toxinas, hemolisinas), sendo, portanto, menos agressivas e talvez menos letais que as com sistema *agr* funcional, o que as leva a serem expostas por mais tempo a vancomicina dando tempo para o surgimento de tolerância e eventualmente resistência.

Sakoulas *et al.* (2002) observaram também que duas cepas de *Staphylococcus aureus* sensíveis a vancomicina (VSSA) geneticamente idênticas, exceto pelo locus *agr* - que era perfeitamente funcional em uma, mas não na outra - tinham capacidades de adesão diferentes ao poliestireno, sendo que a que tinha o locus *agr* defeituoso apresentava uma capacidade maior de aderir ao poliestireno. Fora a capacidade de adesão ao poliestireno, observou-se também que a cepa com o locus *agr* defeituoso apresentava uma maior tolerância à vancomicina e uma maior predisposição à emergência de hetero-resistência à vancomicina. Um locus *agr*

disfuncional poderia então ser um fator protetor em um meio com vancomicina e portanto ser o primeiro passo para o surgimento de resistência a este antibiótico.

O grupo alélico mais comum é o *agr* I, sendo que a maioria (92,1%) das cepas MRSA é pertencente ao grupo *agr* I. As cepas pertencentes ao grupo *agr* II representam apenas 4,2% das cepas clínicas de *Staphylococcus aureus* (VAN LEEWEN *et al.*, 2000), e no entanto, todas as cepas VISA e hetero-VISA do Japão e dos Estados Unidos pertencem ao grupo *agr* II, sugerindo que as cepas com este genótipo *agr* teriam uma predisposição maior a tornarem-se resistentes à vancomicina (SAKOULAS *et al.*, 2003). Moise-Broder *et al.* (2004) descreve que o tratamento de infecções por cepas do grupo *agr* II com vancomicina tem um sucesso bastante limitado, chegando a sugerir que infecções por cepas do grupo *agr* II não devem ser tratadas com vancomicina.

Com o sequenciamento do locus *agr*, por Sakoulas *et al.* (2002) observou-se que algumas cepas clínicas de VISA e hetero-VISA apresentaram mutações no locus *agr*, tornando-o inoperante. Um estudo do polimorfismo e da funcionalidade do locus *agr* ainda não foi feito nas cepas VISA e hetero-VISA isoladas no Brasil. Ao total, o nosso grupo de pesquisa possui 5 cepas VISA (as primeiras isoladas no Brasil) e mais 5 cepas hetero-VISA.

Apesar de muitos estudos estarem sendo realizados no mundo na tentativa de elucidar os principais mecanismos genéticos envolvidos no surgimento de *S. aureus* resistentes a vancomicina (VISA), pouco se sabe

até o momento, sobre os mecanismos genéticos exatos que levam à resistência de baixo nível à vancomicina através do espessamento da parede celular (CUI *et al.*, 2000). O presente estudo pretende encontrar informações que poderão trazer contribuições na elucidação deste mecanismo. Ademais, o estudo do locus regulador *agr* foi pouco estudado em cepas brasileiras, e a caracterização do seu polimorfismo e funcionalidade é importante para entender quais são as estratégias de controle de expressão de fatores de virulência destas cepas, bem como qual é a prevalência dos grupos alélicos.

1.5 *SarA* e outros loci reguladores

Os genes acessórios são regulados em *Staphylococcus aureus* não apenas pelo sistema *agr*, mas também por outros sistemas que interagem. Os principais sistemas reguladores de genes acessórios de *S. aureus* estão descritos na tabela 1.1, apresentada anteriormente.

A interação de todos estes sistemas reguladores entre si evidencia a complexidade da regulação de genes acessórios em *Staphylococcus aureus*. Ocorrem eventos de retroalimentação positiva e negativa que amplificam ou inibem sinais que levam a um determinado efeito fenotípico. De certa forma, pode se dizer que a um nível molecular estes sistemas competem entre si para regular um gene, uma vez que dois sistemas podem ter efeitos antagônicos sobre a transcrição de um único gene. Por exemplo, o sistema *agr* aumenta a expressão da alfa hemolisina (*hla*) em fase pós-exponencial, enquanto o sistema *Ar/RS* diminui a expressão do mesmo gene. A

expressão de RNAIII é retroalimentada pelo próprio sistema *agr*, todavia é inibida por *ArlRS*, que por sua vez aumenta a expressão de *SarA*, sendo inibida por *SarR*. A expressão da protease *ssp* é estimulada por *agr* e inibida por *sarA*. O nível de expressão de *ssp* é, portanto, uma resultante da quantidade de estimulação e inibição que este gene recebe por todos os sistemas reguladores que regem a sua expressão.

Dentre os sistemas reguladores, o sistema *sarA* é um dos mais estudados e um dos primeiros a serem descritos (CHEUNG *et al.*, 1992). O sistema *sarA* é composto por um único gene (*sarA*) que é transcrito a partir de 3 promotores, P1, P2 e P3, que resultam em 3 mRNAs distintos, chamados respectivamente *sarA*, *sarB* e *sarC* (figura 1.6). Todos os três transcritos contêm a ORF *sarA*, que é traduzida à proteína SarA (BAYER *et al.*, 1996). A proteína SarA é o efetor da resposta do sistema, inibindo ou aumentando a transcrição de vários genes (tabela 1.2). Como os genes *agrA*, *agrB*, *agrC* e *agrD* são positivamente regulados pelo locus *sarA*, pode-se dizer que as proteínas que são reguladas pelo locus *agr* têm a sua expressão exacerbada pelo locus *sarA*, desde que não seja uma proteína que seja diretamente regulada pela proteína SarA de forma antagônica à do RNAIII, tal como aureolisina (*aur*), lipase (*lip*) ou nuclease (*nuc*).

Figura 1.6 – Arquitetura molecular do locus *sarA* mostrando os promotores P1, P2 e P3 e os transcritos *sarA*, *sarB* e *sarC*.

Há controvérsias quanto à variação temporal da concentração de SarA na célula, mas por ser apenas um fator transcricional, a sua concentração não varia como uma consequência direta da densidade de células, como ocorre com o sistema *agr* que é *quorum-sensing*. Todavia, a transcrição de *sarA* a partir de cada promotor (P1, P2 ou P3) varia temporalmente ao longo do crescimento bacteriano (CHIEN *et al.*, 1998). A transcrição de *sarA* a partir do promotor P2 resulta num mRNA policistrônico contendo além do gene *sarA* duas ORFs, denominadas ORF3 e ORF4, cujos produtos não têm função completamente compreendida, mas parecem auxiliar a expressão de *sarA* promovendo ou a sua transcrição ou tradução, ou ambos (MANNA *et al.*, 2001).

A proteína SarA liga-se de forma dimérica aos seus alvos que são promotores de genes. Ao ligar-se a estes promotores, SarA pode aumentar ou diminuir a expressão do gene, o que depende do gene (tabela 1.2). SarA

liga-se à região intergênica compreendida entre os promotores P2 e P3 de *agr*, facilitando a transcrição de RNAII e RNAIII (CHIEN *et al.*, 1998).

Beenken *et al.* (2003) descreve que cepas de *S. aureus* com mutação no locus *sarA* têm menor predisposição a formar biofilme, ao contrário do que acontece com o locus *agr*, em que a perda de sua funcionalidade leva a uma maior predisposição à formação de biofilmes (VUONG *et al.*, 2001). O efeito que o sistema *sarA* imprime na formação de biofilme parece ser contraditório com o seu efeito na adesão das células. A proteína SarA aumenta a transcrição das adesinas *clfB*, *fnbA* e *fnbB* (tabela 1.2), todavia o aumento da formação de biofilme observado em cepas deficientes em SarA pode ser explicado por uma diminuição da expressão do operon *icaADBC* nestas cepas. O operon *icaADBC* codifica uma adesina polissacarídica intracelular que é implicada na formação de biofilme (BEENKEN *et al.*, 2003). A integridade do locus *sarA* em cepas VISA ainda não foi avaliada.

Como os eventos genéticos que levam ao desenvolvimento da resistência intermediária a vancomicina ainda não foram esclarecidos, pretendeu-se avaliar a influência dos sistemas reguladores de genes acessórios *agr* e *sarA* no surgimento da resistência a vancomicina, para que as alterações, se encontradas, sirvam de marcador molecular da resistência.

Tabela 1.2 – Efeitos dos sistemas *agr* e *sar* sobre a expressão de diversos genes.

Nome da proteína ou grupo de proteínas	Sigla do gene	Função	Efeito do <i>agr</i> na sua regulação	Efeito de <i>SarA</i> na sua regulação	Referência
Aureolisina	<i>aur</i>	Metaloproteinase	+	$_{ind\ agr}$	A, B
Clumping Factor B	<i>clfB</i>	Adesão	+	+	A
Fator ligador da fibronectina A	<i>fnbA</i>	Adesão	0	+	A, B
Fator ligador da fibronectina B	<i>fnbB</i>	Adesão	0	+	A, B
Glicerol ester hidrolase	<i>geh</i>	Lipólise	+	+	A
Alfa-hemolisina	<i>hla</i>	Hemólise	+	+	A
Delta-hemolisina	<i>hld</i>	Hemólise	+	+	A
Gama hemolisina	<i>hlgB, hlgC</i>	Hemólise	+	+	A
Lipase	<i>lip</i>	Lipólise	+	$_{ind\ agr}$	A
Serina proteases	<i>splA, splB, splD, splF</i>	Proteólise	+	$_{ind\ agr}$	A
V8 Protease	<i>sspC</i>	Proteólise	+	–	A, B
FemA	<i>femA</i>	Cross-link de parede celular na presença de <i>mecA</i>	0	+	A
FemB	<i>femB</i>	Cross-link de parede celular na presença de <i>mecA</i>	+	0	A
UTP-glicose-1-fosfato uridiltransferase	<i>gtbB</i>	Produz substrato para síntese de parede celular	+	0	A
Glicosil-glicerofosfato transferase	<i>tagF</i>	Produz substrato para síntese de parede celular	0	+	A
Undecaprenil difosfato sintetase	<i>uppS</i>	Produz substrato para síntese de parede celular	0	+	A
Autolisina	<i>atl</i>	Autólise de parede celular	0	–	A
Proteína Ligadora de Penicilina 3	<i>pbp3</i>	Síntese de parede celular	0	–	A
Agr	<i>agrA, agrB, agrC, agrD</i>	Quorum sensing promotor de RNAIII	+	+	A, B
DNA girase	<i>gyrA</i>	Replicação de DNA	–	0	A
Proteína A estafilocócica	<i>spa</i>	Evasão do sistema imune	–	$_{ind\ agr}$	A
Nuclease	<i>nuc</i>	Lise de ácidos nucléicos	+	$_{ind\ agr}$	A, B
Enterotoxinas B, C e D	<i>seb, sec, sed</i>	Toxinfecção alimentar	+	0	B
Exfoliatinas A e B	<i>eta, etb</i>	Síndrome da pele escaldada	+	0	B
TSST-1	<i>tst</i>	Síndrome do choque tóxico	+	0	B
Leucocidina Pantón-Valentine	<i>lukS</i>	Leucólise	+	0	B
Polissacarídeos capsulares 5 e 8	<i>cap5, cap8</i>	Evasão da fagocitose	+	+	B

+ = aumenta a expressão; – = diminui a expressão; $_{ind\ agr}$ = aumenta a expressão independente de *agr*; $_{ind\ agr}$ = diminui a expressão independente de *agr*; 0 = não tem efeito sobre; A = Dunman *et al.* (2001); B = Novick (2003) .

O maior problema da resistência de baixo nível a vancomicina em *Staphylococcus aureus* é a sua dificuldade de detecção na rotina de um laboratório clínico. Como a resistência intermediária a vancomicina ocorre ao longo da terapia com este antibiótico (não há relatos de aquisição horizontal de VISA), o sucesso ou falha da terapia depende da probabilidade da cepa tornar-se resistente à droga *in vivo*, na vigência da terapia.

O fenótipo VISA, ao contrário do fenótipo VRSA, não é causado pela aquisição de um gene ou conjunto de genes transferidos de outra bactéria em elemento genético móvel, mas ocorre devido à ocorrência de mutação em (provavelmente) diversos genes que resulta no espessamento da parede celular da bactéria.

Não se sabe (apenas se especula) se determinado grupo de cepas tem uma predisposição para a aquisição de resistência a vancomicina. Postula-se que cepas com deficiência no sistema *agr* tenham vantagem seletiva na aquisição de resistência, e por este motivo, a funcionalidade deste locus foi avaliada em cepas VISA neste estudo.

A medida da taxa de mutação que leva a resistência a vancomicina permite a avaliação quantitativa da probabilidade de uma cepa tornar-se resistente a vancomicina, e ao comparar as taxas de mutações obtidas por diversas cepas, verificar-se-ia se ocorre predisposição de algum tipo de cepa.

2. Objetivos

- a) Desenvolver um método quantitativo para medir a capacidade de hemólise de uma cepa.
- b) Avaliar a capacidade de adesão ao poliestireno e a atividade hemolítica de cepas VISA, hetero-VISA e MRSA brasileiras isoladas de pacientes hospitalizados por meio de ensaios fenotípicos.
- c) Caracterizar o locus *agr* de cepas VISA, hetero-VISA e MRSA brasileiras isoladas de pacientes hospitalizados quanto ao seu grupo alélico.
- d) Avaliar a integridade física dos loci *agr* e *sarA* de algumas cepas representativas.
- e) Observar as características fenotípicas e genotípicas a serem estudadas nos itens a, b e c em cepas inicialmente sensíveis à vancomicina induzidas à resistência.
- f) Medir a taxa de mutação que leva à capacidade de crescimento em 6 µg/mL de vancomicina.

3. Material e Métodos

3.1 Amostras bacterianas

Com o intuito de caracterizar a arquitetura gênica do sistema *agr* do maior número de cepas de *S. aureus* com características fenotípicas diferentes, foram escolhidas 47 cepas isoladas de locais geográficos distintos, de linhagens diversas, com concentrações inibitórias mínimas (CIMs) de vancomicina e de oxacilina diferentes e que causam síndromes variadas em humanos.

Para tal, foram escolhidas cepas MRSA isoladas das mais diferentes infecções nosocomiais, oriundas de estados brasileiros diferentes, pertencentes a diversas linhagens (previamente determinado por eletroforese de campo pulsado). As cepas foram obtidas da coleção de bactérias de nosso laboratório (Laboratório de Referência Nacional para Fagotipagem de *Staphylococcus aureus*). Estas cepas têm um prefixo "R" ou "T" em seus nomes. Também foram selecionadas cepas que fazem parte da coleção oriunda do estudo de resistência à vancomicina elaborado por Oliveira *et al.* (2000), no qual foram isoladas cepas com resistência de baixo nível e hetero-resistência à vancomicina (prefixos VISA e HVISA, respectivamente). As características das cepas clínicas utilizadas neste estudo estão descritas na tabela 3.1. Além destas cepas, foram utilizadas, como referência em provas fenotípicas e genotípicas, sete cepas padrão cujas características e referências estão descritas na tabela 3.2.

Tabela 3.1 - Características das cepas clínicas utilizadas no estudo.

n	Cepa	Linha- gem PFGE	Tipo de SCCmec	Material de isolamento	Enfermaria	Hospital
1	VISA01	A	III	Biópsia de tecido queimado	Queimados	SP5
2	VISA03	A	III	Biópsia de tecido queimado	Queimados	SP5
3	VISA05	A	III	Biópsia de tecido queimado	Queimados	SP5
4	VISA07	A	III	Exsudato de ferida cirúrgica	Queimados	SP5
5	VISA15	A	III	Biópsia de tecido queimado	Queimados	SP5
6	HVISA026	A	III	Sangue	NI	SP5
7	HVISA027	A	III	Sangue	NI	SP5
8	HVISA135	A	III	Ponta de Cateter	NI	SP5
9	HVISA138	A	III	Sangue	NI	SP5
10	HVISA139	A	III	Biópsia de tecido queimado	NI	SP5
11	R009	A	III	Medula Óssea	NI	SP2
12	R014	A	III	Abcesso	Ortopedia	SP2
13	R016	A	III	Secreção subclavicular	Clínica Médica	RS2
14	R020	A	III	Escarro	Clínica Médica	RS2
15	R021	K	III	Secreção de cateter	Pediatria	RS2
16	R035	J	IV	Abcesso Umbigo	Pediatria	SP3
17	R036	A2	III	Abcesso	Ortopedia	SP3
18	R050	A5	III	Aspirado traqueal	Geriatrics	RS1
19	R063	L	IV	Secreção de Ferida Cirúrgica	Pediatria	PE1
20	R079	A	III	Secreção de Ferida Cirúrgica	CTI	MS1
21	R093	A	III	Sangue	Clínica Médica	MG1
22	R106	A	III	Ponta de Cateter	Clínica Cirúrgica	SC1
23	R128	A	III	Secreção de dreno torácico	NC	PA1
24	R130	A	III	Lesão Vulvar	NC	PA1
25	R137	F	III	NI	NI	AL1
26	R153	A	III	Cateter Subclavicular	Cirurgia Geral	PR1
27	R156	A1	III	Sangue	CTI	PR1
28	R157	A	III	Líquor	NI	PR1
29	R161	A	III	Secreção Abdominal	Pronto Socorro	AM1
30	R181	A	III	Secreção de Cotovelo	CTI	AM1
31	R191	A	III	Ponta de Cateter	NI	SP1
32	R222	D	IV	Líquido pleural	Cirurgia Torácica	SP4
33	R229	E	III	Ponta de Cateter	Gastroenterologia	SP4
34	R257	I1	III	Cavidade Abdominal	Clínica Cirúrgica	1ES
35	R266	I	III	Secreção ocular	CTI	ES1
36	R267	I	III	Secreção ocular	Berçário	ES1
37	R277	A	III	Secreção peritoneal	Centro Cirúrgico	SC2
38	R401	B	III	Aspirado de cânula traqueal	Clínica Médica	DF2
39	R416	A	III	Líquor	Pediatria	DF3
40	T047	NI	N/A	Líquor	NI	SP6
41	T116	NI	N/A	Líquido pleural	NI	SP6
42	T224	NI	N/A	Líquido pleural	NI	SP6
43	T453	NI	N/A	Líquor	NI	SP6
44	T482	NI	III	Líquido pleural	NI	SP6
45	T498	NI	III	Portador nasal	NI	SP6
46	T511	NI	III	Portador nasal	NI	SP6
47	T551	NI	III	Portador nasal	NI	SP6

N/A = Não se aplica por não possuir o SCCmec; NI = Não informado.

Tabela 3.2 - Cepas padrão utilizadas no estudo.

Cepa	Características	Origem	Referência
N315	Cepa MRSA padrão. O seu genoma já foi seqüenciado por completo e publicado. Cepa pertencente ao grupo agr II. [Cepa gentilmente cedida pelo Prof Keiichi Hiramatsu da Universidade Juntendo de Tóquio].	Japão	KURODA <i>et al.</i> (2001) Genebank Accession number: NC_002745
Mu3	Cepa hetero-VISA padrão. [Cepa gentilmente cedida pelo Prof. Keiichi Hiramatsu da Universidade Juntendo de Tóquio].	Japão	HIRAMATSU <i>et al.</i> (1997)a
Mu50	Cepa VISA padrão. Foi a primeira cepa com este fenótipo isolada no mundo. O seu genoma já foi seqüenciado por completo e publicado. [Cepa gentilmente cedida pelo Prof. Keiichi Hiramatsu da Universidade Juntendo de Tóquio].	Japão	KURODA <i>et al.</i> (2001) Genebank Accession number: NC_002758
ATCC 25923	Cepa de <i>S. aureus</i> padrão do American Type Culture Collection (ATCC). É utilizada como controle de qualidade na determinação da concentração inibitória mínima de vários antibióticos de acordo com o NCCLS. Cepa pertencente ao grupo agr III.	Estados Unidos	CLSI (2006)
RN6607	Cepa sensível a antibióticos protótipa de agr funcional. Cepa pertencente ao grupo agr II. Cepa gentilmente cedida pelo Prof. Richard Novick da Universidade de Nova York.	Estados Unidos	SAKOULAS <i>et al.</i> (2002)
RN9120	Cepa geneticamente modificada. Derivada a partir da deleção do locus agr de RN6607 (agr::tetM). Cepa gentilmente cedida pelo Prof. Richard Novick da Universidade de Nova York.	Estados Unidos	SAKOULAS <i>et al.</i> (2002)
RN4420	Cepa que produz uma zona de hemólise sem a interferência das hemolisinas α ou δ de <i>S. aureus</i> . Cepa gentilmente cedida pelo Prof. Richard Novick da Universidade de Nova York.	Estados Unidos	SAKOULAS <i>et al.</i> (2002)

3.2 Técnicas Fenotípicas

3.2.1 Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) de vancomicina

Algumas cepas de *Staphylococcus aureus* expressam resistência heterogênea à vancomicina. Este fenômeno, também chamado de *hetero-resistência*, é caracterizado pela presença de uma sub-população de bactérias que apresenta uma concentração inibitória mínima (CIM) maior do que a da grande maioria da população. As cepas de *S. aureus* hetero-resistentes à vancomicina (hetero-VISA) apresentam uma $CIM \leq 4 \mu\text{g/mL}$ quando medida através das técnicas comumente usadas na rotina de um laboratório clínico (macrodiluição em caldo, disco-difusão, Etest e técnicas automatizadas), todavia as cepas hetero-VISA contêm sub-populações de células com CIMs maiores do que a maioria da população (GEISEL *et al.*, 2001).

Para se detectar as células que têm uma CIM mais alta que a CIM majoritária, é necessário determinar a concentração inibitória mínima em meio sólido. Assim, em meios com concentrações mais altas do antibiótico, uma única célula que ainda esteja viável nesta concentração de antibiótico poderá ser visualizada, pois se tornará uma colônia visível a olho nu.

Para a determinação da concentração inibitória mínima de vancomicina de todas as cepas utilizadas no estudo foi utilizada a técnica da diluição em ágar BHI (HIRAMATSU *et al.*, 1997a) e diluição em ágar MH (CLSI, 2006). Estas técnicas ainda têm a vantagem de permitir o inóculo de

múltiplas cepas em uma única placa grande, o que retorna uma quantidade grande de resultados por lote de placas.

Estas técnicas consistem no inóculo de uma suspensão de 5×10^5 células em placas com ágar BHI ou ágar MH suplementados com concentrações finais crescentes de vancomicina. As concentrações finais de vancomicina em cada placa foram: 0 $\mu\text{g/mL}$; 0,5 $\mu\text{g/mL}$; 1,0 $\mu\text{g/mL}$; 1,5 $\mu\text{g/mL}$; 2,0 $\mu\text{g/mL}$; 4,0 $\mu\text{g/mL}$; 8,0 $\mu\text{g/mL}$; 12,0 $\mu\text{g/mL}$; 16 $\mu\text{g/mL}$; 24 $\mu\text{g/mL}$ e 32 $\mu\text{g/mL}$, tanto para o meio MH como BHI. As placas foram incubadas a 37°C por 48 horas.

As concentrações inibitórias mínimas de oxacilina também foram determinadas por diluição em ágar, usando ágar MH suplementado com 4% de NaCl, de acordo com as recomendações do CLSI (CLSI, 2006). As concentrações finais de oxacilina em cada placa foram: 0 $\mu\text{g/mL}$; 1,0 $\mu\text{g/mL}$; 2,0 $\mu\text{g/mL}$; 4,0 $\mu\text{g/mL}$; 8,0 $\mu\text{g/mL}$; 16 $\mu\text{g/mL}$; 32 $\mu\text{g/mL}$; 64 $\mu\text{g/mL}$; 128 $\mu\text{g/mL}$; 256 $\mu\text{g/mL}$ e 512 $\mu\text{g/mL}$. As placas foram incubadas a 35°C por 48 horas.

A concentração inibitória mínima de uma determinada cepa foi considerada como sendo a menor concentração de antibiótico em que a cepa não apresentou crescimento.

3.2.2 Determinação das propriedades hemolíticas das cepas

Uma das maneiras de se avaliar o poder hemolítico de uma cepa é através da observação do padrão hemolítico produzido pela cepa em ágar sangue de carneiro a 5%, como foi executado por Sakoulas *et al.* (2002).

Através desta técnica, o tamanho da zona de hemólise produzida ao redor de uma colônia é considerado proporcional à propriedade hemolítica da cepa. Todavia, após executar esta técnica repetidas vezes com as cepas, sentimos que esta não era adequada, uma vez que não é quantitativa (não retorna um valor numérico proporcional ao poder hemolítico), é subjetiva (sujeita ao viés de cada observador), e ainda apresentou-se pouco reprodutível.

Decidimos então desenvolver uma outra técnica para avaliar a atividade hemolítica, que pudesse traduzir esta atividade para um valor numérico que quantificasse a hemólise. O princípio da técnica desenvolvida é a exposição de uma suspensão de hemácias às hemolisinas produzidas por uma determinada cepa, e a subsequente avaliação da hemólise resultante por meio da determinação da absorbância espectrofotométrica do sobrenadante da suspensão. Desta forma, quanto mais hemácias forem lisadas no ensaio, maior será a concentração de hemoglobina no sobrenadante após centrifugação da suspensão de hemácias e, portanto, maior será a absorbância do sobrenadante a 540nm.

No entanto, de acordo com a lei de Lambert-Beer, a absorbância de uma solução de um determinado analito não aumenta de forma diretamente proporcional com a sua concentração, uma vez que acima de uma absorbância de valor 2 a relação não é mais linear. Para determinar qual a quantidade de sobrenadante de cultura (que contém a beta-hemolisina) que deveria ser inoculada na suspensão de hemácias, foi montada uma curva de calibração (figura 3.1) usando-se diferentes volumes de sobrenadante de

cultura da cepa ATCC25923. O volume do sobrenadante de cultura escolhido para ser adicionado a cada suspensão de hemácias foi aquele que causou a maior quantidade de hemólise, mas que a absorbância fosse menor do que 2,0 a um comprimento de onda de 540nm. Assim escolheu-se o maior volume que resultasse numa hemólise na porção ainda linear da curva de calibração. Este volume foi de 6 μ L para 1 mL de suspensão de hemácias a 3%.

Figura 3.1 - Curva de calibração para determinação do volume de sobrenadante a ser utilizado.

Cada amostra bacteriana analisada foi inoculada em 3 mL de caldo Infusão de Coração e Cérebro (BHI). O inóculo foi igual para todas as amostras, para garantir que as condições iniciais de crescimento fossem idênticas, a turbidez de cada tubo sendo inicialmente igual à de uma escala 0,5 de McFarland. Os tubos foram incubados a 37° por 24 horas com agitação constante, para que as cepas atingissem a fase estacionária de

crescimento, onde começam a ser produzidas as enzimas extracelulares e as toxinas.

Os tubos foram então centrifugados a 4000 x g por 10 minutos para separar as células bacterianas do sobrenadante, que por sua vez contém em solução as hemolisinas produzidas. Uma alíquota de 500 μ L do sobrenadante foi então separada para fazer o ensaio.

Uma suspensão de hemácias de carneiro desfibrinadas e lavadas, a uma concentração de 3% em PBS estéril foi distribuída em volumes de 1 mL em microtubos tipo eppendorf. A cada tubo foi adicionada uma alíquota de 6 μ L de sobrenadante de cultura uma determinada cepa. Os tubos foram então incubados a 37°C por duas horas, para que as hemolisinas (se presentes) fizessem efeito sobre as hemácias. Os tubos foram centrifugados a 3000 x g por 3 minutos para precipitar as hemácias ainda intactas.

A absorbância do sobrenadante da suspensão de hemácias após hemólise foi determinada por espectrofotometria a 540nm. Este comprimento de onda foi escolhido por ser o comprimento de onda em que há a máxima absorbância de luz pela hemoglobina. O espectrofotômetro foi calibrado a 0% de absorbância com o sobrenadante de uma suspensão de hemácias inoculada somente com meio de cultura. Quanto mais hemácias forem lisadas, maior será a concentração de hemoglobina dissolvida no sobrenadante, e portanto, maior será a absorbância do mesmo a 540nm. A cepa de *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, uma cepa padrão comumente utilizada na rotina de microbiologia clínica para ensaios que envolvem hemólise em sangue de carneiro (como por exemplo o CAMP-test) foi

escolhida como cepa padrão e a quantidade de hemólise produzida por esta cepa foi arbitrariamente tomada como referência e considerada como sendo produtora de 100% de hemólise. A hemólise produzida pelas demais cepas foi expressa como porcentagem de hemólise apresentada pela cepa padrão ATCC25923. A hemólise relativa de uma cepa foi obtida por meio da divisão da abs_{540nm} da cepa em questão pela abs_{540} da cepa ATCC25923 e multiplicação do resultado por 100. Este critério foi escolhido por representar a quantidade de hemólise produzida por uma determinada cepa de maneira mais compreensível em comparação a valores absolutos de absorbância, uma vez que simplesmente ao se olhar um valor de absorbância, não se sabe se a cepa é muito ou pouco hemolítica.

No entanto, com uso de sangue de carneiro incorre o problema de não se avaliar a totalidade de hemolisinas potencialmente produzidas pela cepa. As hemácias de carneiro são susceptíveis à lise pela beta hemolisina mas não pela alfa hemolisina, enquanto que as hemácias de coelho são susceptíveis apenas à alfa hemolisina. Portanto, para avaliar a ação da alfa hemolisina este ensaio foi repetido como descrito acima, mas empregando-se sangue de coelho em substituição ao de carneiro.

3.2.3 Avaliação da expressão de delta-hemolisina

O gene da delta hemolisina estafilocócica (*hld*) é transcrito junto com o RNAlII (que é o produto efetor do locus *agr*), uma vez que tanto o RNAlII quanto o gene *hld* encontram-se *downstream* do promotor P3. Isto significa que, assumindo que o gene *hld* esteja funcionalmente intacto, a expressão

de delta hemolisina em *S. aureus* é sinônimo de expressão de RNAIII, que é o produto final do *locus agr*, e o seu efetor.

Todavia, a detecção fenotípica da expressão de delta hemolisina não é fácil, pois esta hemolisina tem pouco poder hemolítico e a sua ação muitas vezes é mascarada pela ação de outras hemolisinas mais ativas (alfa e beta hemolisinas). Contudo, uma técnica fenotípica para a detecção de delta hemolisina foi desenvolvida por Sakoulas *et al.* (2002). Esta técnica utiliza uma cepa de *S. aureus* (RN4420) que produz uma zona de beta hemólise em ágar sangue de carneiro que é aumentada na presença de delta hemolisina. As amostras a serem testadas para a expressão de delta hemolisina são semeadas em ágar sangue em uma estria perpendicular à cepa RN4420. Se a amostra for produtora de delta hemolisina, observa-se na intersecção das duas zonas de hemólise uma exacerbação de beta hemólise que adquire o formato de uma seta (figura 3.2).

Este ensaio foi executado com todas as cepas. Após o inoculo, as placas foram incubadas a 37°C por 24h.

Figura 3.2 - ensaio para a avaliação da expressão de delta hemolisina. As amostras positivas são identificadas pela zona de exacerbação de hemólise na intersecção com a beta hemólise apresentada pela cepa RN4420 (horizontal).

3.2.4 Ensaio de adesão ao poliestireno

A adesão ao poliestireno foi avaliada através de uma adaptação da técnica descrita por Christensen *et al.* (1985). As cepas foram cultivadas em caldo TSB a 37°C por 24 horas sob agitação. Uma alíquota foi retirada e diluída 1:200 (v/v) em TSB estéril. Oito alíquotas de 200µl de cada diluição foram transferidas para uma microplaca de poliestireno estéril com 96 poços de fundo chato, que foi incubada em estufa a 35°C por 20h. O crescimento bacteriano foi verificado visualmente pela observação de turbidez em cada poço, e o controle de contaminação foi feito também visualmente pela observação de ausência de turbidez em poços que continham apenas meio de cultura estéril. O sobrenadante de cada poço foi retirado, cada poço foi lavado cuidadosamente 3 vezes com 300 µL de PBS estéril. As células foram fixadas por aquecimento a 65°C em forno de hibridização por 1 hora e foram coradas com 200µL de cristal violeta para coloração de Gram durante 1 minuto. O excesso de corante foi retirado com água destilada corrente e a placa foi secada à temperatura ambiente. Antes de determinar a absorbância de cada poço seco, o corante foi dissolvido com 160 µL de uma solução aquosa de ácido acético glacial a 33% (v/v) para providenciar um meio homogêneo para a leitura espectrofotométrica, que foi efetuada em um leitor de placas a 540 nm. Foi tomada a mediana das 8 absorbâncias obtidas para cada cepa. Christensen *et al.* (1985), classificam cepas em não aderentes ($Abs_{540} < 0,120$), cepas fracamente aderentes ($0,120 > Abs_{540} > 0,240$) e cepas fortemente aderentes ($Abs_{540} > 0,240$).

3.2.5 Indução de resistência à vancomicina em cepas sensíveis

Foram escolhidas 18 cepas para o estudo da indução à vancomicina. As cepas selecionadas apresentam características variadas que abrangem a variedade da coleção de cepas usadas neste estudo. Estas características estão descritas na tabela 3.3.

Tabela 3.3 - Características das cepas submetidas à indução *in vitro* da resistência à vancomicina.

Cepa	CIM de vancomicina (µg/mL)	Tipo de SCC mec	Grupo agr	Linhagem a que pertence por PFGE	Capacidade hemolítica em sangue de coelho (%)	Produção de delta hemolisina ? (S/N)
R14	1	III	1	A	32,4	S
R16	2	III	1	A	5,1	N
R35	2	IV	3	J	4,4	S
R50	2	III	1	A5	2,8	N
R63	1	IV	3	L	0,9	S
R93	1	III	1	A	1,9	N
R137	2	III	1	F	100,7	S
R157	2	III	1	A	0,0	N
R161	2	III	1	A	86,6	N
R222	2	IV	2	D	113,6	S
R229	2	III	1	E	0,3	N
T116	1	N/A	1	N/A	0,0	N
T551	2	III	1	N/A	0,0	N
HV135	2	III	1	A	12,2	N
RN6607	1	N/A	2	N/A	100,3	S
RN9120	1	N/A	2	N/A	7,7	N
ATCC25923	1	N/A	3	N/A	100,0	N
N315	2	II	2	N/A	2,2	N

N/A = Não se aplica.

As cepas selecionadas para o estudo de indução de resistência à vancomicina foram inoculadas em tubos com caldo BHI e cultivadas a 37°C sob agitação por 24h para atingirem fase estacionária. Uma alíquota de 50µL de cada tubo foi então passada para um outro tubo contendo 3mL de caldo BHI adicionado de vancomicina a uma concentração de 1µg/mL. Estes tubos foram então incubados a 37°C sob agitação por 24h. Após este

período, os tubos que apresentaram uma absorbância a 625nm maior do que 2 foram considerados estarem em fase estacionária. Os tubos que apresentaram uma absorbância a 625nm menor do que 2 foram re-incubados por mais 24h a 37°C, e analisados após este período. Dos tubos que atingiram a turvação necessária, foi retirada uma alíquota de 50µL que foi inoculada em outro tubo com caldo BHI suplementado com vancomicina a uma concentração de 2µg/mL, e incubado a 37°C por 24hs. Este processo todo foi repetido cada vez que um tubo atingia turvação completa, inoculando sempre uma alíquota de 50µL da cultura em outro tubo com BHI suplementado com uma concentração de vancomicina 1µg/mL maior do que o tubo anterior.

Uma amostra de 1mL de meio de cultura em fase estacionária de cada passo do processo de indução foi adicionada de glicerol a uma concentração final de 15% (v/v) e guardada a -20°C para uma possível análise posterior. Foi registrada diariamente a concentração de vancomicina na qual houve crescimento.

O número de dias necessários para que a cepa crescesse em meio com uma concentração de vancomicina de 8 µg/mL foi registrada e foi considerada como sendo a "facilidade de indução" da cepa. Quanto menor o número de dias necessários para que isso ocorresse, a cepa é considerada mais facilmente induzível.

3.2.6 Determinação da taxa de mutação que leva à resistência a vancomicina

A taxa de mutação (T_M) que leva a um determinado fenótipo é definida como a probabilidade de uma divisão celular resultar em mutação que resulta no novo fenótipo. Isto pode ser calculado dividindo-se o número de gerações celulares mutantes (m) que levam ao novo fenótipo pelo número total de gerações (N_G).

$$T_M = m / N_G$$

O número de gerações celulares mutantes que levam ao novo fenótipo (m) é impossível de se calcular em uma única cultura porque o número de mutações que ocorreram na cultura não é igual ao número de mutantes gerados ao final do cultivo. Isto ocorre porque uma única mutação pode resultar em um número maior ou menor de mutantes, dependendo da hora em que a mutação ocorreu durante a cultura. O que se consegue medir em uma cultura é apenas o número de células mutantes que surgiram durante a cultura. Para inferir o número de gerações mutantes a partir do número de células mutantes é necessário que se faça um estudo de flutuação, em que são feitas várias culturas da bactéria em paralelo e ao final de cada cultura o número de células mutantes é avaliado. A distribuição do número de mutantes pode ser usada para inferir a média de mutações por cultura (m). Existem vários métodos de calcular m , cada fórmula tendo as suas limitações e parâmetros de validade (ROSCHE *et al.*, 2000)

Para tentar perceber se algum determinado grupo genotípico de *S. aureus* apresenta alguma vantagem intrínseca para o surgimento de resistência a vancomicina foi calculada a taxa de mutação que leva uma cepa sensível a vancomicina a crescer numa concentração de 6 µg/mL de vancomicina. Como a taxa de mutação é um número muito pequeno (a mutação é um evento raro), para que ocorra a formação de células mutantes, o número de gerações deve ser maior do que o inverso da taxa de mutação ($1/T_M$). Para assegurar que cada cultura da bactéria contivesse pelo menos 10^{10} gerações, o tempo de cultura e o volume da cultura tiveram que ser padronizados. O volume do meio de cultura é um fator limitante do número de células geradas, uma vez que a bactéria entra em fase estacionária quando o poder nutritivo da cultura se esgota. Se o volume da cultura for pequeno demais, o número final de gerações pode não ser o suficiente para que ocorra uma mutação. Para determinar qual o volume da cultura e o tempo de incubação necessários para atingir 10^{10} gerações, foi feita uma curva de crescimento de uma cultura de 20 mL de BHI, com um inóculo inicial (N_0) de 10^4 células, equacionando o tempo de incubação com o número de bactérias presentes na cultura naquele determinado tempo. A cepa utilizada para a curva de crescimento foi a RN6607, e a incubação foi feita a 37°C a uma agitação rotativa de 200 rpm. A cada ponto da curva, uma alíquota de 100 µL da cultura foi removida do tubo, diluída serialmente (em fatores de 1:10) em caldo BHI estéril, e 10 µL da diluição foram plaqueados em ágar BHI, que foi incubado a 37°C por 24 horas. O número de colônias presentes na placa foi contado e multiplicado pelo fator de

diluição correspondente para retro-calcular o número de células presentes na cultura no determinado momento da retirada da alíquota.

Pôde-se inferir, a partir da curva de crescimento que após 20 horas, uma cultura de *S. aureus* em 20 mL de BHI continha $\sim 5 \times 10^{10}$ células. O número de gerações (N_G) de uma cultura, ou seja, o número de vezes que ocorreu uma divisão celular é dado subtraindo-se o número de células presentes no inóculo inicial (N_0) do número final de células (N_F).

$$N_G = N_F - N_0$$

Como o número final de células (N_F) é geralmente muito maior do que o inóculo, pode-se considerar que N_G é aproximadamente igual a N_F , contanto que a razão $N_0 / N_F < 10^{-4}$ (ROSCHE *et al.*, 2000).

$$N_G \approx N_F; \text{ se } N_0 / N_F < 10^{-4}$$

Para que um número detectável de mutantes ocorra na cultura, a taxa de mutação que leva à capacidade de crescimento em 6 μ g/mL de vancomicina deve ser, portanto, na ordem de 10^{-10} .

Para determinar a taxa de mutação que leva à capacidade de crescimento em 6 μ g/mL de vancomicina foram feitas, para cada cepa avaliada, 60 culturas em paralelo cada uma com 20 mL de caldo BHI em tubos tipo "Falcon" com capacidade para 50 mL. O inóculo em cada tubo foi de 10^4 células, que foi distribuído a partir de uma única diluição com volume de 700 mL para assegurar um inóculo idêntico em cada tubo. Os tubos foram incubados a 37°C a uma agitação rotativa de 200 rpm por 20 horas. Ao final deste tempo, uma alíquota de 100 μ L de cada tubo foi plaqueada em

ágar BHI previamente suplementado com 6µg/mL de vancomicina e o inóculo foi espalhado com o auxílio micro-esferas de vidro estéreis. De um dos tubos de cultura, foi retirada uma outra alíquota de 100 µL que foi diluída serialmente em caldo BHI estéril, de onde uma alíquota de 10 µL foi retirada e plaqueada em ágar BHI (sem vancomicina). As placas com e sem vancomicina foram incubadas em estufa a 37°C por 24 horas e o número de colônias foi contada em cada placa. O número de colônias da placa com BHI sem vancomicina foi multiplicado pelo fator de diluição para retro-calcular o número final de células na cultura (N_F). Como já explicado acima, N_G foi tomado como ser igual a N_F .

As cepas submetidas à análise de taxa de mutação e as suas características estão descritas na tabela 3.4.

Tabela 3.4 - Características das cepas submetidas ao cálculo da taxa de mutação que leva à capacidade de crescer em 6µg/mL de vancomicina por ensaio de flutuação.

Cepa	CIM de vancomicina (µg/mL)	Tipo de SCCmec	Grupo agr	Linhagem a que pertence por PFGE	Capacidade hemolítica em sangue de carneiro (%)	Produção de delta hemolisina? (S/N)
R93	1	III	1	A	7,4	N
R137	2	III	1	F	47,4	S
R222	2	IV	2	D	113,6	S
R229	2	III	1	E	7,8	N
RN6607	1	N/A	2	N/A	34,5	S
RN9120	1	N/A	2	N/A	89,2	N
ATCC25923	1	N/A	3	N/A	100,0	N
N315	2	II	2	N/A	8,5	N

N/A = Não se aplica.

Para calcular o número médio de mutações por cultura (m), foi utilizada a equação de Jones (JONES *et al.*, 1994) quando a mediana do número de mutantes por placa (r_m) era maior do que 0.

$$m = \frac{(r_m/z) - \ln(2)}{[\ln(r_m/z)] - \ln(\ln(2))}$$

onde: r_m = mediana do número de células mutantes de todas as culturas

z = fator de diluição do inóculo no meio seletivo em relação ao volume da cultura

m = média de mutações por cultura

Equação de Jones (JONES *et al.*, 1994)

Quando a taxa de mutação é muito pequena, a mediana do número de mutantes pode ser igual a zero. Quando isto ocorre, a equação de Jones não pode ser utilizada, pois contém o logaritmo natural ($\ln$) do valor r_m , que quando zero, seria igual a $-\infty$. Quando r_m era igual a zero, foi utilizada a equação de Luria-Delbrück (LURIA *et al.*, 1943), que é baseada na distribuição de Poisson.

$$P_0 = e^{-m} \Leftrightarrow m = -\ln(P_0)$$

onde: P_0 = probabilidade de haver 0 mutações

m = média de mutações por cultura

Equação de Luria-Delbrück (LURIA *et al.*, 1943)

O valor de P_0 foi calculado empiricamente dividindo-se o número de placas com vancomicina em que não houve crescimento pelo número total de placas com vancomicina (60). Pode-se considerar este quociente como sendo igual a P_0 porque, apesar de ser impossível de se saber quantas

mutações ocorreram numa cultura a partir do número de mutantes gerados, existe a exceção do caso de não haver mutantes, pois se pode afirmar com certeza que não houve mutações. A prerrogativa, todavia, é que a totalidade da cultura foi semeada. Se o volume total da cultura não for semeada, poderia haver um número tão pequeno de mutantes que nenhum estava presente na alíquota semeada na placa com vancomicina, e assumir-se-ia erroneamente que não ocorreram mutações na cultura. Este problema não ocorre quando se utiliza a equação de Jones porque a sua derivação é feita a partir de distribuições não-zero de Poisson (JONES *et al.*, 1994) e, portanto admite uma correção de m com um fator de diluição. Para contornar a inadmissibilidade de correção dilucional da equação de Luria-Delbrück, ROSCHE *et al.* (2000) citam que é possível corrigir o valor de m obtido utilizando-se uma fórmula que corrige o valor de m depois de sua obtenção (sem levar em consideração a diluição do inóculo). Na fórmula para a correção de m o fator de diluição é levado em consideração:

$$m_{ver} = m_{obs} \left(\frac{(z - 1)}{z \ln(z)} \right)$$

onde: $m_{ver} = m$ verdadeiro

$m_{obs} = m$ observado

z = fração inoculada

Equação para corrigir o m observado com o fator de diluição utilizado quando m é calculado pela equação de Luria-Delbrück (ROSCHE *et al.*, 2000)

Tendo calculado o valor de m , seja pela fórmula de Jones ou de Luria-Delbrück, este valor é dividido pelo número de gerações (N_G) para obter a taxa de mutação (T_M).

3.3 Técnicas Genotípicas

3.3.1 Extração do DNA cromossômico das cepas

O DNA cromossômico das cepas foi extraído através de uma técnica de micro-extração adaptada de Sambrook *et al.* (1989). Cada cepa foi cultivada em 3 mL de meio líquido LB por 24h a 37°C sob agitação mecânica. Desta cultura, foi transferido 1 mL do meio para um tubo Eppendorf de 1,5 mL, que foi centrifugado a 5000 x g por 10 minutos para a precipitação das células bacterianas. O sobrenadante foi descartado e o pellet foi ressuspensionado em 500µL de tampão de lise (50mM Tris pH 8; 5mM EDTA pH 8, 50mM NaCl). Adicionou-se a enzima lisostafina a uma concentração final de 20 µg/mL, para a digestão da parede celular, e o tubo foi incubado a 37°C por 2 horas. A membrana celular das células foi rompida com 30 µL de uma solução de duodecil sulfato de sódio (SDS) a 20%. Foi então adicionada a enzima proteinase K (100 mg/mL) a uma concentração final de 6µg/µL, para digerir as proteínas presentes. Foram adicionados ao tubo 500µL de uma mistura de clorofórmio com álcool isoamílico (24:1 v/v), ambos para biologia molecular (Merck®), e o tubo foi agitado vigorosamente. As fases foram separadas por centrifugação a 5000 x g por 5 minutos em

uma centrífuga para tubos Eppendorf® (Centrifuge 5403 - Eppendorf). 400 µL da fase superior (aquosa) foram retirados cuidadosamente para um outro tubo Eppendorf estéril, onde foi adicionado 700 µL de etanol absoluto para biologia molecular gelado e mais 50 µL de uma solução de cloreto de sódio (NaCl) a 5M. O tubo foi mantido em banho de gelo por 1 hora e foi então centrifugado a 15000 x g por 20 min. O sobrenadante foi descartado e então foram adicionados 700 µL de etanol 70% gelado. O tubo foi novamente centrifugado a 15000 x g por 15 minutos e o sobrenadante foi descartado e o tubo deixado aberto em fluxo laminar até a total evaporação do etanol. O DNA aderido às paredes do tubo foi então ressuspenso com 500µL de tampão TE (10mM Tris, 1mM EDTA pH 8). A solução foi então armazenada a -20°C até ser utilizada.

3.3.2 Determinação do grupo *agr* por PCR multiplex

A determinação do grupo *agr* pode ser feita por PCR-RFLP, todavia, esta técnica é relativamente trabalhosa e pouco específica devido à ocorrência de pequenos polimorfismos dentro de um determinado grupo *agr*, o que dificulta a identificação do grupo baseada em polimorfismo de restrição. Para solucionar este problema, Gilot *et al.* (2002) desenvolveram um método de tipagem de grupo *agr* por uma reação PCR *multiplex*, que envolve um iniciador comum a todos os grupos (Pan) e mais quatro iniciadores, específicos para cada grupo *agr* (*agr* I-IV). A sequência de cada iniciador está descrita na tabela 3.5. Usando todos estes iniciadores numa reação de amplificação *multiplex*, apenas um produto de PCR é amplificado,

o produto gerado pelo iniciador Pan mais o iniciador específico para o grupo *agr* daquela amostra. Como cada iniciador específico para cada grupo anela a regiões com distâncias diferentes do iniciador Pan, o tamanho do *amplicon* obtido é indicativo do grupo ao qual a amostra pertence (figura 3.3). Esta técnica foi aplicada às cepas neste estudo e o produto de PCR desta reação foi analisado por eletroforese em gel de agarose a 1%.

Todavia, após algumas tentativas iniciais, observou-se que em algumas amostras havia a presença de bandas não específicas, que não conseguiram ser resolvidas pela mudança das condições da reação. A solução foi separar os iniciadores e fazer 4 reações de amplificação, para cada amostra, uma para cada par específico para cada grupo *agr*.

Figura 3.3 - Local de anelamento dos iniciadores utilizados para a determinação do grupo *agr* na técnica de PCR multiplex.

O fragmento gerado pelos iniciadores Pan e Agr1 tem um tamanho de 441 pb, o gerado por Pan e Agr2 tem um tamanho de 575 pb, o gerado por Pan e Agr3 tem um tamanho 323 pb e o gerado por Pan e Agr4 tem um tamanho de 659 pb.

Tabela 3.5 - Iniciadores utilizados para a determinação do grupo *agr* por PCR.

Nome do iniciador	Sequência de Nucleotídeos	Polaridade	T _m em 50mM Na ⁺ (°C)
Pan	5' - ATG CAC ATG GTG CAC ATG C - 3'	F	57,0
Agr1	5'-GTC ACA AGT ACT ATA AGC TGC GAT-3'	R	54,6
Agr2	5'-TAT TAC TAA TTG AAA AGT GGC CAT AGC-3'	R	53,6
Agr3	5'-GTA ATG TAA TAG CTT GTA TAA TAA TAC CCA G-3'	R	52,2
Agr4	5'-CGA TAA TGC CGT AAT ACC CG-3'	R	47,0

As reações de amplificação foram feitas num volume final de 25µL. Neste volume havia 0,5 unidade de Taq DNA polimerase (Fermentas), 2,5 µL do tampão concentrado fornecido com a polimerase, 1µL da solução de DNA extraída conforme descrito em 3.3.1 e reagentes com as seguintes concentrações finais: MgCl₂ a 2,5mM; dATP a 200µM; dTTP a 200µM; dCTP a 200µM; dGTP a 200µM. A reação foi amplificada em um termociclador Perkin-Elmer Gene Amp 2400 com as seguintes condições: uma denaturação inicial a 94°C por 5 minutos, seguida de 30 ciclos de denaturação a 94°C por 1 minuto, anelamento a 55°C por 1 minuto e extensão a 72°C por 1 minuto, seguidos de uma extensão final a 72°C por 5 minutos.

Os produtos de PCR foram submetidos a eletroforese em gel de agarose a 1%, que foi corado com brometo de etídeo e visualizado em um transiluminador UV MacroVue (Pharmacia) e então registrado por fotografia digital.

3.3.3 Análise da integridade do locus *agr* por análise de polimorfismo de restrição (PCR-RFLP)

A determinação do grupo *agr* ao qual uma cepa pertence através da técnica de GILOT *et al.* (2002) (PCR *multiplex*) não avalia a integridade física do locus, pois pode haver uma mutação em alguma outra região que não a região hipervariável (*agrB-agrD*) avaliada para identificar o grupo. A técnica de PCR-RFLP foi utilizada como triagem de mutação em uma região do locus *agr* em que a maioria das mutações que levam à perda de funcionalidade do locus ocorre. Esta região é compreendida pelo gene *agrC* mais a região intergênica entre *agrC* e *agrA*.

Foram escolhidas cepas pertencentes ao mesmo grupo *agr* (grupo I) mas com características fenotípicas diferentes (resistência à oxacilina, resistência à vancomicina, hemólise e local geográfico de isolamento). Todas as cepas selecionadas pertencem ao mesmo clone determinado por PFGE, o clone endêmico brasileiro (CEB) "A", com a exceção da cepa T116 que é sensível à meticilina (todas as cepas do clone endêmico brasileiro são resistentes à meticilina). Foram escolhidas apenas cepas do CEB no intuito de avaliar a arquitetura e funcionalidade do locus *agr* de cepas supostamente isogênicas, mas que expressam fenótipos diferentes, e com isso verificar se o locus *agr* causa impacto na expressão destas diferenças fenotípicas.

As cepas selecionadas para o estudo do polimorfismo do gene *agrC* estão descritas na tabela 3.6.

Tabela 3.6 - Características de cepas escolhidas para a análise de restrição do locus *agr*.

Cepa	CIM de vancomicina	Resistência à oxacilina?	Produção de delta hemolisina	Hemólise em sangue de coelho (%)	Local de isolamento (UF)
R137	2 µg/mL	S	S	100,7	AL
R93	1 µg/mL	S	N	1,9	MG
R93-15*	16 µg/mL	N	N	2,4	-
HV138	2 µg/mL	S	N	0,3	SP
HV139	4 µg/mL	S	N	4,4	SP
VISA01	8 µg/mL	S	N	0,3	SP
VISA03	8 µg/mL	S	N	33,3	SP
VISA05	16 µg/mL	S	N	2,1	SP
VISA07	8 µg/mL	S	N	6,7	SP
VISA15	8 µg/mL	S	N	7,4	SP
T116	1 µg/mL	N	N	0,0	NI
T511	4 µg/mL	S	N	1,0	NI
R266	2 µg/mL	S	N	62,5	ES

*= a cepa R93-15 é derivada da cepa R93 que foi induzida até crescer em uma concentração de 15µg/mL de vancomicina conforme descrito no item 3.2.5; NI= Não informado.

Como o locus *agr* é relativamente grande (~3000 pb), ele foi subdividido em 6 seções, delimitadas por iniciadores descritos em outros estudos, como é mostrado na figura 3.4.

Figura 3.4 - Mapa de anelamento de diversos iniciadores no locus *agr*. A endonuclease de restrição indicada no segmento indica a enzima que reconhece o maior número de sítios de restrição naquele segmento.

A endonuclease de restrição representada em cada segmento indica a enzima que reconhece o maior número de sítios de restrição naquele segmento. A enzima foi escolhida utilizando uma sequência do locus *agr* já publicada (GeneBank accession number NC002951) que foi analisada pelo software de domínio público pDraw32 da Acaclone versão 1.1.87. As sequências dos iniciadores utilizados estão descritas na tabela 3.7.

Tabela 3.7 - Iniciadores utilizados para a amplificação de segmentos do locus *agr*.

Nome do iniciador	Sequência de Nucleotídeos	Polaridade	T _m em 50mM Na ⁺ (°C)
S1	5'-ATG GTT ATT AAG TTG GGA TGG-3'	F	51,3
InvPan	5'-GCA TGT GCA CCA TGT GCA T-3'	R	57,0
Pan	5'-ATG CAC ATG GTG CAC ATG C-3'	F	57,0
Agr1	5'-GTC ACA AGT ACT ATA AGC TGC GAT-3'	R	54,6
InvAgr1	5'-ATC GCA GCT TAT AGT ACT TGT GAC-3'	F	54,6
JarraudR	5'-CAT AAT CAT GAC GGA ACT TGC GC-3'	R	56,7
InvJarraudR	5'-GCG CAA GTT CCG TCA TGA TTA TG-3'	F	56,7
InvS3	5'-ACC AAT ACT GCG ACT TAA ATC-3'	R	51,8
S3	5'-GAT TTA AGT CGC AGT ATT GGT-3'	F	51,8
RFLP2	5'-TAA ACC ACG ACC TTC ACC-3'	R	51,9
InvRFLP2	5'-GGT GAA GGT CGT GGT TTA-3'	F	51,9
S4	5'-ACG CGT CAT ATT TAA TTT TGT-3'	R	50,2

Todas as cepas escolhidas para serem analisadas (tabela 3.6), foram submetidas à amplificação dos segmentos A, B, C, D e F (todos os segmentos exceto o segmento E) usando o par de iniciadores que compreendem o segmento. As reações de amplificação foram feitas num volume final de 100µL. Neste volume havia 1,5 unidade de Taq DNA polimerase de alta fidelidade Triplemaster® (Eppendorf), 10 µL do tampão concentrado fornecido com a polimerase, 1µL da solução de DNA extraída conforme descrito em 3.3.1 e reagentes com as seguintes concentrações

finais: MgCl_2 a 2,5mM; dATP a 200 μM ; dTTP a 200 μM ; dCTP a 200 μM ; dGTP a 200 μM . A reação foi amplificada em um termociclador Perkin-Elmer Gene Amp 2400 com as seguintes condições: uma denaturação inicial a 94°C por 5 minutos, seguida de 32 ciclos de denaturação a 94°C por 1 minuto, anelamento a n °C por 1 minuto e extensão a 72°C por 1 minuto, seguidos de uma extensão final a 72°C por 5 minutos. A temperatura de anelamento (n) variou de acordo com o segmento amplificado. Para os segmentos A, B e C a temperatura foi de 55°C e para os segmentos D e F esta temperatura foi de 52°C.

Os produtos de PCR foram precipitados com 250 μL etanol absoluto gelado e mais 10 μL de acetato de sódio 3,0 M pH 8, e incubados a -20°C *overnight*. Os tubos foram então centrifugados a 15000 x g por 20 minutos. O sobrenadante foi descartado e então foram adicionados 700 μL de etanol 70% gelado. O tubo foi novamente centrifugado a 15000 x g por 15 minutos e o sobrenadante foi descartado e o tubo foi deixado aberto em fluxo laminar até a total evaporação do etanol. O DNA aderido às paredes do tubo foi então ressuspendido com 26 μL de água Milli-Q estéril livre de DNA. A cada tubo foi então adicionado 3 μL do tampão da endonuclease de restrição utilizada para a digestão do segmento (figura 3.4), e mais 1 μL da endonuclease de restrição (*AluI* ou *RsaI* - Invitrogen).

3.3.4 Sequenciamento de DNA

Os loci *agr* e *sarA* das cepas T116, R93, R93-15, R137, V1, V3, V5, V7 e V15, cujas características estão descritas na tabela 3.6, foram integralmente amplificados por PCR utilizando uma DNA polimerase de alta fidelidade (Triplemaster® - Eppendorf) e os iniciadores S1 e S4 para o locus *agr* (figura 3.4), e os iniciadores SarF1 e SarR4 (tabela 3.8) para o locus *sarA* (figura 3.5).

Figura 3.5 - Mapa de anelamento de diversos iniciadores no locus *sarA*.

Tabela 3.8 - Iniciadores utilizados para a amplificação de segmentos do locus *sarA*.

Nome do iniciador	Sequência de Nucleotídeos	Polaridade	T _m em 50mM Na ⁺ (°C)
Sar1F	5'-TAT ATA CTG CTC GTT ATG CGG-3'	F	56,8
Sar2R	5'-GGC AAT TAC AAA AAT CAA TGA-3'	R	49,1
Sar2F	5'-TCA TTG ATT TTT GTA ATT GCC-3'	F	49,1
Sar3R	5'-TTA AAA CTG CAC TGA GAA TTA CTA-3'	R	52,9
Sar3F	5'-TAG TAA TTC TCA GTG CAG TTT TAA-3'	F	52,9
Sar4R	5'-TCT ATT ATG TAT TTT GAC AGG C-3'	R	51,5

As reações de amplificação foram feitas num volume final de 100µL. Neste volume havia 1,5 unidade de Taq DNA polimerase Triplmaster®, 10 µL do tampão concentrado fornecido com a polimerase, 1µL da solução de DNA extraída conforme descrito em 3.3.1 e reagentes com as seguintes concentrações finais: MgCl₂ a 2,5mM; dATP a 200µM; dTTP a 200µM; dCTP a 200µM; dGTP a 200µM. A reação foi amplificada em um termociclador Perkin-Elmer GeneAmp 2400 com as seguintes condições: uma denaturação inicial a 94°C por 5 minutos, seguida de 32 ciclos de denaturação a 94°C por 1 minuto, anelamento a 52°C por 1 minuto e extensão a 72°C por 1 minuto, seguidos de uma extensão final a 72°C por 5 minutos. Estes parâmetros foram utilizados tanto para a amplificação do locus *agr* como para a do locus *sarA*.

O fragmento obtido para cada amostra media 3340pb quando os iniciadores S1 e S4 foram usados, e 1516pb quando os iniciadores Sar1F e Sar4R foram usados. Estes fragmentos foram seqüenciados pela técnica de Sanger utilizando um sequenciador MegaBace® da Pharmacia no Centro de Estudos do Genoma Humano do Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo. Os iniciadores utilizados para as reações dideoxi-terminal de seqüenciamento para o locus *agr* foram os descritos na tabela 3.7 (12 iniciadores), e os iniciadores utilizados para o seqüenciamento do locus *sarA* estão descritos na tabela 3.8. Como as polaridades de cada iniciador que formam um par numa seção são opostas, os resultados do seqüenciamento de cada seção (2 por seção) puderam ser corroborados um com o outro pois havia sobreposição das regiões seqüenciadas em cada seção.

As sequências obtidas para cada cepa foram comparadas uma com a outra por alinhamento utilizando um software de domínio público (BioEdit versão 5.0.9). As sequências inteiras dos locus *sarA* de todas as amostras analisadas foram comparadas com a sequência do locus *sarA* da cepa N315 seqüenciada por Kuroda et al. (2001) (GeneBank accession number BA000018). Para a análise do locus *agr*, cada ORF correspondente a cada gene (*agrA*, *agrB*, *agrC* e *agrD*) foi traduzido e comparado com a sequência de aminoácidos de cada amostra e com sequências dos mesmos genes já publicadas (GeneBank accession number NC002951).

4. Resultados

4.1 Técnicas Fenotípicas

4.1.1 Determinação da CIM de vancomicina

As concentrações inibitórias mínimas de oxacilina obtidas foram condizentes com o esperado, uma vez que confirmaram o perfil de sensibilidade a este antibiótico de cada cepa. Houve variação entre a CIM de vancomicina obtida por diluição em ágar quando ágar MH foi usado em comparação a quando ágar BHI foi usado (tabela 4.1). Pôde-se observar, inclusive, uma divergência de fenótipo de sensibilidade ao antibiótico, uma vez que em ágar MH algumas cepas seriam consideradas sensíveis enquanto que ao mesmo tempo seriam consideradas intermediárias em ágar BHI. A CIM original da cepa Mu50 é 8 µg/mL (HIRAMATSU *et al.*, 1997), todavia este valor não foi obtido, o que é de se esperar uma vez que esta cepa já foi repicada extensivamente, o que pode reduzir a CIM da cepa (BOYLE-VAVRA *et al.*, 2000; SAKOULAS *et al.*, 2002).

Tabela 4.1 - Concentrações inibitórias mínimas de oxacilina e vancomicina das cepas usadas neste estudo.

n	Cepa	Concentração Inibitória Mínima de oxacilina (µg/mL) em ágar MH (CLSI, 2006)	Concentração Inibitória Mínima de vancomicina (µg/mL) em ágar MH (CLSI, 2006)	Concentração Inibitória Mínima de vancomicina (µg/mL) em ágar BHI (HIRAMATSU <i>et al.</i> , 1997a)
1	VISA01	512	2	8
2	VISA03	512	2	8
3	VISA05	512	2	16
4	VISA07	512	4	8
5	VISA15	512	4	8
6	HVISA026	512	1	4
7	HVISA027	512	1	2
8	HVISA135	512	2	2
9	HVISA138	512	1	2
10	HVISA139	512	4	4
11	R009	512	1	2
12	R014	256	2	1
13	R016	64	1	2
14	R020	512	1	2
15	R021	256	2	2
16	R035	256	1	2
17	R036	512	1	2
18	R050	256	2	2
19	R063	512	1	1
20	R079	256	1	1
21	R093	512	2	1
22	R106	256	0,5	4
23	R128	256	1	2
24	R130	256	1	2
25	R137	8	1	2
26	R153	8	0,5	2
27	R156	128	0,5	2
28	R157	512	1	2
29	R161	256	0,5	2
30	R181	256	1	2
31	R191	64	1	2
32	R222	64	0,5	2
33	R229	256	0,5	4
34	R257	256	1,5	2
35	R266	256	0,5	2
36	R267	64	0,5	2
37	R277	512	1,5	2
38	R401	512	1	1
39	R416	256	0,5	2
40	T047	1	1	1
41	T116	2	1	1
42	T224	1	1	1
43	T453	1	2	2
44	T482	128	2	2
45	T498	256	1	1
46	T511	256	2	4
47	T551	512	1	2
48	RN6607	1	1	1
49	RN9120	1	1	1
50	ATCC25923	1	1	1
51	N315	256	0,5	2
52	Mu3	512	1	4
53	Mu50	512	2	4
54	R93-15*	32	24	32
55	N315-15*	32	32	32
56	ATCC-15*	8	24	32

* = cepa com capacidade de crescer em 15µg/mL de vancomicina

4.1.2 Determinação das propriedades hemolíticas das cepas

As propriedades hemolíticas tanto em sangue de carneiro como em sangue de coelho de cada cepa foram expressas como porcentagem de poder hemolítico em relação à cepa ATCC 25923. Os valores obtidos para cada cepa encontram-se na tabela 4.2. Também nesta tabela pode-se observar os resultados obtidos para a expressão de delta-hemolisina.

A quantidade de hemólise produzida em sangue de carneiro por uma determinada cepa diferiu da quantidade de hemólise produzida em sangue de coelho. A maioria das cepas apresentou uma baixa capacidade de causar hemólise tanto em ágar sangue de carneiro como de coelho. A maioria das cepas também apresentou uma baixa produção de delta hemolisina.

Tabela 4.2 - Propriedades hemolíticas, resistência à vancomicina e linhagem das cepas usadas neste estudo.

n	Cepa	Produção de delta hemolisina (S/N)	Poder hemolítico em sangue de coelho (%)	Poder hemolítico em sangue de carneiro (%)	Linhagem por PFGE (OLIVEIRA <i>et al.</i> , 1998)
1	VISA01	N	0,3	12,0	A
2	VISA03	N	33,3	12,4	A
3	VISA05	N	2,1	9,6	A
4	VISA07	N	6,7	10,0	A
5	VISA15	S	7,4	9,5	A
6	HVISA026	N	4,1	12,5	A
7	HVISA027	N	28,5	7,6	A
8	HVISA135	N	12,2	20,6	A
9	HVISA138	N	0,3	15,8	A
10	HVISA139	N	4,4	7,0	A
11	R009	N	70,4	10,7	A
12	R014	S	32,4	10,2	A
13	R016	N	5,1	10,4	A
14	R020	N	0,2	8,4	A
15	R021	N	7,0	16,5	K
16	R035	S	4,4	17,2	J
17	R036	N	109,6	11,1	A2
18	R050	N	2,8	8,1	A5
19	R063	S	0,9	8,5	L
20	R079	N	71,2	21,5	A
21	R093	N	1,9	7,4	A
22	R106	N	84,3	12,7	A
23	R128	N	4,9	7,5	A
24	R130	N	20,7	7,8	A
25	R137	S	100,7	47,4	F
26	R153	S	0,9	8,3	A
27	R156	N	5,7	9,3	A1
28	R157	N	0,0	94,7	A
29	R161	N	86,6	100,7	A
30	R181	N	72,8	94,1	A
31	R191	N	4,4	8,7	A
32	R222	S	113,6	20,4	D
33	R229	N	0,3	7,8	E
34	R257	N	1,2	7,8	I1
35	R266	N	62,5	8,4	I
36	R267	S	23,1	20,3	I
37	R277	N	47,4	16,8	A
38	R401	N	10,7	7,9	B
39	R416	N	0,0	13,9	A
40	T047	N	0,0	17,7	NI
41	T116	N	0,0	97,0	NI
42	T224	N	0,0	6,8	NI
43	T453	N	0,0	12,4	NI
44	T482	N	69,5	11,5	NI
45	T498	N	0,0	8,3	NI
46	T511	N	1,0	26,4	NI
47	T551	N	0,0	95,7	NI
Média ± DP (cepas 1-47)		-	23,7 ± 34,3	21,6 ± 27,0	-
48	RN6607	S	100,3	34,5	NI
49	RN9120	N	7,7	89,2	NI
50	ATCC25923	N	100,0	100,0	NI
51	N315	N	2,2	8,5	NI
52	Mu3	N	28,1	10,4	NI
53	Mu50	N	2,2	8,2	NI
54	R93-15*	N	2,4	8,0	NI
55	N315-15*	N	4,2	6,6	NI
56	ATCC-15*	N	2,5	7,2	NI

N= Não; S= Sim; NI = Não Informado; *= as cepas R93-15, N315-15 e ATCC-15 são derivadas das cepas R93, N315 e ATCC25923 que foram induzidas até crescerem em uma concentração de 15µg/mL de vancomicina conforme descrito no item 3.2.5.

4.1.3 Adesão ao poliestireno

A capacidade de adesão de cada cepa foi expressa como absorbância do sobrenadante a 540nm, que é proporcional à quantidade de células aderidas às paredes do poço de poliestireno antes da coloração. Os valores para cada cepa estão descritos na tabela 4.3.

Tabela 4.3 - Capacidade de adesão ao poliestireno expressa como absorbância do sobrenadante a 540nm.

n	Cepa	Linhagem por PFGE (OLIVEIRA <i>et al.</i> , 1998)	Produção de delta hemolisina?	Adesão média $\pm$ DP	Adesão mediana
1	VISA01	A	N	0,292 $\pm$ 0,068	0,282
2	VISA03	A	N	0,371 $\pm$ 0,090	0,370
3	VISA05	A	N	0,195 $\pm$ 0,031	0,203
4	VISA07	A	N	0,405 $\pm$ 0,055	0,406
5	VISA15	A	S	0,514 $\pm$ 0,047	0,523
6	HVISA026	A	N	0,374 $\pm$ 0,062	0,379
7	HVISA027	A	N	0,509 $\pm$ 0,103	0,522
8	HVISA135	A	N	0,373 $\pm$ 0,039	0,370
9	HVISA138	A	N	0,523 $\pm$ 0,065	0,551
10	HVISA139	A	N	0,514 $\pm$ 0,055	0,511
11	R009	A	N	0,588 $\pm$ 0,030	0,589
12	R014	A	S	0,479 $\pm$ 0,025	0,473
13	R016	A	N	0,453 $\pm$ 0,038	0,460
14	R020	A	N	0,436 $\pm$ 0,050	0,453
15	R021	K	N	0,462 $\pm$ 0,117	0,497
16	R035	J	S	0,526 $\pm$ 0,034	0,529
17	R036	A2	N	0,575 $\pm$ 0,027	0,573
18	R050	A5	N	0,519 $\pm$ 0,048	0,532
19	R063	L	S	0,379 $\pm$ 0,057	0,389
20	R079	A	N	0,556 $\pm$ 0,056	0,559
21	R093	A	N	0,462 $\pm$ 0,080	0,469
22	R106	A	N	0,560 $\pm$ 0,032	0,561
23	R128	A	N	0,014 $\pm$ 0,031	0,013
24	R130	A	N	0,427 $\pm$ 0,049	0,433
25	R137	F	S	0,279 $\pm$ 0,062	0,280
26	R153	A	S	0,207 $\pm$ 0,088	0,217
27	R156	A1	N	0,342 $\pm$ 0,087	0,317
28	R157	A	N	0,384 $\pm$ 0,054	0,403
29	R161	A	N	0,410 $\pm$ 0,049	0,428
30	R181	A	N	0,216 $\pm$ 0,069	0,200
31	R191	A	N	0,498 $\pm$ 0,060	0,504
32	R222	D	S	0,327 $\pm$ 0,049	0,331
33	R229	E	N	0,330 $\pm$ 0,170	0,404
34	R257	I1	N	0,138 $\pm$ 0,028	0,138
35	R266	I	N	0,192 $\pm$ 0,037	0,193

Continuação (tabela 4.3)					
36	R267	I	S	$0,394 \pm 0,083$	0,413
37	R277	A	N	$0,446 \pm 0,015$	0,444
38	R401	B	N	$0,492 \pm 0,021$	0,497
39	R416	A	N	$0,299 \pm 0,033$	0,302
40	T047	NI	N	$0,441 \pm 0,031$	0,437
41	T116	NI	N	$0,421 \pm 0,065$	0,410
42	T224	NI	N	$0,168 \pm 0,029$	0,161
43	T453	NI	N	$0,257 \pm 0,035$	0,263
44	T482	NI	N	$0,514 \pm 0,102$	0,552
45	T498	NI	N	$0,107 \pm 0,097$	0,109
46	T511	NI	N	$0,506 \pm 0,049$	0,518
47	T551	NI	N	$0,625 \pm 0,125$	0,679
Média $\pm$ DP (cepas 1-47)		n/a	n/a	n/a	$0,401 \pm 0,145$
48	RN6607	n/a	S	$0,515 \pm 0,026$	0,519
49	RN9120	n/a	N	$0,516 \pm 0,026$	0,514
50	ATCC25923	n/a	N	$0,375 \pm 0,027$	0,386
51	N315	n/a	N	$0,537 \pm 0,042$	0,540
52	Mu3	n/a	N	$0,325 \pm 0,039$	0,334
53	Mu50	n/a	N	$0,427 \pm 0,056$	0,442

N= Não; S= Sim; DP = Desvio Padrão; NI= Não informado; n/a = Não se aplica.

4.1.4 Indução da resistência à vancomicina

As cepas escolhidas para serem induzidas apresentaram "facilidades de indução" variadas. Duas cepas (R63 e HV135) não conseguiram ser induzidas e não cresceram sequer numa concentração de 2 $\mu\text{g/mL}$ de vancomicina. Todas as outras cepas conseguiram crescer em 8 $\mu\text{g/mL}$ de vancomicina (e além), mas levaram tempos diferentes para fazê-lo.

A cepa mais facilmente induzível foi a cepa R229 que levou apenas 9 dias. A menos facilmente induzível foi a cepa ATCC25923 que levou um total de 14 dias para conseguir crescer em uma concentração de 8 $\mu\text{g/mL}$ de vancomicina. O desempenho de cada cepa na prova de indução pode ser observado na figura 4.1. O número de dias que cada cepa levou para

conseguir crescer em uma concentração de 8 μ g/mL de vancomicina pode ser visto na tabela 4.4.

Figura 4.1 - Desempenho de cada cepa no estudo da indução da resistência à vancomicina.

Tabela 4.4 - Número de dias levados para crescer em uma concentração de 8µg/mL de vancomicina.

Cepa	CIM inicial de vancomicina (µg/mL)	Número de dias para crescer em 8µg/mL	Grupo agr	Linhagem a que pertence por PFGE	Capacidade hemolítica em sangue de coelho (%)	Produção de delta hemolisina? (S/N)
R14	1	13	1	A	32,4	S
R16	2	11	1	A	5,1	N
R35	2	10	3	J	4,4	S
R50	2	12	1	A5	2,8	N
R63	1	não cresceu	3	L	0,9	S
R93	1	14	1	A	1,9	N
R137	2	11	1	F	100,7	S
R157	2	10	1	A	0,0	N
R161	2	11	1	A	86,6	N
R222	2	11	2	D	113,6	S
R229	2	9	1	E	0,3	N
T116	1	11	1	N/A	0,0	N
T551	2	12	1	N/A	0,0	N
HV135	2	não cresceu	1	A	12,2	N
RN6607	1	12	2	N/A	100,3	S
RN9120	1	13	0	N/A	7,7	N
ATCC 25923	1	14	3	N/A	100,0	N
N315	2	11	2	N/A	2,2	N

N= Não; S= Sim; DP = Desvio Padrão; n/a = Não se aplica.

4.1.5 Determinação da taxa de mutação que leva à capacidade de crescimento em 6µg/mL de vancomicina.

Todas as cepas apresentaram mutações que levam à capacidade de crescer em 6µg/mL de vancomicina (tabela 4.5). A maioria das cepas analisadas apresentou uma mediana de mutantes por placa (r_m) igual a zero. Apenas a cepa R93 pôde ser analisada usando a equação de Jones, todas as outras cepas foram analisadas pelo método do P_0 de Luria-Delbrück.

Tabela 4.5 – Distribuição do número de mutantes detectados no estudo de flutuação de cada cepa.

Cepa	Número de placas com número de colônias												mediana (r_m)
	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	>10	
R93	22	14	7	5	3	0	2	0	0	1	0	6	1
R137	51	5	1	0	0	0	0	0	0	0	0	3	0
R222	55	3	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0
R229	51	7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	0
RN6607	48	6	5	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
RN9120	50	6	1	0	0	0	0	0	1	0	0	2	0
ATCC25923	43	10	3	2	0	0	1	0	0	0	0	1	0

Para todas as cepas cuja mediana de mutações por placa (r_m) foi igual a zero, a média de mutantes por cultura foi calculada por $m = -\ln(P_0)$.

Os valores de m observados foram corrigidos pela fórmula

$$m_{ver} = m_{obs} \left(\frac{(z-1)}{z \ln(z)} \right) \text{ para levar em conta a fração da cultura que foi}$$

inoculada. Como a fração (z) utilizada para todas as amostras foi igual,

sendo 1/200, os valores de m calculados pelo método de Luria-Delbrück

foram multiplicados por 37,559 para obter os valores de m verdadeiros

(m_{ver}). Os valores de P_0 , N_G , m , m_{ver} e T_M obtidos para cada cepa podem ser

vistos na tabela 4.6. A T_M da cepa R93 foi calculada também pelo método

de Luria-Delbrück, apesar da cepa ter um $r_m \neq 0$, para corroborar (e

comparar) este método com o de Jones. O m e a T_M obtidos pela equação

de Jones para a cepa R93 pode ser vista na tabela 4.6.

Tabela 4.6 – P_0 , N_G , m e T_M obtidos para cada cepa.

Cepa	Método usado	N_G	P_0	m	m_{ver}	T_M
R93	Jones	$8,0 \times 10^9$	n/a	35,18	n/a	$4,40 \times 10^{-9}$
R93	Luria-Delbrück	$8,0 \times 10^9$	22/60	1,00	37,68	$4,71 \times 10^{-9}$
R137	Luria-Delbrück	$2,8 \times 10^{10}$	51/60	0,16	6,10	$2,18 \times 10^{-10}$
R222	Luria-Delbrück	$5,5 \times 10^{10}$	55/60	0,09	3,27	$5,94 \times 10^{-11}$
R229	Luria-Delbrück	$3,8 \times 10^{10}$	51/60	0,16	6,10	$1,61 \times 10^{-10}$
RN6607	Luria-Delbrück	$4,0 \times 10^{10}$	48/60	0,22	8,38	$2,10 \times 10^{-10}$
RN9120	Luria-Delbrück	$1,0 \times 10^{10}$	50/60	0,18	6,85	$6,85 \times 10^{-10}$
ATCC25923	Luria-Delbrück	$1,0 \times 10^{10}$	43/60	0,33	12,51	$1,25 \times 10^{-9}$

n/a = não se aplica.

Uma representação gráfica da taxa de mutação que leva à capacidade de crescimento em 6µg/mL de vancomicina pode ser vista na figura 4.2.

Figura 4.2 – T_M obtida para cada cepa.

4.2 Técnicas genotípicas

4.2.1 Determinação do grupo *agr* por PCR.

Os resultados obtidos por esta técnica para cada amostra podem ser observados na tabela 4.7. Através da determinação do grupo *agr* pela técnica descrita por Gilot *et al.* (2002) das 47 cepas clínicas estudadas, 39 (82,9%) pertencem ao grupo *agr* I, 2 (4,3%) pertencem ao grupo *agr* II, 6 (12,8%) pertencem ao grupo *agr* III e 0 (0,0%) pertencem ao grupo *agr* IV. 5 cepas (10,6%) não puderam ser tipadas por esta técnica, pois ou apresentaram bandas com um tamanho não correspondente ao, ou então

produtos de PCR não específicos. Estas cepas foram tipadas por PCR-RFLP da região variável usando a enzima *AluI* e comparando o perfil obtido com aquele obtido por cepas padrão (R93 - *agr* I; N315 - *agr* II e ATCC25923 - *agr* III). Todas estas 5 cepas apresentaram um perfil igual ao do grupo *agr* I.

Tabela 4.7- Grupo *agr* de cada cepa, determinado pela técnica de Gilot *et al.* (2002).

n	Nome da cepa	Grupo agr	Linhagem por PFGE (OLIVEIRA <i>et al.</i> , 1998)	Tipo de SCCmec
1	VISA01	1	A	III
2	VISA03	1	A	III
3	VISA05	1	A	III
4	VISA07	1	A	III
5	VISA15	1	A	III
6	HVISA026	1	A	III
7	HVISA027	1	A	III
8	HVISA135	1	A	III
9	HVISA138	1*	A	III
10	HVISA139	1	A	III
11	R009	1	A	III
12	R014	1	A	III
13	R016	1	A	III
14	R020	1	A	III
15	R021	2	K	III
16	R035	3	J	IV
17	R036	1	A2	III
18	R050	1	A5	III
19	R063	3	L	IV
20	R079	1	A	III
21	R093	1	A	III
22	R106	1	A	III
23	R128	1	A	III
24	R130	1	A	III
25	R137	1	F	III
26	R153	1	A	III
27	R156	1	A1	III
28	R157	1	A	III
29	R161	1	A	III
30	R181	1*	A	III
31	R191	3	A	III
32	R222	2	D	IV
33	R229	1	E	III
34	R257	1	I1	III
35	R266	1*	I	III
36	R267	1	I	III
37	R277	1	A	III
38	R401	1	B	III

Continuação (tabela 4.7)				
39	R416	1*	A	III
40	T047	3	NI	n/a
41	T116	1	NI	n/a
42	T224	3	NI	n/a
43	T453	3	NI	NI
44	T482	1	NI	III
45	T498	1	NI	NI
46	T511	1*	NI	III
47	T551	1	NI	n/a
48	RN6607	2	NI	n/a
49	RN9120	0	NI	n/a
50	ATCC25923	3	NI	n/a
51	N315	2	NI	II
52	Mu3	2	NI	II
53	Mu50	2	NI	II

NI = Não informado; n/a = Não se aplica por não carregar o *SCCmec*; * = Grupo *agr* confirmado por PCR-RFLP da região hipervariável; 0 = Ausência do locus *agr*.

4.2.2 PCR-RFLP do locus *agr*

Todas as cepas submetidas a análise de restrição apresentaram os mesmos perfis de restrição para todos os segmentos. O segmento mais provável de ter mutação é o segmento C que compreende o gene *agrC* (SCHWANN *et al.*, 2003). Pode-se observar, na figura 4.3 que os perfis de restrição para todas as cepas são idênticos.

Figura 4.3 - RFLP da seção C do locus *agr* de cepas selecionadas usando a enzima *AluI*.

4.2.3 Sequenciamento de DNA

4.2.3.1 Locus *agr*

As sequências obtidas para cada cepa apresentaram pouquíssima variação entre elas. Quando cada gene foi traduzido em sequência de aminoácidos e as sequências de cada amostra alinhadas, pôde-se observar que o gene *agrB* (figura 4.4) encontra-se íntegro em todas as amostras, bem como o gene *agrD* (figura 4.5). Já o gene *agrC* (figura 4.6) apresentou certo polimorfismo entre as cepas estudadas, e uma mutação tipo *frameshift* na amostra VISA03. O gene *agrA* (figura 4.7) apresentou polimorfismo entre as cepas T116 e R137 em comparação às demais.

COL AgrB	1	LN YFDNKIDQFATYLCQRNNLDHIQFLQVRLGMQVLAKNIGKLI VMYTIAIILNIFLFTL	60
T116 AgrB	1	LN YFDNKIDQFATYLCQRNNLDHIQFLQVRLGMQVLAKNIGKLI VMYTIAIILNIFLFTL	60
R137 AgrB	1	LN YFDNKIDQFATYLCQRNNLDHIQFLQVRLGMQVLAKNIGKLI VMYTIAIILNIFLFTL	60
V1 AgrB	1	LN YFDNKIDQFATYLCQRNNLDHIQFLQVRLGMQVLAKNIGKLI VMYTIAIILNIFLFTL	60
V3 AgrB	1	LN YFDNKIDQFATYLCQRNNLDHIQFLQVRLGMQVLAKNIGKLI VMYTIAIILNIFLFTL	60
V5 AgrB	1	LN YFDNKIDQFATYLCQRNNLDHIQFLQVRLGMQVLAKNIGKLI VMYTIAIILNIFLFTL	60
V7 AgrB	1	LN YFDNKIDQFATYLCQRNNLDHIQFLQVRLGMQVLAKNIGKLI VMYTIAIILNIFLFTL	60
V15 AgrB	1	LN YFDNKIDQFATYLCQRNNLDHIQFLQVRLGMQVLAKNIGKLI VMYTIAIILNIFLFTL	60
R93 AgrB	1	LN YFDNKIDQFATYLCQRNNLDHIQFLQVRLGMQVLAKNIGKLI VMYTIAIILNIFLFTL	60
R93-15 AgrB	1	LN YFDNKIDQFATYLCQRNNLDHIQFLQVRLGMQVLAKNIGKLI VMYTIAIILNIFLFTL	60
COL AgrB	61	ITNLTFFYLIRRHAGAHAPSSEFCYVESIILFILLELVIVNFHINFLIMIILTVISLGV	120
T116 AgrB	61	ITNLTFFYLIRRHAGAHAPSSEFCYVESIILFILLELVIVNFHINFLIMIILTVISLGV	120
R137 AgrB	61	ITNLTFFYLIRRHAGAHAPSSEFCYVESIILFILLELVIVNFHINFLIMIILTVISLGV	120
V1 AgrB	61	ITNLTFFYLIRRHAGAHAPSSEFCYVESIILFILLELVIVNFHINFLIMIILTVISLGV	120
V3 AgrB	61	ITNLTFFYLIRRHAGAHAPSSEFCYVESIILFILLELVIVNFHINFLIMIILTVISLGV	120
V5 AgrB	61	ITNLTFFYLIRRHAGAHAPSSEFCYVESIILFILLELVIVNFHINFLIMIILTVISLGV	120
V7 AgrB	61	ITNLTFFYLIRRHAGAHAPSSEFCYVESIILFILLELVIVNFHINFLIMIILTVISLGV	120
V15 AgrB	61	ITNLTFFYLIRRHAGAHAPSSEFCYVESIILFILLELVIVNFHINFLIMIILTVISLGV	120
R93 AgrB	61	ITNLTFFYLIRRHAGAHAPSSEFCYVESIILFILLELVIVNFHINFLIMIILTVISLGV	120
R93-15 AgrB	61	ITNLTFFYLIRRHAGAHAPSSEFCYVESIILFILLELVIVNFHINFLIMIILTVISLGV	120
COL AgrB	121	SVYAEAAATKKKEIPVRLIKRKKYYAIIVSLTLFIITLIIKEFFAQFIQLGIIIEAITLLF	180
T116 AgrB	121	SVYAEAAATKKKEIPVRLIKRKKYYAIIVSLTLFIITLIIKEFFAQFIQLGIIIEAITLLF	180
R137 AgrB	121	SVYAEAAATKKKEIPVRLIKRKKYYAIIVSLTLFIITLIIKEFFAQFIQLGIIIEAITLLF	180
V1 AgrB	121	SVYAEAAATKKKEIPVRLIKRKKYYAIIVSLTLFIITLIIKEFFAQFIQLGIIIEAITLLF	180
V3 AgrB	121	SVYAEAAATKKKEIPVRLIKRKKYYAIIVSLTLFIITLIIKEFFAQFIQLGIIIEAITLLF	180
V5 AgrB	121	SVYAEAAATKKKEIPVRLIKRKKYYAIIVSLTLFIITLIIKEFFAQFIQLGIIIEAITLLF	180
V7 AgrB	121	SVYAEAAATKKKEIPVRLIKRKKYYAIIVSLTLFIITLIIKEFFAQFIQLGIIIEAITLLF	180
V15 AgrB	121	SVYAEAAATKKKEIPVRLIKRKKYYAIIVSLTLFIITLIIKEFFAQFIQLGIIIEAITLLF	180
R93 AgrB	121	SVYAEAAATKKKEIPVRLIKRKKYYAIIVSLTLFIITLIIKEFFAQFIQLGIIIEAITLLF	180
R93-15 AgrB	121	SVYAEAAATKKKEIPVRLIKRKKYYAIIVSLTLFIITLIIKEFFAQFIQLGIIIEAITLLF	180
COL AgrB	181	IFFIKEDL	188
T116 AgrB	181	IFFIKEDL	188
R137 AgrB	181	IFFIKEDL	188
V1 AgrB	181	IFFIKEDL	188
V3 AgrB	181	IFFIKEDL	188
V5 AgrB	181	IFFIKEDL	188
V7 AgrB	181	IFFIKEDL	188
V15 AgrB	181	IFFIKEDL	188
R93 AgrB	181	IFFIKEDL	188
R93-15 AgrB	181	IFFIKEDL	188

Figura 4.4 - Sequência de aminoácidos da proteína AgrB. As identidades estão coloridas.

COL AgrD	1	MNTLFNLFDFFITGILKNIGNIAAYSTCDFIMDEVEVEKELTQLHE*	47
T116 AgrD	1	MNTLFNLFDFFITGILKNIGNIAAYSTCDFIMDEVEVEKELTQLHE*	47
R137 AgrD	1	MNTLFNLFDFFITGILKNIGNIAAYSTCDFIMDEVEVEKELTQLHE*	47
V1 AgrD	1	MNTLFNLFDFFITGILKNIGNIAAYSTCDFIMDEVEVEKELTQLHE*	47
V3 AgrD	1	MNTLFNLFDFFITGILKNIGNIAAYSTCDFIMDEVEVEKELTQLHE*	47
V5 AgrD	1	MNTLFNLFDFFITGILKNIGNIAAYSTCDFIMDEVEVEKELTQLHE*	47
V7 AgrD	1	MNTLFNLFDFFITGILKNIGNIAAYSTCDFIMDEVEVEKELTQLHE*	47
V15 AgrD	1	MNTLFNLFDFFITGILKNIGNIAAYSTCDFIMDEVEVEKELTQLHE*	47
R93 AgrD	1	MNTLFNLFDFFITGILKNIGNIAAYSTCDFIMDEVEVEKELTQLHE*	47
R9315 AgrD	1	MNTLFNLFDFFITGILKNIGNIAAYSTCDFIMDEVEVEKELTQLHE*	47

Figura 4.5 - Sequência de aminoácidos da proteína AgrD. As identidades estão coloridas.

COL AgrA	1	MKIFICEDDEKQRENMTIKNYIMIEEKMEIALATDNEYEVLEQAKNMNDIGCYFLDI	60
T116 AgrA	1	MKIFICEDDEKQRENMTIKNYIMIEEKMEIALATDNEYEVLEQAKNMNDIGCYFLDI	60
R137 AgrA	1	MKIFICEDDEKQRENMTIKNYIMIEEKMEIALATDNEYEVLEQAKNMNDIGCYFLDI	60
V1 AgrA	1	MKIFICEDDEKQRENMTIKNYIMIEEKMEIALATDNEYEVLEQAKNMNDIGCYFLDI	60
V3 AgrA	1	MKIFICEDDEKQRENMTIKNYIMIEEKMEIALATDNEYEVLEQAKNMNDIGCYFLDI	60
V5 AgrA	1	MKIFICEDDEKQRENMTIKNYIMIEEKMEIALATDNEYEVLEQAKNMNDIGCYFLDI	60
V7 AgrA	1	MKIFICEDDEKQRENMTIKNYIMIEEKMEIALATDNEYEVLEQAKNMNDIGCYFLDI	60
V15 AgrA	1	MKIFICEDDEKQRENMTIKNYIMIEEKMEIALATDNEYEVLEQAKNMNDIGCYFLDI	60
R93 AgrA	1	MKIFICEDDEKQRENMTIKNYIMIEEKMEIALATDNEYEVLEQAKNMNDIGCYFLDI	60
R9315 AgrA	1	MKIFICEDDEKQRENMTIKNYIMIEEKMEIALATDNEYEVLEQAKNMNDIGCYFLDI	60
COL AgrA	61	QLSTDINGIKLGSEIRKHDEVGNIIFVTSHSELYTLTFVYKVAAMD FIFKDDFAELRTRI	120
T116 AgrA	61	QLSTDINGIKLGSEIRKHDEVGNIIFVTSHSELYTLTFVYKVAAMD FIFKDDFAELRTRI	120
R137 AgrA	61	QLSTDINGIKLGSEIRKHDEVGNIIFVTSHSELYTLTFVYKVAAMD FIFKDDFAELRTRI	120
V1 AgrA	61	QLSTDINGIKLGSEIRKHDEVGNIIFVTSHSELYTLTFVYKVAAMD FIFKDDFAELRTRI	120
V3 AgrA	61	QLSTDINGIKLGSEIRKHDEVGNIIFVTSHSELYTLTFVYKVAAMD FIFKDDFAELRTRI	120
V5 AgrA	61	QLSTDINGIKLGSEIRKHDEVGNIIFVTSHSELYTLTFVYKVAAMD FIFKDDFAELRTRI	120
V7 AgrA	61	QLSTDINGIKLGSEIRKHDEVGNIIFVTSHSELYTLTFVYKVAAMD FIFKDDFAELRTRI	120
V15 AgrA	61	QLSTDINGIKLGSEIRKHDEVGNIIFVTSHSELYTLTFVYKVAAMD FIFKDDFAELRTRI	120
R93 AgrA	61	QLSTDINGIKLGSEIRKHDEVGNIIFVTSHSELYTLTFVYKVAAMD FIFKDDFAELRTRI	120
R9315 AgrA	61	QLSTDINGIKLGSEIRKHDEVGNIIFVTSHSELYTLTFVYKVAAMD FIFKDDFAELRTRI	120
COL AgrA	121	IDCLETAHTRLQLLSKDNSVETIELKRGNSVYVQYDDIMFFESSTKSHRLIAHLNDRQI	180
T116 AgrA	121	IDCLETAHTRLQLLSKDNSVETIELKRGNSVYVQYDDIMFFESSTKSHRLIAHLNDRQI	180
R137 AgrA	121	IDCLETAHTRLQLLSKDNSVETIELKRGNSVYVQYDDIMFFESSTKSHRLIAHLNDRQI	180
V1 AgrA	121	IDCLETAHTRLQLLSKDNSVETIELKRGNSVYVQYDDIMFFESSTKSHRLIAHLNDRQI	180
V3 AgrA	121	IDCLETAHTRLQLLSKDNSVETIELKRGNSVYVQYDDIMFFESSTKSHRLIAHLNDRQI	180
V5 AgrA	121	IDCLETAHTRLQLLSKDNSVETIELKRGNSVYVQYDDIMFFESSTKSHRLIAHLNDRQI	180
V7 AgrA	121	IDCLETAHTRLQLLSKDNSVETIELKRGNSVYVQYDDIMFFESSTKSHRLIAHLNDRQI	180
V15 AgrA	121	IDCLETAHTRLQLLSKDNSVETIELKRGNSVYVQYDDIMFFESSTKSHRLIAHLNDRQI	180
R93 AgrA	121	IDCLETAHTRLQLLSKDNSVETIELKRGNSVYVQYDDIMFFESSTKSHRLIAHLNDRQI	180
R9315 AgrA	121	IDCLETAHTRLQLLSKDNSVETIELKRGNSVYVQYDDIMFFESSTKSHRLIAHLNDRQI	180
COL AgrA	181	EFYGNLKELSCLDDRFFRCHNSFVVNRHNIESIDSKERIVYFKNKEHCYASVRNVKKI	239
T116 AgrA	181	EFYGNLKELSCLDDRFFRCHNSFVVNRHNIESIDSKERIVYFKNKEHCYASVRNVKKI	239
R137 AgrA	181	EFYGNLKELSCLDDRFFRCHNSFVVNRHNIESIDSKERIVYFKNKEHCYASVRNVKKI	239
V1 AgrA	181	EFYGNLKELSCLDDRFFRCHNSFVVNRHNIESIDSKERIVYFKNKEHCYASVRNVKKI	239
V3 AgrA	181	EFYGNLKELSCLDDRFFRCHNSFVVNRHNIESIDSKERIVYFKNKEHCYASVRNVKKI	239
V5 AgrA	181	EFYGNLKELSCLDDRFFRCHNSFVVNRHNIESIDSKERIVYFKNKEHCYASVRNVKKI	239
V7 AgrA	181	EFYGNLKELSCLDDRFFRCHNSFVVNRHNIESIDSKERIVYFKNKEHCYASVRNVKKI	239
V15 AgrA	181	EFYGNLKELSCLDDRFFRCHNSFVVNRHNIESIDSKERIVYFKNKEHCYASVRNVKKI	239
R93 AgrA	181	EFYGNLKELSCLDDRFFRCHNSFVVNRHNIESIDSKERIVYFKNKEHCYASVRNVKKI	239
R9315 AgrA	181	EFYGNLKELSCLDDRFFRCHNSFVVNRHNIESIDSKERIVYFKNKEHCYASVRNVKKI	239

Figura 4.7 - Sequência de aminoácidos da proteína AgrA. As identidades estão coloridas.

4.2.3.2 Locus *sarA*

Todas as cepas apresentaram a mesma sequência da proteína SarA, conforme é mostrado na figura 4.8, que tem a sequência de aminoácidos prevista desta proteína a partir da sequência de DNA obtida. As sequências da proteína SarA das cepas N315 e Mu50 foram obtidas no GeneBank (accession numbers NC_002745 e NC_002758, respectivamente).

Figura 4.8 – Sequência de aminoácidos da proteína SarA. As identidades estão coloridas.

Há divergência, na literatura, sobre o início e o final das ORFs 3 e 4, uma vez que a função exata destas proteínas ainda não está totalmente clara. Como as regiões intergênicas entre *sarA*, *ORF3* e *ORF4* contêm os promotores P1 e P3 e a região *upstream* de *ORF4* contém o promotor P2 (figura 3.5), a integridade da sequência de DNA compreendida entre o início do promotor P2 e o início do gene *sarA* é importante para o funcionamento do sistema *sarA*. As sequências de DNA desta região das cepas estudadas

e das cepas N315 e Mu50 foram comparadas uma com a outra (figura 4.9). As sequências de DNA das cepas N315 e Mu50 foram obtidas no GeneBank (accession numbers NC_002745 e NC_002758, respectivamente).

A cepa R137 apresentou quatro mutações de substituição: (A→T) na posição 33; (A→G) na posição 348; (T→C) na posição 437; e (T→G) na posição 473. Todas as cepas estudadas apresentaram divergências pontuais em relação às sequências das cepas N315 e Mu50 nas posições 137 (A→G) , 420 (T→G) e 685 (G→T).

	10	20	30	40	50	60	70	80
N315 Sar region	TCACAGGCATT	ATACCTTTT	TAACATTAT	TTTAAATT	TAACCTTT	AGCTTAT	CATTTT	AACCTTGT
Mu50 Sar region	TCACAGGCATT	ATACCTTTT	TAACATTAT	TTTAAATT	TAACCTTT	AGCTTAT	CATTTT	AACCTTGT
V1Consensus	TCACAGGCATT	ATACCTTTT	TAACATTAT	TTTAAATT	TAACCTTT	AGCTTAT	CATTTT	AACCTTGT
V3 consensus	TCACAGGCATT	ATACCTTTT	TAACATTAT	TTTAAATT	TAACCTTT	AGCTTAT	CATTTT	AACCTTGT
V5 consensus	TCACAGGCATT	ATACCTTTT	TAACATTAT	TTTAAATT	TAACCTTT	AGCTTAT	CATTTT	AACCTTGT
V7 Consensus	TCACAGGCATT	ATACCTTTT	TAACATTAT	TTTAAATT	TAACCTTT	AGCTTAT	CATTTT	AACCTTGT
V15 consensus	TCACAGGCATT	ATACCTTTT	TAACATTAT	TTTAAATT	TAACCTTT	AGCTTAT	CATTTT	AACCTTGT
R93 consensus	TCACAGGCATT	ATACCTTTT	TAACATTAT	TTTAAATT	TAACCTTT	AGCTTAT	CATTTT	AACCTTGT
R9315 consensus	TCACAGGCATT	ATACCTTTT	TAACATTAT	TTTAAATT	TAACCTTT	AGCTTAT	CATTTT	AACCTTGT
R137 consensus	TCACAGGCATT	ATACCTTTT	TAACATTAT	TTTAAATT	TAACCTTT	AGCTTAT	CATTTT	AACCTTGT
	110	120	130	140	150	160	170	180
N315 Sar region	TAAAAATC	TTTACAAA	AGCGTT	CATTGGG	TAGTAT	CTTTCAC	ACAACAA	ATTTT
Mu50 Sar region	TAAAAATC	TTTACAAA	AGCGTT	CATTGGG	TAGTAT	CTTTCAC	ACAACAA	ATTTT
V1Consensus	TAAAAATC	TTTACAAA	AGCGTT	CATTGGG	TAGTAT	CTTTCAC	ACAACAA	ATTTT
V3 consensus	TAAAAATC	TTTACAAA	AGCGTT	CATTGGG	TAGTAT	CTTTCAC	ACAACAA	ATTTT
V5 consensus	TAAAAATC	TTTACAAA	AGCGTT	CATTGGG	TAGTAT	CTTTCAC	ACAACAA	ATTTT
V7 Consensus	TAAAAATC	TTTACAAA	AGCGTT	CATTGGG	TAGTAT	CTTTCAC	ACAACAA	ATTTT
V15 consensus	TAAAAATC	TTTACAAA	AGCGTT	CATTGGG	TAGTAT	CTTTCAC	ACAACAA	ATTTT
R93 consensus	TAAAAATC	TTTACAAA	AGCGTT	CATTGGG	TAGTAT	CTTTCAC	ACAACAA	ATTTT
R9315 consensus	TAAAAATC	TTTACAAA	AGCGTT	CATTGGG	TAGTAT	CTTTCAC	ACAACAA	ATTTT
R137 consensus	TAAAAATC	TTTACAAA	AGCGTT	CATTGGG	TAGTAT	CTTTCAC	ACAACAA	ATTTT
	210	220	230	240	250	260	270	280
N315 Sar region	AATGTTAT	TTTTTAA	TAAATTA	ACACCA	AAATTA	ATAGCA	AAAAAT	TATGTT
Mu50 Sar region	AATGTTAT	TTTTTAA	TAAATTA	ACACCA	AAATTA	ATAGCA	AAAAAT	TATGTT
V1Consensus	AATGTTAT	TTTTTAA	TAAATTA	ACACCA	AAATTA	ATAGCA	AAAAAT	TATGTT
V3 consensus	AATGTTAT	TTTTTAA	TAAATTA	ACACCA	AAATTA	ATAGCA	AAAAAT	TATGTT
V5 consensus	AATGTTAT	TTTTTAA	TAAATTA	ACACCA	AAATTA	ATAGCA	AAAAAT	TATGTT
V7 Consensus	AATGTTAT	TTTTTAA	TAAATTA	ACACCA	AAATTA	ATAGCA	AAAAAT	TATGTT
V15 consensus	AATGTTAT	TTTTTAA	TAAATTA	ACACCA	AAATTA	ATAGCA	AAAAAT	TATGTT
R93 consensus	AATGTTAT	TTTTTAA	TAAATTA	ACACCA	AAATTA	ATAGCA	AAAAAT	TATGTT
R9315 consensus	AATGTTAT	TTTTTAA	TAAATTA	ACACCA	AAATTA	ATAGCA	AAAAAT	TATGTT
R137 consensus	AATGTTAT	TTTTTAA	TAAATTA	ACACCA	AAATTA	ATAGCA	AAAAAT	TATGTT
	310	320	330	340	350	360	370	380
N315 Sar region	AAATGC	ACAAC	CTTTT	TAATTA	ATTCATT	GAGTCC	AGTTT	CAAAAA
Mu50 Sar region	AAATGC	ACAAC	CTTTT	TAATTA	ATTCATT	GAGTCC	AGTTT	CAAAAA
V1Consensus	AAATGC	ACAAC	CTTTT	TAATTA	ATTCATT	GAGTCC	AGTTT	CAAAAA
V3 consensus	AAATGC	ACAAC	CTTTT	TAATTA	ATTCATT	GAGTCC	AGTTT	CAAAAA
V5 consensus	AAATGC	ACAAC	CTTTT	TAATTA	ATTCATT	GAGTCC	AGTTT	CAAAAA
V7 Consensus	AAATGC	ACAAC	CTTTT	TAATTA	ATTCATT	GAGTCC	AGTTT	CAAAAA
V15 consensus	AAATGC	ACAAC	CTTTT	TAATTA	ATTCATT	GAGTCC	AGTTT	CAAAAA
R93 consensus	AAATGC	ACAAC	CTTTT	TAATTA	ATTCATT	GAGTCC	AGTTT	CAAAAA
R9315 consensus	AAATGC	ACAAC	CTTTT	TAATTA	ATTCATT	GAGTCC	AGTTT	CAAAAA
R137 consensus	AAATGC	ACAAC	CTTTT	TAATTA	ATTCATT	GAGTCC	AGTTT	CAAAAA
	410	420	430	440	450	460	470	480
N315 Sar region	TCAATCG	GAATA	ACGTA	ATAC	ACTTAA	ACGTG	CTAT	ACATT
Mu50 Sar region	TCAATCG	GAATA	ACGTA	ATAC	ACTTAA	ACGTG	CTAT	ACATT
V1Consensus	TCAATCG	GAATA	ACGTA	ATAC	ACTTAA	ACGTG	CTAT	ACATT
V3 consensus	TCAATCG	GAATA	ACGTA	ATAC	ACTTAA	ACGTG	CTAT	ACATT
V5 consensus	TCAATCG	GAATA	ACGTA	ATAC	ACTTAA	ACGTG	CTAT	ACATT
V7 Consensus	TCAATCG	GAATA	ACGTA	ATAC	ACTTAA	ACGTG	CTAT	ACATT
V15 consensus	TCAATCG	GAATA	ACGTA	ATAC	ACTTAA	ACGTG	CTAT	ACATT
R93 consensus	TCAATCG	GAATA	ACGTA	ATAC	ACTTAA	ACGTG	CTAT	ACATT
R9315 consensus	TCAATCG	GAATA	ACGTA	ATAC	ACTTAA	ACGTG	CTAT	ACATT
R137 consensus	TCAATCG	GAATA	ACGTA	ATAC	ACTTAA	ACGTG	CTAT	ACATT
	510	520	530	540	550	560	570	580
N315 Sar region	TAAATTA	AAAAAA	TTTAT	AAAAA	TTTTT	CATTTT	TAGTCA	AAAA
Mu50 Sar region	TAAATTA	AAAAAA	TTTAT	AAAAA	TTTTT	CATTTT	TAGTCA	AAAA
V1Consensus	TAAATTA	AAAAAA	TTTAT	AAAAA	TTTTT	CATTTT	TAGTCA	AAAA
V3 consensus	TAAATTA	AAAAAA	TTTAT	AAAAA	TTTTT	CATTTT	TAGTCA	AAAA
V5 consensus	TAAATTA	AAAAAA	TTTAT	AAAAA	TTTTT	CATTTT	TAGTCA	AAAA
V7 Consensus	TAAATTA	AAAAAA	TTTAT	AAAAA	TTTTT	CATTTT	TAGTCA	AAAA
V15 consensus	TAAATTA	AAAAAA	TTTAT	AAAAA	TTTTT	CATTTT	TAGTCA	AAAA
R93 consensus	TAAATTA	AAAAAA	TTTAT	AAAAA	TTTTT	CATTTT	TAGTCA	AAAA
R9315 consensus	TAAATTA	AAAAAA	TTTAT	AAAAA	TTTTT	CATTTT	TAGTCA	AAAA
R137 consensus	TAAATTA	AAAAAA	TTTAT	AAAAA	TTTTT	CATTTT	TAGTCA	AAAA

Figura 4.9 - Sequência de DNA compreendida entre o início do promotor P2 e o início do gene *sarA*. As identidades estão coloridas.

5. Discussão

5.1 Determinação da CIM de vancomicina

A determinação da CIM de oxacilina pela técnica da macrodiluição em ágar mostrou-se acurada uma vez que identificou corretamente o fenótipo das cepas padrão em relação às suas sensibilidades à oxacilina. As CIMs de oxacilina obtidas para as cepas portadoras do gene *mecA* foram condizentes com esta característica das cepas. Já a determinação da CIM de vancomicina pela técnica da macrodiluição em ágar apresentou resultados diferentes dependendo do meio de cultura utilizado. As CIMs obtidas quando ágar BHI foi empregado foram expressivamente mais altas do que as obtidas com o emprego de ágar MH. A determinação da CIM com ágar MH não conseguiu identificar corretamente o fenótipo das cepas VISA (VISA1, VISA3, VISA5, VISA7 e VISA 15) em relação à sua sensibilidade a vancomicina. A determinação da CIM de vancomicina em meio BHI apresentou CIMs condizentes com os valores esperados para cada cepa. WALSH *et al.* (2001) avaliaram que o meio BHI apresenta maior especificidade e sensibilidade na detecção de resistência a vancomicina em comparação ao meio MH, que é indicado para determinação de CIM pelo CLSI (CLSI, 2006). Isto sugere que a pesquisa de cepas com fenótipo VISA apenas por meio da determinação da CIM por macrodiluição conforme as recomendações do CLSI não é eficiente para a correta identificação do fenótipo, sendo portanto, necessária a adoção de outras técnicas mais sensíveis tal como a triagem em ágar BHI suplementado com 6µg/mL de

vancomicina (HIRAMATSU *et al.*, 1997). A determinação da CIM em ágar BHI não foi, todavia, sensível o suficiente para a detecção da sub-população resistente a vancomicina de cepas hetero-VISA, uma vez que as cepas HVISA apresentaram uma $CIM \leq 4\mu\text{g/mL}$. Este fato deve-se provavelmente ao baixo inóculo utilizado em cada placa, de apenas 5×10^5 células, que não é representativo da sub-população resistente que ocorre em frequências na ordem de 10^{-6} (HIRAMATSU *et al.*, 1997a).

A CIM obtida para a cepa Mu50 em ágar BHI ($4\mu\text{g/mL}$) não é condizente com a literatura que reporta a sua CIM como sendo igual a $8\mu\text{g/mL}$ (HIRAMATSU *et al.*, 1997b). Isto se deve ao fato da cepa Mu50 já ter sido extensivamente repicada na ausência de vancomicina, fazendo com que ela perca esta característica fenotípica de ser intermediária a vancomicina ($CIM > 4\mu\text{g/mL}$), o que já foi descrito por vários outros autores (BOYLE-VAVRA *et al.*, 2000; HANAKI *et al.*, 1998; SAKOULAS *et al.*, 2002).

Todas as cepas não-VISA e não-heteroVISA apresentaram CIMs $\leq 4\mu\text{g/mL}$. Apenas 3 de 37 cepas (8,1%) apresentaram uma $CIM = 4\mu\text{g/mL}$. As cepas induzidas à resistência a vancomicina (R93-15, N315-15 e ATCC25923-15), que apresentaram crescimento em $15\mu\text{g/mL}$ de vancomicina mostraram ter uma CIM de vancomicina igual a $32\mu\text{g/mL}$, o que as caracterizaria como sendo *S. aureus* resistentes a vancomicina (VRSA). O mecanismo que levou a esta resistência de alto nível a vancomicina não foi pesquisado extensivamente, mas o seu estudo seria de valor para o entendimento do surgimento da resistência a vancomicina. Curiosamente, as CIMs de oxacilina das cepas resistentes a este antibiótico

(R93 – CIM = 512 $\mu\text{g/mL}$ e N315 – CIM = 256 $\mu\text{g/mL}$) diminuíram para 32 $\mu\text{g/mL}$. Isto pode ter ocorrido porque a resistência a vancomicina atingida pelas cepas provavelmente foi conseguida pelo espessamento da parede celular das células. A fisiologia desta parede celular mais grossa provavelmente encontra-se alterada em relação a uma parede celular de espessura normal, o que dificulta a ativação do gene *mecA* pelos genes do SCC*mec*, que têm a função de detectar a presença de antibióticos beta-lactâmicos e ativar a expressão do gene *mecA* resultando na síntese de PBP2a. A espessura da parede celular possivelmente afetaria a capacidade da célula detectar a presença de antibióticos beta-lactâmicos de forma eficiente. A cepa ATCC25923, sensível a oxacilina (CIM = 1 $\mu\text{g/mL}$) quando induzida à resistência a vancomicina apresentou uma CIM de oxacilina mais alta (8 $\mu\text{g/mL}$) que a original. Isto provavelmente pode ser explicado, novamente, por um suposto espessamento da parede celular da célula. Apesar de não conter o gene *mecA*, e portanto não expressar PBP2a, a parede celular mais grossa deve conter um maior número de moléculas de PBP2 constitutiva, o que leva uma maior concentração de oxacilina para inibir o seu crescimento.

5.2 Determinação da capacidade hemolítica das cepas

Staphylococcus aureus é uma espécie que apresenta a capacidade de causar hemólise. A cepa padrão ATCC25923 apresentou uma grande atividade hemolítica em sangue de carneiro e coelho validando portanto, a técnica de mensuração de hemólise aqui desenvolvida.

Observou-se uma ampla variabilidade na atividade hemolítica das amostras, que apresentaram desde a ausência de hemólise até a hemólise mais forte que as cepas padrão, tanto em sangue de carneiro como de coelho. O desvio padrão de todas as amostras clínicas foi maior do que a média, tanto no caso de hemólise em sangue de coelho quanto em sangue de carneiro. As expressões de alfa-hemolisina e de beta-hemolisina parecem ser independentes uma da outra. Como o locus *agr* regula positivamente tanto a expressão de alfa hemolisina quanto de beta hemolisina (NOVICK, 2003), a discrepância entre a expressão de cada uma destas hemolisinas dentro de uma mesma cepa sugere que a ausência da expressão de uma determinada hemolisina seja devida provavelmente à ausência do gene (*hla* ou *hlb*) e não a um defeito do locus *agr*, caso contrário, perceber-se-ia uma perda de hemólise tanto em ágar sangue de carneiro como de coelho.

A maior parte das cepas testadas não apresentou hemólise em sangue de carneiro. A produção de beta hemolisina, na maioria das cepas, ou era muito alta (perto de 100%), ou era muito baixa (perto de 10%), o que indica que provavelmente a ausência de expressão deve-se à ausência do gene *hla*. De fato, em estudo feito por Reinert (2006), ficou caracterizado que a maioria das cepas portadoras do SCC*mec* tipo III não possui o gene *hla*. Quanto à expressão de alfa-hemolisina, os valores foram mais diversos, algumas cepas atingindo valores médios, o que foi evidenciado pelo desvio padrão mais alto obtido para sangue de coelho em relação ao de carneiro. Não houve correlação direta entre a quantidade de hemólise e a CIM de vancomicina, tanto quanto à hemólise em sangue de carneiro como em

sangue de coelho, todavia observamos que todas as cepas VISA e hetero-VISA são não-hemolíticas para sangue de carneiro, assim como todas as outras cepas VISA já estudadas no mundo (SAKOULAS *et al.*, 2002). A correlação entre ausência de hemólise em sangue de carneiro e resistência a vancomicina como sugere Sakoulas *et al.* (2002) é falaciosa, pois a falta de hemólise provavelmente é devida ao fato da cepa não portar o gene *hly*, e não devido a alguma alteração na regulação da expressão deste gene por parte de loci reguladores de genes acessórios.

A expressão de delta hemolisina, que indicaria a funcionalidade do locus *agr* também apresentou-se de forma variada. Pode-se observar, na tabela 4.2, que a expressão de delta hemolisina parece não ocorrer exclusivamente em um determinado grupo ou em cepas com uma determinada característica fenotípica. Dentre as cepas VISA, uma (VISA15) é produtora de delta hemolisina, enquanto que as outras não o são.

A técnica desenvolvida por Sakoulas *et al.* (2002) para medir a expressão de delta hemolisina e, portanto, inferir a funcionalidade do locus *agr* parece não corroborar com a integridade funcional do locus, pois determinadas cepas que tiveram a integridade física do locus verificadas por seqüenciamento (VISA01, VISA05, VISA07, VISA15 e R93) apresentaram ausência da expressão de delta hemolisina através desta técnica. Este fato pode ter ocorrido devido à existência de outros fatores que possam interferir no funcionamento do locus *agr*, como, por exemplo, o sistema TRAP/RAP (BALABAN *et al.*, 2001) que também modula a expressão de RNAlII e portanto de delta hemolisina, que é transcrita junto com RNAlII. Sabe-se

também que outros loci reguladores também influenciam na expressão de RNAlII, todavia, parece improvável a atuação de um outro locus na expressão de RNAlII a ponto de impedir a sua transcrição. Parece ser mais plausível que o ensaio proposto por Sakoulas *et al.* (2002) não seja sensível e/ou específico o suficiente para detectar a expressão de delta-hemolisina.

Parece, portanto, que as propriedades hemolíticas de uma determinada cepa não está relacionada com a sua linhagem clonal, e não serve como marcador de resistência à vancomicina, ou de qualquer outra característica fenotípica a não ser a própria capacidade de hemólise.

5.3 Capacidade de adesão ao poliestireno

Ao contrário do que se era esperado, as cepas VISA e hetero-VISA não apresentaram maior adesão em relação às demais cepas. Como pode ser visto na tabela 4.3, as cepas com sensibilidade reduzida à vancomicina apresentaram uma variabilidade muito grande de adesão. A cepa VISA 5 apresentou uma adesão menor do que a adesão média – 1DP (0,256). Isto sugere que a capacidade de adesão ao poliestireno não está relacionada à aquisição de resistência a vancomicina, como sugere Sakoulas *et al.* (2002), tanto que, se fosse condição vital para a resistência a vancomicina, todas as cepas VISA apresentariam valores de adesão similares. As cepas hetero-VISA também não se destacaram pela sua adesão, todas ficando com valores perto da média $\pm$ 1DP.

Quanto às cepas não VISA, no ensaio sem etanol, algumas cepas (HVISA138, R36, R79, R106, T482, T551) apresentaram uma adesão maior

do que a média + 1 desvio padrão (0,546). Todas estas cepas carregam o *SCCmec* tipo III. As cepas HVISA138, R36, R79 e R106 pertencem ao CEB, enquanto que não se tem informação da clonalidade das cepas T482 e T551 mas é possível que pertençam a este clone. A falta de proeminência da adesão de clones diferentes do CEB pode sugerir que esta linhagem tem uma predisposição a maior capacidade de adesão em fase estacionária, por outro lado, nem todas as cepas pertencentes ao CEB apresentam um valor alto de adesão, inclusive, o valor mais baixo obtido (0,013) no ensaio pertence a uma cepa do CEB (R128).

A cepa RN9120, que tem um genótipo *agr knockout* (ausência do locus *agr*), apresentou uma adesão dentro da faixa compreendida pela média $\pm$ 1DP, assim como a cepa RN6607 que é arquétipo de *agr* funcional. As adesões mostradas por estas duas cepas foram praticamente idênticas, o que sugere que o locus *agr* não participa da regulação da expressão de adesão em fase estacionária.

Esta técnica, originalmente desenvolvida por Christensen *et al.* (1985), classifica cepas em não aderentes ($Abs_{540} < 0,120$), cepas fracamente aderentes ($0,120 > Abs_{540} > 0,240$) e cepas fortemente aderentes ($Abs_{540} > 0,240$). Levando em consideração este critério, as cepas VISA seriam classificadas todas como fortemente aderentes, exceto a cepa VISA3 que seria classificada como fracamente aderente. De todas as amostras estudadas, 39 das 47 cepas (83%) também seriam classificadas como fortemente aderentes, o que sugere que ser fortemente aderente é

uma característica inerente de cepas MRSA nosocomiais brasileiras, e não apenas de cepas com sensibilidade reduzida à vancomicina.

Em consulta à literatura disponível sobre adesão e loci reguladores em *S. aureus*, percebe-se que alterações no locus *agr* levam a efeitos pleiotrópicos da adesão, em que a expressão de diferentes proteínas de superfície são afetadas de maneira diferente com uma única alteração do locus regulador. A adesão a certas superfícies pode ficar afetada enquanto a adesão a outras não (PRATTEN *et al.*, 2001). Novick (2003) ainda relata que várias proteínas de superfície não são reguladas pelo sistema *agr*. Algumas destas proteínas que são responsáveis por adesão seriam reguladas pelo locus *sarA*, enquanto outras ainda não se sabe como são reguladas. O impacto do locus *agr* na formação de biofilmes foi estudado por Yarwood *et al.* (2004), que concluiu que o papel que o sistema *agr* tem na formação de biofilmes depende de fatores ambientais. O ensaio de adesão em poliestireno feito neste estudo é apenas uma aproximação dos eventos que levam à formação de biofilmes *in vivo*, logo, os resultados obtidos aqui não podem eximir o locus *agr* de participar da formação de biofilmes *in vivo*.

5.4 Indução *in vitro* da resistência à vancomicina

Duas das 18 cepas escolhidas para o estudo não conseguiram ser induzidas. Uma destas cepas é uma cepa hetero-VISA (HV135), que deveria ter uma predisposição forte a adquirir resistência à vancomicina, e no entanto, esta não conseguiu crescer numa concentração igual à sua CIM original (2µg/mL). A outra cepa que não conseguiu crescer em 2µg/mL de

vancomicina foi a R63, que não tem um fenótipo ou genótipo que necessariamente se destaca de alguma das demais. Todas as outras cepas cresceram em concentrações altas de vancomicina e levaram um número de dias diferente para conseguir fazê-lo. Não houve nenhuma determinada característica fenotípica ou genotípica (como por exemplo, quantidade de hemólise, ou linhagem, ou grupo *agr*) que levasse a cepa a crescer mais rapidamente em concentrações mais altas do antibiótico. Cepas sensíveis à oxacilina (T116, T551, RN9120, RN6607 e ATCC25923) não conseguiram crescer em concentrações altas de vancomicina em tempo substancialmente maior que as cepas MRSA. Considerando-se os resultados obtidos neste experimento, parece, portanto, não existir predisposição à aquisição de resistência a vancomicina. Esta constatação pode, todavia, ser falaciosa uma vez que há de se lembrar que ao se transferir uma alíquota de 50 μ L, com uma quantidade finita de células para um meio com uma concentração maior de vancomicina, o número de células mutantes previamente adaptadas ao crescimento na nova concentração e que serão selecionadas pelo antibiótico varia de acordo com o simples acaso. Se a mutação que as predispõem a prevalecer na concentração mais alta ocorrer mais cedo na cultura de células, o número de mutantes será mais alto, enquanto que se ocorrer mais tardiamente o número de células mutantes inoculadas será menor ou até nulo. Por esta técnica, a sorte é um fator inerente aos resultados obtidos.

Para descobrir se realmente uma cepa tem predisposição para adquirir resistência à vancomicina, é necessário medir a taxa de mutação

que leva a esta resistência, o que foi feito para algumas cepas no estudo da taxa de mutação que leva à capacidade de crescimento em 6 µg/mL de vancomicina.

5.5 Determinação da taxa de mutação que leva à capacidade de crescimento em 6µg/mL de vancomicina.

O estudo de flutuação mostrou-se eficiente para determinar a taxa de mutação que permite o crescimento em 6 µg/mL de vancomicina, uma vez que todas as cepas testadas conseguiram gerar mutantes suficientes para atingir uma distribuição calculável. A concentração de 6 µg/mL de antibiótico foi escolhida porque não é tão alta a ponto de exigir uma taxa de mutação demasiadamente alta para ser calculada, mas ao mesmo tempo permite o crescimento apenas de cepas com resistência a vancomicina (sensibilidade é considerada como uma $CIM \leq 4\mu\text{g/mL}$). As taxas de mutação apresentadas foram variadas, o que sugere predisposição de algumas cepas em relação a outras. O método de Jones só pôde ser aplicado a uma única cepa (R93) porque a taxa de mutação foi grande o suficiente para resultar numa mediana de mutantes (r_m) maior do que 0. O resultado obtido para esta cepa, por este método ($4,40 \times 10^{-9}$), foi condizente com o obtido para a mesma cepa quando a equação de Luria-Delbrück foi utilizada ($4,71 \times 10^{-9}$), o que é indicativo da acurácia das técnicas.

A cepa que apresentou a maior taxa de mutação foi a cepa R93, a única pertencente ao CEB. A taxa de mutação apresentada pela cepa R93 foi aproximadamente 10 vezes maior do que as demais, o que sugere uma

alta predisposição para a aquisição de resistência a vancomicina por sua parte. A cepa que apresentou a menor taxa de mutação foi a cepa R222 ($5,94 \times 10^{-11} \text{ ger}^{-1}$), que era a única portadora do SCCmec tipo IV. A cepa ATCC25923, sensível não só a vancomicina e oxacilina, mas também à maioria dos antibióticos apresentou a segunda taxa de mutação mais alta ($1,25 \times 10^{-9} \text{ ger}^{-1}$), o que sugere que resistência a outros antibióticos não é fator predisponente à aquisição de resistência a vancomicina. As outras cepas estudadas apresentaram taxas de mutação similares, todas na ordem de $10^{-10} \text{ ger}^{-1}$. A cepa RN9120 (*agr* ausente) apresentou uma taxa de mutação 3 vezes maior do que a cepa que deu a sua origem, a RN6607 (*agr* grupo II, funcional), o que pode sugerir que a falta do sistema *agr* resulte numa leve predisposição à aquisição de resistência a vancomicina, todavia o seu impacto parece ser menor do que outros fatores, ainda desconhecidos, que levam a taxas tão altas quanto as observadas nas cepas R93 e ATCC25923. As cepas pertencentes ao grupo *agr* II (RN6607 e R222) não apresentaram predisposição à aquisição de resistência, como havia sugerido Sakoulas *et al.* (2002) e Moise-Broder *et al.* (2004). Certamente é precoce afirmar que as cepas do CEB estejam predispostas a adquirir resistência a vancomicina baseado no resultado de apenas 1 única cepa. Seria necessário aumentar o número de amostras e repetir o experimento para confirmar que estes resultados são reproduzíveis e que a técnica é confiável. Apesar do âmbito deste trabalho não abranger o escopo necessário para determinar a questão sem ambigüidade, uma vez que número de culturas necessárias seria proibitivo, os resultados aqui apresentados servem como

indícios preliminares da ocorrência de predisposição à aquisição de resistência a vancomicina.

As taxas relativamente altas obtidas por todas as cepas, especialmente pela cepa R93 sugere que o surgimento de resistência a vancomicina é um evento relativamente comum. A pesquisa de VISA e hetero-VISA em placas de ágar screening vancomicina (BHI suplementado com 6µg/mL de vancomicina) requer um inóculo maior do que 10^6 células, porque as sub-populações resistentes a vancomicina numa cepa hetero-VISA ocorre a uma frequência aproximada de 10^{-6} . Todavia, pode-se concluir a partir deste estudo que o inóculo não pode ser maior do que 10^9 pois numa dada população de 10^9 células de *S. aureus*, haveria a possibilidade de se encontrar pelo menos uma célula que cresceria na placa com vancomicina, o que resultaria num teste falso-positivo.

Este experimento também chama a atenção para a frequência relativamente alta em que taxas de mutação para diversos fenótipos ocorrem. Por este motivo, o estudo de cepas clínicas, feita na rotina do laboratório clínico, em relação a qualquer fenótipo, seja ele relacionado com a identificação da cepa ou pesquisa de sensibilidade a antibióticos, deve sempre ser feito com cepas que foram repicadas o menor número de vezes possível, pois caso contrário a cepa repicada pode apresentar inúmeras mutações para fenótipos diversos que seriam selecionados nos testes microbiológicos.

5.6 Determinação do grupo *agr* por PCR

A maioria das cepas MRSA estudadas pertencem ao grupo *agr* I, inclusive as cepas VISA. Um estudo por Moise-Broder *et al.* (2004) sugere que as cepas MRSA pertencentes ao grupo *agr* II têm maior predisposição a desenvolver resistência a vancomicina, baseado no fato de que as cepas VISA encontradas nos Estados Unidos e no Japão pertencem ao grupo II, e também num estudo retrospectivo que eles conduziram que determinou que a maioria dos pacientes com infecção por uma cepa do grupo II não respondeu à terapia com vancomicina. Isto pode ocorrer porque a prevalência de cepas pertencentes ao grupo II é alta e, portanto, cepas que adquiriram tolerância a vancomicina ao longo do tempo têm grande chance de pertencerem ao grupo *agr* II. No nosso estudo, determinamos que cepas pertencentes ao grupo *agr* I também podem tornar-se resistentes à vancomicina, ao contrário do que foi sugerido em outros estudos (SAKOULAS *et al.*, 2003, 2002; MOISE-BRODER *et al.*, 2004).

A técnica de PCR multiplex descrita por Gilot *et al.* (2002) é muito boa para determinar rapidamente o grupo *agr*, todavia, requer uma cuidadosa padronização inicial com a utilização de cepas padrão. Algumas cepas não puderam ser tipadas por esta técnica e, foram avaliadas pela técnica de PCR-RFLP, que resolveu a tipagem sem maiores problemas. Esta dificuldade em tipar pela técnica de Gilot *et al.* (2002) provavelmente deveu-se às limitações operacionais da técnica de PCR (pureza dos reagentes ou do DNA extraído) e não a mutações na cepa, uma vez que estas cepas

apresentaram um perfil de restrição igual ao de cepas padrão por PCR-RFLP.

5.7 PCR-RFLP dos segmentos do locus *agr*.

Todas as cepas selecionadas apresentaram o mesmo perfil de restrição para cada segmento submetido à análise de restrição (PCR-RFLP). Como vimos nos resultados de seqüenciamento, as cepas escolhidas não são todas geneticamente iguais, porém os perfis de restrição das cepas com seqüências diferentes permanecem iguais ou tão semelhantes a ponto de serem indetectáveis por RFLP. Para distinguir entre dois grupos de *agr* diferentes ou entre cepas do mesmo grupo com origens clonais diferentes, a técnica de PCR-RFLP é adequada para perceber estas diferenças (VAN LEEUWEN *et al.*, 2000), porém como vimos neste estudo, esta técnica não é sensível o suficiente para detectar as pequenas mutações que podem ocorrer dentre cepas pertencentes ao mesmo grupo *agr* e à mesma linhagem.

5.8 Sequenciamento de DNA

Todas as cepas escolhidas para seqüenciamento apresentaram as seqüências (traduzidas) dos genes *agrB* e *agrD* íntegras. A maioria dos polimorfismos encontrada e das mutações ocorreu no gene *agrC*. O gene *agrC* da cepa VISA03 apresentou várias inserções de bases. Isto levou a uma mutação tipo *frameshift* que resulta num erro na seqüência de aminoácidos da proteína AgrC desta cepa a partir do aminoácido 68. A

proteína AgrC da cepa VISA03 certamente é não funcional, comprometendo a funcionalidade do locus *agr* como locus regulador.

Os polimorfismos encontrados em outros locais, tanto na proteína AgrC quanto na proteína AgrA, nas demais cepas estudadas parecem ser polimorfismos funcionais, pois houve a substituição de aminoácidos (e não inserção ou deleção, que levaria a mutações do tipo *frameshift*) por aminoácidos semelhantes. As cepas R137 e T116, apesar de serem de linhagens diferentes (inclusive, a primeira é MRSA e outra é MSSA), parecem estar relacionadas, pois apresentaram a mesma sequência de aminoácidos entre elas, que é ligeiramente diferente da sequência das demais cepas que apresentaram ser idênticas entre si (com exceção da cepa VISA 03).

A cepa R93 apresentou uma sequência de aminoácidos para todos os genes do locus *agr* igual à sua derivada induzida, com CIM de vancomicina >15 µg/mL, a cepa R93-15. Isto mostra que o mecanismo molecular pelo qual uma cepa adquire, primeiro, tolerância e depois resistência a vancomicina parece independe de mutações no locus *agr*, como foi sugerido por Sakoulas *et al.* (2002).

As cepas VISA que surgiram no Brasil têm características diferentes das cepas VISA originárias dos Estados Unidos e do Japão estudadas por Sakoulas *et al.* (2002). Nestes países, apesar da maior prevalência de cepas MRSA do grupo *agr* I, todas as cepas resistentes a vancomicina pertencem ao grupo II. No Brasil isto não ocorre. As cepas VISA brasileiras, bem como as cepas hetero-VISA estudadas, pertencem todas ao grupo *agr*

I, que também é o mais prevalente entre as cepas MRSA. Isto sugere que, ao contrário do que foi sugerido por Moise-Broder *et al.* (2004), não parece haver predisposição de um determinado grupo *agr* para adquirir resistência a vancomicina.

Vimos também que a especificidade do grupo *agr* não é dependente da linhagem clonal determinada por PFGE, pois apesar da grande maioria das cepas do clone endêmico brasileiro "A" pertencer ao grupo *agr* I, as cepas R253 e R191, que também são do clone A, pertencem aos grupos *agr* II e III, respectivamente. Isto mostra que o poder discriminatório da técnica de PFGE não é grande o suficiente para agrupar cepas verdadeiramente isogênicas.

Outra diferença que as cepas VISA brasileiras apresentam em relação às norte-americanas e japonesas é que nem todas apresentam mutações disfuncionais no locus *agr*. Foram encontradas mutações disfuncionais em todas as cepas VISA dos EUA e do Japão, enquanto que no Brasil, 4 das 5 cepas apresentam o locus *agr* íntegro. Apenas a cepa VISA03 apresenta uma mutação disfuncional, no gene *agrC*. Portanto, um locus *agr* disfuncional não é uma condição *sine qua non* para a aquisição de resistência a vancomicina, como suspeitava-se anteriormente (SAKOULAS *et al.*, 2002). A localização da mutação encontrada na cepa VISA03 (no gene *agrC*) é condizente com o tipo de mutações encontradas em outros estudos. Quando o locus *agr* sofre mutação que leva a perda de sua funcionalidade, geralmente isso ocorre no gene *agrC* ou na região intergênica entre *agrC* e *agrA* (SCHWAN *et al.*, 2003).

O gene *sarA* apresentou-se íntegro em todas as cepas. As diferenças nas sequências do locus apresentados pelas cepas em relação às cepas N315 e Mu50 parecem ser mutações polimórficas funcionais, uma vez que não são do tipo *frameshift*, que comprometeria uma grande parte da sequência da proteína. Ademais, as sequências do locus *sarA* foram divergentes entre linhagens diferentes, todavia foram constantes para cepas pertencentes ao mesmo clone (N315 e Mu50; as cepas VISA e R93; R137). A indução de resistência a vancomicina na cepa R93, gerando a cepa R93-15, não resultou em mutação do locus *sarA*, pois as sequências das cepas R93 e R93-15 são idênticas, o que significa que uma mutação no locus *sarA* não é uma condição *sine qua non* para o surgimento de resistência a vancomicina.

6. Conclusões

A correta identificação do fenótipo VISA não pode ser feita com o emprego de macrodiluição seriada de vancomicina conforme as recomendações do CLSI (2006). A macrodiluição seriada de vancomicina em ágar BHI identifica corretamente o fenótipo VISA mas não o fenótipo hetero-VISA.

O método desenvolvido no presente trabalho para a quantificação do poder hemolítico de cepas de *S. aureus* retornou valores tangíveis, identificando corretamente a cepa padrão ATCC25923 como sendo produtora de hemólise, o que valida o método.

Apesar da maioria das cepas estudadas terem perdido a capacidade de hemolisar sangue de carneiro (através da ação da beta-hemolisina), a hemólise de sangue de coelho (através da ação da alfa-hemolisina) apresentou-se bastante variada, mesmo dentro de um mesmo grupo fenotípico ou genotípico. Por exemplo, as cepas VISA, que são geneticamente relacionadas por PFGE, apresentam variada hemólise em sangue de coelho. A perda de hemólise em sangue de carneiro deve ser devido à ausência do gene *hly* e não devido a um problema de regulação da expressão deste gene por parte do locus *agr*.

Não houve correlação direta entre a quantidade de hemólise produzida por uma cepa e a sua CIM de vancomicina.

A determinação da produção de delta-hemolisina pelo método desenvolvido por Sakoulas *et al.* (2002) ou não identifica a produção de delta

hemolisina corretamente, ou não avalia corretamente a funcionalidade do locus *agr*.

A atividade hemolítica de uma determinada cepa não está relacionada com a sua linhagem clonal, e não serve como marcador de resistência à vancomicina, ou de qualquer outra característica fenotípica a não ser a própria capacidade de produzir hemólise.

A capacidade de aderir fortemente em poliestireno parece ser inerente a cepas MRSA nosocomiais brasileiras, e não apenas de cepas com sensibilidade reduzida a vancomicina. A adesão em poliestireno, todavia, pode não se correlacionar diretamente com a capacidade de formação de biofilme *in vivo* o que não descarta a participação do locus *agr* na formação de biofilmes em outras condições ambientais.

Estudos de indução de resistência através da passagem seriada de cepas sensíveis em meios de cultura contendo concentrações crescentes de antibiótico são falaciosos porque não medem a taxa de mutação que leva à capacidade de crescer em concentrações maiores que a CIM do antibiótico, uma vez que o número de mutantes repicados na concentração incremental é variável.

Através do cálculo da taxa de mutação que leva à capacidade de crescimento em 6 µg/mL de vancomicina em cepas pertencentes ao grupo *agr* I, II e III, determinou-se que cepas pertencentes ao grupo *agr* II não apresentam uma maior predisposição para a aquisição de resistência a vancomicina.

O surgimento de resistência a vancomicina em *S. aureus* é um evento relativamente comum, que ocorre aproximadamente a cada 10^{10} gerações celulares, o que ressalta a importância de não exceder um inóculo deste tamanho ao conduzir técnicas para a pesquisa de resistência a vancomicina por diluição em caldo, diluição em ágar ou em triagem em ágar BHI suplementado com 6 µg/mL de vancomicina.

A grande maioria das cepas do clone endêmico brasileiro "A" (CEB) é portadora do locus *agr* tipo I, e como esta linhagem é a mais prevalente dentre as MRSA no ambiente hospitalar, o locus *agr* tipo I também é o mais prevalente em ambientes nosocomiais. As cepas VISA brasileiras pertencem ao grupo *agr* I, de onde se conclui que portar o grupo *agr* II não é uma condição *sine qua non* para a aquisição de resistência a vancomicina.

A técnica de PCR-RFLP não é sensível o suficiente para avaliar a funcionalidade do locus *agr*, servindo apenas para a determinação do grupo polimórfico deste locus, todavia, a técnica desenvolvida por Gilot *et al.* (2000) é de mais fácil execução e identifica corretamente a grande maioria dos genótipos do *agr*.

Apesar da maioria das cepas pertencentes ao CEB apresentar um locus do grupo *agr* I, há a possibilidade de cepas pertencentes a este clone apresentarem um locus de um grupo diferente, o que sugere que a técnica de PFGE não tem um poder discriminatório suficiente para discernir entre duas cepas não-isogênicas.

O locus *agr* de 4 das 5 cepas VISA estudadas apresentou-se íntegro. A cepa VISA3 apresentou uma mutação no gene *agrC* que truncou os

aminoácidos da proteína AgrC por causar um erro no *frame* de leitura da trinca de códon, tornando o locus disfuncional nesta cepa.

O locus *sarA* apresentou pequenas diferenças polimórficas entre cepas pertencentes a linhagens diferentes. A indução de resistência a vancomicina não resultou em mutação do locus *sarA*. A proteína SarA apresentou-se íntegra em todas as cepas estudadas. O locus *sarA* parece não estar implicado no surgimento de resistência a vancomicina.

A diversidade fenotípica e genotípica entre as cepas VISA sugere que apesar de elas pertencerem ao mesmo clone (ST239 por MLST ou Clone Endêmico Brasileiro por PFGE), e terem sido isolados no mesmo hospital no mesmo período, em pacientes clinicamente semelhantes, o seu surgimento resultou de eventos independentes e que não houve transmissão lateral tanto de cepas quanto de material genético.

Com este estudo, a suspeita de que a resistência intermediária à vancomicina em *S. aureus* pode ser o resultado de vários tipos diferentes de alteração genética fica fortalecida. O surgimento de resistência de baixo nível à vancomicina provavelmente ocorre isoladamente em cada caso, com o uso prolongado e indevido deste antibiótico.

7. Referências Bibliográficas

- ANDRADE-BAIOCCHI, S.; TOGNIM, M.C.; BAIOCCHI, O.C.; SADER, H.S. Endocarditis due to glycopeptide-intermediate *Staphylococcus aureus*: case report and strain characterization. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 45(2):149-52, 2003.
- ARIZA, J.; PUJOL, M.; CABO, J.; PEÑA, C.; FERNÁNDEZ, N.; LIÑARES, J.; AYATS, J.; GUDIOL, F. Vancomycin in surgical infections due to methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* with heterogeneous resistance to vancomycin. *Lancet.*, 353: 1587-1588, 1999.
- BALABAN, N.; GOLDKORNI, T.; GOV, Y.; HIRSHBERG, M.; KOYFMAN, N.; MATTHEWS, H.R.; NHAN, R.T.; SINGH, B.; UZIE, O. Regulation of *Staphylococcus aureus* Pathogenesis via Target of RNAIII-activating Protein (TRAP). *J. Biol. Chem.*, 276(4):2658–266, 2001.
- BAYER, M.G.; HEINRICHS, J.H.; CHEUNG, A.L. The Molecular Architecture of the *sar* Locus in *Staphylococcus aureus*. *J. Bacteriol.* 178(15):4563–4570, 1996.
- BOGDANOVICH, T.; EDNIE, L.M.; SHAPIRO, S.; APPELBAUM, P.C. Antistaphylococcal Activity of Ceftobiprole, a New Broad-Spectrum Cephalosporin. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 49(10):4210–4219, 2005.
- BOYLE-VAVRA, S.; BERKE, S.K.; LEE, J.C.; DAUM, R.S. Reversion of the glycopeptide resistance phenotype in *Staphylococcus aureus* clinical isolates. *Antimicrob Agents Chemother.* 44(2):272-7, 2000.
- CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION (CDC). Vancomycin resistant *Staphylococcus aureus*. New York, 2004. *MMWR Morb. Mortal Wkly Rep.* 53(15):322-323, 2004.
- CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION (CDC). *Staphylococcus aureus* resistant to vancomycin. United States, 2002. *MMWR*, 51:565-7, 2002.
- CHAMBERS, H.F. Methicillin-resistance in staphylococci: molecular and biochemical basis and clinical implications. *Clin. Microbiol. Rev.*, 10: 781-791, 1997.
- CHEUNG, A.L.; BAYER, M.G.; HEINRICHS, J.H. *sar* Genetic Determinants Necessary for Transcription of RNAII and RNAIII in the *agr* Locus of *Staphylococcus aureus*. *J. Bacteriol.*, 179(12):3963–3971, 1997

CHEUNG, A.L.; KOOMEY, J.M.; BUTLER, C.A.; PROJAN, S.J.; FISCHETTI, V.A. Regulation of exoprotein expression in *Staphylococcus aureus* by a locus (*sar*) distinct from *agr*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 89:6462-6466, 1992.

CHIEN, Y.; MANNA, A.C.; CHEUNG, A.L. *SarA* level is a determinant of *agr* activation in *Staphylococcus aureus*. *Mol Microbiol.* 30(5):991-1001, 1998.

CHRISTENSEN, G. D.; SIMPSON, W. A.; YOUNGER, J. J.; BADDOUR, L. M.; BARRETT, F. F.; MELTON, D. M.; BEACHEY, E. H. Adherence of coagulase negative staphylococci to plastic tissue culture plates: a quantitative model for the adherence of staphylococci to medical devices. *J. Clin. Microbiol.* 22:996–1006, 1985.

CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE (CLSI). Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing. M100-S16. vol.26 n.3, 2006.

CUI, L.; MURAKAMI, H.; KUWAHARA-ARAI, K.; HANAKI, H.; HIRAMATSU, K. Contribution of a Thickened Cell Wall and its Glutamine Nonamidated Component to the Vancomycin Resistance Expressed by *Staphylococcus aureus* Mu50. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 44: 2276-2285, 2000.

DUNMAN, P.M.; MURPHY, E.; HANEY, S.; PALACIOS, D.; TUCKER-KELLOGG, G.; WU, S.; BROWN, E.L.; ZAGURSKY, R.J.; SHLAES, D.; PROJAN, S.J. Transcription profiling-based identification of *Staphylococcus aureus* genes regulated by the *agr* and/or *sarA* loci. *J Bacteriol.*, 183(24):7341-7353, 2001.

FOURNIER, B.; HOOPER, D.C. A new two-component regulatory system involved in adhesion, autolysis, and extracellular proteolytic activity of *Staphylococcus aureus*. *J Bacteriol.* 182(14):3955-3964, 2000.

FOURNIER, B.; KLIER, A.; RAPOPORT, G. The two-component system *ArlS-ArlR* is a regulator of virulence gene expression in *Staphylococcus aureus*. *Mol Microbiol.* 41(1):247-261, 2001.

GARRITY, G.M. Bergey's Manual of Systematic Bacteriology 2nd Edition: Volume 3: The Low G + C Gram Positives. Springer-Verlag, Nova York, 2006. ISBN 0-387-95041-9.

GEISEL, R.; SCHMITZ, F.J.; FLUIT, A.C.; LABISCHINSKI, H. Emergence, mechanism, and clinical implications of reduced glycopeptide susceptibility in *Staphylococcus aureus*. *Eur. J. Clin. Microb. Infect. Dis.*, 20: 685-697, 2001.

GERTZ, S.; ENGELMANN, S.; SCHMID, R; ZIEBANDT, A.K.; TISCHER, K.; SCHARF, C.; HACKER, J.; HECKER, M. Characterization of the sigma(B) regulon in *Staphylococcus aureus*. *J Bacteriol.* 182(24):6983-6991, 2000.

GILOT, P.; LINA, G.; COCHARD, T.; POUTREL, B. Analysis of the Genetic Variability of Genes Encoding the RNA III-Activating Components Agr and TRAP in a Population of *Staphylococcus aureus* Strains Isolated from Cows with Mastitis. *J. Clin. Microbiol.*, 40: 4060-4067, 2002.

GOERKE, C.; FLUCKIGER, U.; STEINHUBER, A.; BISANZIO, V.; ULRICH, M.; BISCHOFF, M.; PATTI, J.M.; WOLZ, C. Role of *Staphylococcus aureus* global regulators *sae* and *sigmaB* in virulence gene expression during device-related infection. *Infect Immun.* 73(6):3415-3421, 2005.

GUERIN, F.; BUU-HOI, A.; MAINARDI, J.L.; KAC, G.; COLARDELLE, N.; VAUPRÉ, S.; GUTMANN, L.; PODGLAJEN, I. Outbreak of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* with reduced susceptibility to glycopeptides in a Parisian hospital. *J. Clin. Microbiol.*, 38: 2985-2988, 2000.

HANAKI, H.; KUWAHARA-ARAI, K.; BOYLE-VAVRA, S.; DAUM, R. S.; LABISCHINSKI, H.; HIRAMATSU, K. Activated cell wall synthesis is associated with vancomycin resistance in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clinical strains Mu3 and Mu50. *J. Antimicrob. Chemother.*, 42: 199-209, 1998.

HIRAMATSU, K. - Vancomycin resistance in staphylococci. *Drug Resistance Updates.*, 01: 135-150, 1998.

HIRAMATSU, K.; LONGZHU CUI, MAKOTO KURODA AND TERUYO ITO. The emergence and evolution of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Trends in Microbiology.* 9(10):486-493, 2001.

HIRAMATSU, K.; ARITAKA, N.; HANAKI, H.; KAWASAKI, S.; HOSODA, Y.; HORI, S.; FUKUCHI, Y.; KOBAYASHI, I. Dissemination in Japanese hospitals of strains of *Staphylococcus aureus* heterogeneously resistant to vancomycin. *Lancet.* 350(9092):1670-1673, 1997.

HIRAMATSU, K.; HANAKI, H.; INO, T.; YABUTA, K.; OGURI, T.; TENOVER, F.C. - Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clinical strain with reduced vancomycin susceptibility. *J. Antimicrob. Chemother.*, 40: 135-136, 1997.

ITO, T.; OKUMA, K.; Ma, X.X.; YUZAWA, H.; HIRAMATSU, K. Insights on antibiotic resistance of *Staphylococcus aureus* from its whole genome: genomic island SCC. *Drug Resist. Updat.* v. 6, p. 41–52, 2003.

JABÉS, D.; CANDIANI, G.; ROMANÓ, G.; BRUNATI, C.; RIVA, S.; CAVALERI, M. Efficacy of Dalbavancin against Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* in the Rat Granuloma Pouch Infection Model. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 48(4):1118–1123, 2004.

JEVONS, M.P. 'Celbenin'-resistant *staphylococci*. *Br. Med. J.* 1:124–125, 1961.

KIM, H.B.; JANG, H.C.; NAM, H.J.; LEE, Y.S.; KIM, B.S.; PARK, W.B.; LEE, K.D.; CHOI, Y.J.; PARK, S.W.; OH, M.; KIM, E.C.; CHOE, K.W. In Vitro Activities of 28 Antimicrobial Agents against *Staphylococcus aureus* Isolates from Tertiary-Care Hospitals in Korea: a Nationwide Survey. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 48(4):1124–1127, 2004.

KIM, M.; PAI, C.H.; WOO, J.H.; RYU, J.S.; HIRAMATSU, K. Vancomycin-intermediate *Staphylococcus aureus* in Korea. *J. Clin. Microbiol.*, 38: 3879-3881, 2000.

KURODA, M.; KUWAHARA-ARAI, K.; HIRAMATSU, K. Identification of the Up- and Down-Regulated Genes in Vancomycin-Resistant *Staphylococcus aureus* Strains Mu3 and Mu50 by cDNA Differential Hybridization Method. *Biochem. Biophysical. Research Communications.*, 269:485-490, 2000.

LE LOIR, Y.; BARON, F.; GAUTIER, M. *Staphylococcus aureus* and food poisoning. *Genet Mol Res.* 2(1):63-76, 2003.

LINA, G.; BOUTITE, F.; TRISTAN, A.; BES, M.; ETIENNE, J.; VANDENESCH, F. Bacterial Competition for Human Nasal Cavity Colonization: Role of Staphylococcal *agr* Alleles. *Appl Environ Microbiol.* 69(1):18-23, 2003.

LUH, K.T.; HSUEH, P.R.; TENG, L.J.; PAN, H.J.; CHEN, Y.C.; LU, J.J.; WU, J.J.; HO, S.W. Quinupristin-dalfopristin resistance among gram-positive bacteria in Taiwan. *Antimicrob Agents Chemother.* 44(12):3374-80, 2000.

LURIA, S.E.; DELBRÜCK, M. Mutations of Bacteria from Virus Sensitivity to Virus Resistance. *Genetics.* 28:491-511, 1943.

MANNA, A.; CHEUNG, A.L. Characterization of *sarR*, a modulator of *sar* expression in *Staphylococcus aureus*. *Infect Immun.* 69(2):885-96, 2001.

MARCHESE, A.; BALISTRERI, G.; TONOLI, E.; DEBBIA, E.A.; SCHITO, G.C. Heterogeneous vancomycin resistance in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains isolated in a large Italian hospital. *J. Clin. Microbiol.*, 38: 866-869, 2000.

MOELLERING, R.C. The specter of glycopeptide resistance: current trends and future considerations. *Am. J. Med.*, 104(5A): 3S-6S, 1998.

MOISE-BRODER, P. A.; SAKOULAS, G.; ELIOPOULOS, G.M. ; SCHENTAG, J.J.; FORREST, A.; MOELLERING JR., R.C. Accessory Gene Regulator Group II Polymorphism in Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Is Predictive of Failure of Vancomycin Therapy. *Clinical Infectious Diseases*, 38:1700-1705, 2004.

NAGARAJAN, R. Antibacterial activities and modes of action of vancomycin and related glycopeptides. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 33: 1477-1481, 1991.

NAGARAJAN, R. Glycopeptide antibiotics, Marcel Dekker, Inc., New York - USA, 1994.

NOBLE, W.C.; VIRANI, Z.; CREE, R.G.A. Co-transfer of vancomycin and other resistance genes from *Enterococcus faecalis* NCTC 12201 to *Staphylococcus aureus*. *FEMS Microbiol Lett* 72:1958, 1992.

NOVICK, R.P. - Autoinduction and signal transduction in the regulation of staphylococcal virulence. *Molecular Microbiology*, 48(6):1429–1449, 2003

OLIVEIRA, G.A. Caracterização de cepas de *Staphylococcus aureus* isoladas de diferentes regiões do Brasil baseada em métodos fenotípicos e genotípicos. São Paulo, 1998. 164p. (Dissertação de Mestrado - Faculdade de Ciências Farmacêuticas - USP).

OLIVEIRA G.A.; DELL'AQUILA A.M.; MASIERO, R.L.; LEVY C.E.; GOMES, M.S.; CUI, L.; HIRAMATSU, K., MAMIZUKA, E.M. Isolation in Brazil of nosocomial *Staphylococcus aureus* with reduced susceptibility to vancomycin. *Infect. Control Hosp. Epidemiol.*, 22(7):443-8, 2001

PLOY, M.C.; GRELAUD, C.; MARTIN, C.; LUMLEY, L.; DENIS, F. First clinical isolate of vancomycin-intermediate *Staphylococcus aureus* in a French hospital. *Lancet.*, 351: 1212, 1998

PRATTEN, J.; FOSTER, S.J.; CHAN, P.F.; WILSON, M.; NAIR, S.P. *Staphylococcus aureus* accessory regulators: expression within biofilms and effect on adhesion. *Microbes and Infection*, 3:633-637, 2001.

REINERT, C. Caracterização do cassete cromossômico estafilocócico (SCCmec) de cepas endêmicas nosocomiais de *S. aureus* resistentes a metilina e vancomicina. São Paulo, 2004. 71p. (Dissertação de Doutorado - Faculdade de Ciências Farmacêuticas - USP).

REINERT, C. Genes de virulência *agr*-dependentes em cepas de *Staphylococcus aureus* resistentes a oxacilina SCCmec tipo IV isoladas no Brasil. São Paulo, 2006. 110p. (Tese de Doutorado - Faculdade de Ciências Farmacêuticas - USP).

REYES, N.; SKINNER, R.; BENTON, B.M.; KRAUSE, K.M.; SHELTON, J.; OBEDENCIO, G.P.; HEGDE, S.S. Efficacy of telavancin in a murine model of bacteraemia induced by methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *J Antimicrob Chemother.* 58(2):462-5, 2006.

ROSCHE, W.A.; FOSTER, P.L. Determining mutation rates in bacterial populations. *Methods*. 20(1):4-17, 2000.

ROTUN, S.S.; McMATH, V.; SCHOONMAKER, D.J.; MAUPIN, P.S.; TENOVER, F.C.; HILL, B.C.; ACKMAN, D.M. *Staphylococcus aureus* with reduced susceptibility to vancomycin isolated from a patient with fatal bacteremia. *Emerg. Infect. Dis.*, 5: 147-149, 1999.

SADER, H.S.; JONES, R.N.; ANDRADE-BAIOCCHI, S.; BIEDENBACH, D.J.; SENTRY PARTICIPANTS GROUP (LATIN AMERICA). Four-year evaluation of frequency of occurrence and antimicrobial susceptibility patterns of bacteria from bloodstream infections in Latin American medical centers. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 44(3):273-80, 2002.

SCHWAN, W.R.; LANGHORNE, M.H.; RITCHIE, H.D.; STOVER, C.K. Loss of hemolysin expression in *Staphylococcus aureus agr* mutants correlates with selective survival during mixed infections in murine abscesses and wounds. *FEMS Immunology and Medical Microbiology*, 38:23-28, 2003.

SAKOULAS, G.; ELIOPUOLOS, G.M.; MOELLERING, R.C.; WENNERSTEN, C.; VENKATARAMAN, L.; NOVICK, R.P.; GOLD, H.S. - Accessory Gene Regulator (*agr*) Locus in Geographically Diverse *Staphylococcus aureus* Isolates with Reduced Susceptibility to Vancomycin. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 46(5): 1492-1502, 2002.

SAKOULAS, G.; ELIOPOULOS G.M.; MOELLERING, R.C. JR.; NOVICK, R.P.; VENKATARAMAN, L.; WENNERSTEN, C.; DEGIROLAMI, P.C.; SCHWABER, M.J.; GOLD, H.S. *Staphylococcus aureus* accessory gene regulator (*agr*) group II: is there a relationship to the development of intermediate-level glycopeptide resistance? *J. Infect. Dis.*, 187(6):929-38, 2003.

SAMBROOK, J.; FRITSCH, E.F.; MANIATIS, T. Molecular cloning: a laboratory manual, 2nd ed., Vol 3, Appendix B, Cold Spring Harbor Laboratory Press, USA, 1989.

SIERADZKI, K.; ROBERTS, R.B.; HABER, S.W.; TOMASZ, A. The development of vancomycin resistance in a patient with methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infection. *N. Engl. J. Med.*, 340: 517-523, 1999.

SMITH, T.L.; PEARSON, M.L.; WILCOX, K.R.; CRUZ, C.; LANCASTER, M.V.; ROBINSON-DUNN, B.; TENOVER, F.C.; ZERVOS, M.J.; BAND, J.D.; WHITE, E.; JARVIS, W.R. Emergence of vancomycin resistance in *Staphylococcus aureus*. *N. Engl. J. Med.*, 340: 493-501, 1999.

SOARES, M.J.S.; CARVALHO, M.C.S.; CARVALHO, B.T.F.; FIGUEIREDO, A.M.S. Spread of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* belonging to the Brazilian epidemic clone in a general hospital and emergence of

heterogeneous resistance to glycopeptide antibiotics among these isolates. *J. Hosp. Infect.*, 44: 301-308, 2000.

STEVENS, D.L.; HERR, D.; LAMPIRIS, H.; HUNT, J.L.; BATTS, D.H.; HAFKIN, B. Linezolid versus Vancomycin for the Treatment of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Infections. *Clin Infect Dis.* 34:1481-1490, 2002.

STRYJEWSKI, M.E.; CHU, V.H.; O'RIORDAN, W.D.; WARREN, B.L.; DUNBAR, L.M.; YOUNG, D.M.; VALLEE, M.; FOWLER, V.G.; MORGANROTH, J.; BARRIERE, S.L.; KITT, M.M.; COREY, G.R. Telavancin versus standard therapy for treatment of complicated skin and skin structure infections caused by gram-positive bacteria: FAST 2 study. *Antimicrob Agents Chemother.* 50(3):862-7, 2006.

TRABULSI, L. R. *et al.*, Microbiologia. 4^a ed., Atheneu, 2004

TSIODRAS, S.; GOLD, H.S.; SAKOULAS, G.; ELIOPOULOS, G.M.; WENNERSTEN, C.; VENKATARAMAN, L.; MOELLERING, R.C.; Ferraro, M.J. Linezolid resistance in a clinical isolate of *Staphylococcus aureus*. *Lancet.* 358(9277):207-208, 2001.

VAN LEEUWEN, W.; VAN NIEUWENHUIZEN, W.; GIJZEN, C.; VERBRUGH, H.; VAN BELKUM, A. Population studies of methicillin-resistant and -sensitive *Staphylococcus aureus* strains reveal a lack of variability in the *agrD* gene, encoding a staphylococcal autoinducer peptide. *J. Bacteriol.* 182(20):5721-9, 2000

VUONG, C.; SAENZ, H.L.; GOTZ, F.; OTTO, M. - Impact of the *agr* quorum-sensing system on adherence to polystyrene in *Staphylococcus aureus*. *J. Infect. Dis.*, 182(6):1688-93, 2000.

WALSH, T.R.; BOLMSTRÖM, A.; QWÄRNSTRÖM, A.; HO, P.; WOOTTON, M.; HOWE, R.A.; MCGOWAN, A.P.; DIEKEMA, D. Evaluation of current methods for detection of Staphylococci with reduced susceptibility to glycopeptides. *J. Clin. Microbiol.*, 39: 2439-2444, 2001.

WHITENER, C.J.; PARK, S.Y.; BROWNE, F.A.; PARENT, L.J.; JULIAN, K.; BOZDOGAN, B.; APPELBAUM, P.C.; CHAITRAM, J.; WEIGEL, L.M.; JERNIGAN, J.; MCDUGAL, L.K.; TENOVER, F.C.; FRIDKIN, S.K. Vancomycin-resistant *Staphylococcus aureus* in the absence of vancomycin exposure. *Clin Infect Dis.* 38(8):1049-55, 2004.