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

**Caracterização molecular dos mecanismos de resistência à linezolida em
estafilococos coagulase-negativos e estudo da estabilidade do fenótipo resistente**

Lara Mendes de Almeida

Tese para obtenção do grau de
DOUTOR

Orientador:
Prof. Dra. Elsa Masae Mamizuka

São Paulo
2012

Lara Mendes de Almeida

Caracterização molecular dos mecanismos de resistência à linezolida em estafilococos
coagulase-negativos e estudo da estabilidade do fenótipo resistente

Comissão Julgadora da
Tese para obtenção do grau de Doutor

Profa. Dra. Elsa Masae Mamizuka
orientador/presidente

1º. examinador

2º. examinador

3º. examinador

4º. examinador

São Paulo, _____ de _____.

Agradecimentos

Ao Carlos e aos meus filhos, Natalie e Felipe.

À prof^a. Dra. Elsa M. Mamizuka, pelo espaço para a realização deste trabalho e pela confiança e carinho constantes.

Aos colaboradores desta pesquisa, prof. Dr. Nilton Lincopan, Dra. Maria Rita E. de Araújo e Dra. Thaís Guimarães.

Ao laboratório Alerta, pela realização de algumas análises genotípicas.

À banca de qualificação composta pelas prof^{as} Dra. Marina B. Martinez, Dra. Ana C. Gales e Dra. Rita Café pela leitura cuidadosa e sugestões.

Aos colegas do laboratório, pela colaboração e convívio carinhoso.

Aos funcionários do departamento, especialmente à Ana Dantas e ao Jorge de Lima.

Lista de abreviaturas e siglas

Ala ou A	Alanina
<i>arcC</i>	(<i>carbamate kinase</i>) – um dos genes de <i>S. epidermidis</i> analisados pela técnica de MLST
Arg ou R	Arginina
<i>aroE</i>	(<i>shikimate dehydrogenase</i>) – um dos genes de <i>S. epidermidis</i> analisados pela técnica de MLST
Asn ou N	Asparagina
Asp ou D	Ácido aspártico
AZY	Azitromicina
AMK	Amicacina
BHI	Caldo <i>Brain Heart Infusion</i>
<i>cfr</i>	(<i>chloranphenicol-florfenicol resistance</i>) – gene responsável pela metilação do gene rRNA 23S na posição A2503
CIM	Concentração Inibitória Mínima
CIP	Ciprofloxacina
CLI	Clindamicina
CHL	Cloranfenicol
CLSI	<i>Clinical and Laboratory Standards Institute</i>
Cys ou C	Cisteína
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
dNTPs	Desoxirribonucleotídeos Fosfatados
EDTA	Ácido Etileno-Diamino Tetra-Acético
ERY	Eritromicina
<i>ermB</i>	Gene responsável por uma dimetilação na posição A2058 do rRNA 23S
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
fMet-tRNA ^{fMet}	N-formil-metionil-tRNA
GEN	Gentamicina
Gln ou Q	Glutamina
Glu ou E	Ácido glutâmico
Gly ou G	Glicina
<i>gtr</i>	(<i>ABC transporter</i>) – um dos genes de <i>S. epidermidis</i> analisados pela técnica de MLST
His ou H	Histidina
Ile ou I	Isoleucina
Kb	Kilobase – unidade de medida referente a 1000 nucleotídeos
LEADER	<i>Linezolid Experience and Accurate Determination of Resistance</i>
Leu ou L	Leucina
Lys ou K	Lisina
LZD	Linezolida
Met ou M	Metionina
MLS _B	Fenótipo caracterizado por resistência aos macrolídeos, lincosamidas e estreptograminas do tipo B
MRSA	<i>Staphylococcus aureus</i> resistente à meticilina
MSSA	<i>Staphylococcus aureus</i> sensível à meticilina
MRSE	<i>Staphylococcus epidermidis</i> resistente à meticilina
MLST	<i>Multilocus sequence typing</i>
<i>mutS</i>	(<i>DNA mismatch repair protein</i>) – um dos genes de <i>S. epidermidis</i> analisados pela técnica de MLST

NaCl	Cloreto de Sódio
OXA	Oxacilina
P-tRNA	Peptidil iniciador
pb	Pares de base
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase
PFGE	Eletroforese em Gel por Campo Pulsado
Phe ou F	Fenilalanina
PTC	Centro de peptidil-transferase
<i>pyrR</i>	(<i>pyrimidine operon regulatory protein</i>) – um dos genes de <i>S. epidermidis</i> analisados pela técnica de MLST
RecA	Proteína associada ao mecanismo de conversão do gene
RecBCD	Complexo com atividades de nuclease e helicase
RNA	Ácido Ribonucléico
50S	Subunidade maior do ribossomo bacteriano
mRNA	RNA mensageiro
rRNA	RNA ribossômico
tRNA	RNA transportador
<i>rrlA-F</i>	Alelos rRNA 23S
<i>rplC</i>	Gene codificador da proteína ribossômica L3
<i>rplD</i>	Gene codificador da proteína ribossômica L4
<i>rplV</i>	Gene codificador da proteína ribossômica L22
rpm	Rotações por minuto
SCCmec	Cassete cromossômico estafilocócico
SCNs	Estafilococos coagulase-negativos
SDS	Duodecil sulfato de sódio
SENTRY	<i>Antimicrobial Surveillance Program</i>
Ser ou S	Serina
STX	Sulfametoxazol-trimetoprim
TBE	Tampão à base de Tris, EDTA e ácido bórico
TEC	Teicoplanina
TET	Tetraciclina
Thr ou T	Treonina
<i>tpiA</i>	(<i>triosephosphate isomerase</i>) – um dos genes de <i>S. epidermidis</i> analisados pela técnica de MLST
Trp ou W	Triptofano
Tyr ou Y	Tirosina
Val ou V	Valina
VAN	Vancomicina
VRE	Enterococos resistentes à vancomicina
Tris	Tris-hidroximetilaminometano (2-amino-2-(hidroximetil) propano-1,3-diol)
UTI	Unidade de terapia intensiva
<i>yqiL</i>	(<i>acetyl coenzyme A acetyltransferase</i>) – um dos genes de <i>S. epidermidis</i> analisados pela técnica de MLST

Sumário

1. Introdução.....	1
1.1 Sítio e mecanismo de ação.....	2
1.2 Mecanismos de resistência.....	5
1.2.1 Mutações no gene rRNA 23S.....	5
1.2.2 Metilação do rRNA 23S causada pelo gene <i>cfr</i>	15
1.2.3 Mutações nas proteínas ribossômicas L3, L4 e L22.....	18
1.3 Mecanismo de conversão do gene mediado por RecA.....	22
1.4 Resistência cruzada a antimicrobianos que atuam no PTC.....	24
1.5 Estafilococos coagulase-negativos.....	26
2. Objetivos.....	28
2.1 Gerais.....	28
2.2 Específicos.....	28
3. Material e Métodos.....	29
3.1 Amostras bacterianas.....	29
3.2 Metodologia.....	29
3.2.1 Identificação das espécies de SCNs.....	29
3.2.2 Antibiograma.....	29
3.2.3 Concentração inibitória mínima (CIM)	30
3.2.4 Extração do DNA cromossômico.....	30
3.2.5. Amplificação e sequenciamento do domínio V do gene rRNA 23S.....	31
3.2.6 Eletroforese em gel de agarose.....	32
3.2.7 Amplificação e sequenciamento dos genes <i>rplC</i> , <i>rplD</i> e <i>rplV</i>	33
3.2.8 Identificação do gene <i>cfr</i> por meio da reação em cadeia da polimerase (PCR).....	33
3.2.9 Reversão ao fenótipo sensível à linezolidina.....	34
3.2.10 Identificação do número de alelos rRNA 23S mutados.....	34
3.2.10.a Restrição do domínio V do rRNA 23S.....	35
3.2.10.b Sequenciamento individual do domínio V dos alelos <i>rrlA-F</i>	35
3.2.11 Eletroforese em gel de campo pulsado (PFGE).....	36
3.2.12 <i>Multilocus sequence typing</i> (MLST).....	38
4. Resultados.....	41
4.1 Identificação das espécies de SCNs.....	41
4.2 Perfil de sensibilidade aos antimicrobianos.....	41
4.3 Domínio V do gene rRNA 23S.....	42

4.4 Proteínas ribossômicas	43
4.5 Gene <i>cfr</i>	43
4.6 Reversão ao fenótipo sensível à linezolida	46
4.7 Relação entre a CIM de linezolida e o número de alelos rRNA 23S mutados.....	47
4.8 Epidemiologia molecular das cepas de SCNs resistentes à linezolida.....	50
5. Discussão.....	53
6. Conclusões.....	69
7. Referências bibliográficas.....	71
8. Anexos	80

Lista de figuras

Figura 1	Linezolida ligada à subunidade 50S de <i>H. marismortui</i> . Cristalografia.....	3
Figura 2	Conformações dos resíduos C2487 (<i>E. coli</i> 2452) e U2539 (<i>E. coli</i> 2504) em resposta à ligação da linezolida. Cristalografia.....	4
Figura 3	Identificação genotípica das espécies de SCNs.....	41
Figura 4	Substituição de G por T na posição 2576 referente aos alelos <i>rrn</i> de <i>E. coli</i>	42
Figura 5	Perfis de restrição do domínio V do rRNA 23S das cepas de SCNs gerados por NheI.....	47
Figura 6	Perfis de restrição do DNA das cepas de <i>S. epidermidis</i> gerados por PFGE.....	50
Figura 7	Perfis de restrição do DNA das cepas de <i>S. haemolyticus</i> gerados por PFGE	51

Lista de tabelas

Tabela 1	Mutações no gene rRNA 23S associadas com a resistência à linezolida em <i>Staphylococcus</i> spp.....	14
Tabela 2	Alterações nas proteínas ribossômicas associadas com a resistência à linezolida em <i>Staphylococcus</i> spp.....	21
Tabela 3	Iniciadores utilizados na amplificação dos genes envolvidos com a resistência à linezolida.....	36
Tabela 4	Iniciadores utilizados na amplificação dos fragmentos internos dos genes analisados pela técnica de MLST.....	40
Tabela 5	Características microbiológicas e epidemiológicas das cepas de SCNs.....	44
Tabela 6	Níveis de CIM de linezolida (µg/ml) das cepas de SCNs ao longo da série de passagens em meio sem antimicrobianos.....	46
Tabela 7	Níveis de CIM de linezolida (µg/ml) e o número de alelos rRNA 23S mutados.	49

de Almeida, L.M. Caracterização molecular dos mecanismos de resistência à linezolida em estafilococos coagulase-negativos e estudo da estabilidade do fenótipo resistente. 2012.

Resumo

Linezolida foi o primeiro fármaco da classe das oxazolidinonas a ser aprovado para o uso clínico. Esta nova oxazolidinona inibe a síntese protéica impedindo a formação do complexo de iniciação formado pelo mRNA, tRNA f-Met e a subunidade 50S do ribossomo bacteriano. Embora a resistência à linezolida possa ser mediada pelo produto do gene *cfr* ou por mutações nas proteínas ribossômicas L3, L4 e L22, o mecanismo de resistência mais comum envolve mutações no domínio V do gene rRNA 23S. Entre março de 2008 a dezembro de 2011, 38 cepas de estafilococos coagulase-negativos (SCNs) resistentes à linezolida (20 *S. epidermidis*, 14 *S. haemolyticus*, 3 *S. hominis* e 1 *S. warneri*) isoladas de hemoculturas e pontas de cateter de pacientes internados em dois hospitais terciários do Estado de São Paulo foram incluídas neste estudo para a determinação dos mecanismos de resistência e análise da estabilidade do fenótipo resistente. As cepas de SCNs apresentaram altos níveis de resistência à linezolida (CIMs de 16-128 µg/ml) e foram multi-resistentes, permanecendo sensíveis à vancomicina e teicoplanina. A mutação G2576T foi identificada no domínio V do gene rRNA 23S em todas as cepas de SCNs, exceto em uma cepa de *S. haemolyticus*. O gene *cfr* e mutações nas proteínas L4 e L22 não foram detectados. Em relação à proteína L3, todas as cepas de *S. epidermidis* do hospital A, incluindo a cepa controle sensível à linezolida, apresentaram a substituição Leu101Val, sugerindo que essa mutação seja um marcador clonal dessa população sem envolvimento com a resistência à linezolida. A única cepa proveniente do hospital B (*S. epidermidis*) foi selvagem para essa proteína ribossômica. Somente uma cepa de *S. haemolyticus* teve uma mutação no gene *rplC*, resultando na alteração Val154Leu. Em *S. hominis*, a mutação Phe147Ile foi identificada em uma cepa, enquanto a associação de Gly139Arg e Met156Thr foi observada nas outras duas cepas dessa espécie. A identificação dessas mutações na proteína L3 de cepas de *S. haemolyticus* e *S. hominis* resistentes à linezolida reforça o papel desses sítios na aquisição da resistência ao fármaco em *Staphylococcus* spp. No entanto, a presença de G2576T no rRNA 23S torna difícil determinar exatamente qual o envolvimento das mutações na L3 com os elevados níveis de resistência à linezolida apresentados por essas cepas. Na ausência da pressão seletiva do antimicrobiano, após 130 passagens, a resistência à linezolida mediada pela mutação G2576T permaneceu estável nas cepas de SCNs deste estudo, as quais, de acordo com os perfis de restrição do domínio V gerados por NheI, tinham tanto alelos rRNA 23S selvagens como mutados. O sequenciamento individual do domínio V das diferentes cópias do gene rRNA 23S mostrou G2576T em todas as cópias amplificadas por PCR: 4/4 e 5/5 em *S. epidermidis* e 3/3 em *S. haemolyticus* (CIMs de 16-32 µg/ml). A estabilidade da cópia rRNA 23S mutada foi observada mesmo em uma cepa *S. epidermidis* sensível à linezolida, a qual apresentou uma redução da CIM de 4 para 1 µg/ml mantendo seu único alelo mutado ao longo do processo de reversão ao fenótipo sensível. A similaridade genética foi determinada por PFGE e mostrou uma disseminação clonal das diferentes espécies de SCNs resistentes à linezolida. A análise das cepas de *S. epidermidis* por MLST mostrou a ocorrência do clone ST-2 (CC2) nos dois hospitais. O aumento da pressão seletiva devido a exposições cada vez mais frequentes à linezolida, provavelmente, favoreceu a seleção e a disseminação de clones endêmicos de SCNs com a mutação G2576T na instituição A desde 2008. De forma diferente, o uso mais restrito do fármaco na instituição B poderia explicar a ocorrência isolada de uma única cepa resistente desde 2005.

Palavras-chave: linezolida; resistência; estafilococos coagulase-negativos.

Abstract

Linezolid was the first agent of the oxazolidinone class to be introduced clinically. This oxazolidinone inhibits protein biosynthesis by preventing the formation of the initiation complex that consists of the mRNA, the f-Met tRNA and the 50S subunit of the ribosome. Although linezolid resistance has been mediated by the *cfr*-encoded product or by ribosomal proteins (L3, L4 and L22), the most common mechanism of resistance involves mutations in the central loop of domain V of the 23S rRNA gene. From March 2008 to December 2011, 38 coagulase-negative staphylococci (CNS) strains (20 *S. epidermidis*, 14 *S. haemolyticus*, 3 *S. hominis* e 1 *S. warneri*) exhibiting resistance to linezolid were isolated from blood and catheter cultures from patients in two tertiary care hospitals in the State of São Paulo and were included in this study for the ascertainment of the resistance mechanisms to this antimicrobial agent and for the analysis of the stability of this resistance. The strains exhibited high-level resistance to linezolid (MICs 16-128 µg/ml) and all were multidrug resistant, remaining susceptible to vancomycin and teicoplanin. The G2576T mutation in domain V region of 23S rRNA was identified in all isolates, except in a linezolid-resistant *S. haemolyticus* strain. The *cfr* gene and mutations in ribosomal proteins L4 and L22 were not detected. Regarding L3 protein analysis, all *S. epidermidis* strains of hospital A, including the linezolid-susceptible control strain, showed the L3 Leu101Val mutation, suggesting that this alteration is probably not involved in linezolid resistance. The one strain from hospital B (*S. epidermidis*) was wild-type for this ribosomal protein. Only one *S. haemolyticus* strain had a mutation in the L3 protein, Val154Leu. Two *S. hominis* strains showed Gly139Arg/Met156Thr mutations whereas one strain had Phe147Ile in L3 protein. The identification of these mutations in L3 protein of the linezolid-resistant *S. haemolyticus* and *S. hominis* strains strengthens the role of these sites in the acquisition of linezolid resistance in *Staphylococcus* spp. However, the presence of G2576T in the 23S rRNA gene makes difficult to determine exactly the role of L3 mutations in conferring elevated linezolid MIC values showed by these clinical strains. In the absence of antibiotic pressure, after 130 passages, linezolid resistance was stable in the clinical strains of this study, which did not have all copies of the 23S rRNA gene mutated, according to the restriction of the domain V fragment with NheI enzyme. Sequencing of the individual copies of the 23S rRNA gene in the serially passaged strains showed G2576T in all amplified copies by PCR: 4/4 and 5/5 in *S. epidermidis* and 3/3 in *S. haemolyticus* strains (MIC of 16-32 µg/ml). The stability of the mutant rRNA copy was also observed in the linezolid-susceptible *S. epidermidis* strain (MIC of 4 µg/ml). After the passages in antibiotic-free medium, the linezolid MIC of this strain fell to 1 µg/ml and the G2576T mutation persisted in one 23S rRNA gene copy. The clonal relatedness of the strains was determined by PFGE and revealed a clonal dissemination of different CNS species. Regarding MLST analysis, all *S. epidermidis* strains belonged to the sequence type ST2 (CC2). Most likely, the increased selective pressure has contributed to the selection of endemic linezolid-resistant CNS clones showing the G2576T mutation that have been disseminated in the institution A since 2008. Differently, the restricted use of linezolid in the institution B could explain the occurrence of a single resistant strain since 2005.

Keywords: linezolid; resistance; negative-coagulase staphylococci.

1. Introdução

Linezolida (Zyvox, Zyvoxid, Zyvoxam – Pfizer) foi o primeiro fármaco de uma nova classe de antimicrobianos a ser aprovado para o uso clínico (Moellering 2003). Essa nova oxazolidinona é totalmente sintética e potencialmente ativa contra cepas multiresistentes de importantes patógenos Gram-positivos, incluindo *Staphylococcus aureus* resistentes à meticilina (MRSA), estafilococos coagulase-negativos (SCNs), *Enterococcus faecalis* e *Enterococcus faecium* resistentes à vancomicina (VRE), *Streptococcus pneumoniae*, *Streptococcus* spp. do grupo viridans e sorogrupos de estreptococos β -hemolíticos (Zurenko et al. 1996; Diekema & Jones 2001). Aprovada em abril de 2000 (FDA, 2000) para o tratamento de infecções de pele e do trato respiratório causadas por esses patógenos, o uso de linezolida foi inicialmente permitido para adultos e apenas em 2005 para o uso pediátrico.

Relatos de resistência à linezolida em bactérias Gram-positivas no início da década passada foram incomuns. Dados do SENTRY (*Antimicrobial Surveillance Program*) obtidos entre 2001 e 2002 mostraram somente oito isolados resistentes à linezolida, distribuídos em sete diferentes instituições. Entre eles, seis *Enterococcus* spp., um *S. epidermidis* e um *S. oralis* (Mutnick et al. 2003). Dados mais recentes desse mesmo programa de monitoramento da sensibilidade a antimicrobianos (2005-2008) também mostraram excelente atividade da linezolida em bactérias Gram-positivas isoladas de hospitais brasileiros (Gales et al. 2009).

Segundo o ZAAPS (Zyvox® *Annual Appraisal of Potency and Spectrum program*), linezolida permanece altamente ativa entre diferentes grupos de patógenos Gram-positivos desde 2005, incluindo SCNs (CIM₉₀, 1µg/ml; 0.48% de isolados resistentes). Os dados desse programa para o ano de 2009 mostraram a ocorrência de

outras cepas resistentes à linezolida, além de *S. aureus*, em cinco países e indicaram o gene *cfr* como causa dominante da resistência à linezolida em cepas de SCNs (Biedenbach et al. 2010).

De acordo com os resultados do LEADER (*Linezolid Experience and Accurate Determination of Resistance*) – programa de monitoramento da resistência à linezolida em diferentes instituições nos EUA – a resistência à linezolida também não apresentou um aumento significativo entre 2004 e 2009 (<0,1%), embora novos mecanismos de resistência tenham sido descobertos ao longo desse período, especialmente em estafilococos (Farrell et al. 2011).

1.1 Sítio e mecanismo de ação

O local preciso de atuação e o mecanismo de ação dessa nova classe de antimicrobianos sintéticos foram motivos de discussão no final da década de 90, especialmente em relação à etapa da síntese protéica que poderia ser afetada pelas oxazolidinonas (Lin et al. 1997; Swaney et al. 1998; Burghardt et al. 1998).

Em 1999, o mapeamento de resíduos do operon rRNA de mutantes *Halobacterium halobium* selecionados com linezolida permitiu a identificação de sete mutações que afetam seis posições de uma região central do domínio V do gene rRNA 23S, sugerindo que esse segmento do rRNA seria o sítio de ligação primário da linezolida nos ribossomos procarióticos. O fato de esse sítio ser parte do centro de peptidil-transferase (PTC) da subunidade ribossômica 50S permitiu aos autores inferir que a linezolida inibe a incorporação de fMet-tRNA no complexo de pré-iniciação, constituído pelo tRNA, subunidade 30S do ribossomo e pelo mRNA. Além disso, a análise dos efeitos da linezolida sobre a atividade da peptidil-transferase dos ribossomos

de *H. halobium* excluiu a hipótese de que a linezolida e, provavelmente outras oxazolidinonas, poderiam inibir a tradução por interferência direta na catálise da ligação peptídica, como ocorre com outros inibidores da síntese protéica (Kloss et al. 1999).

Anos depois, uma análise da linezolida ligada à subunidade 50S de *Haloarcula marismortui*, por meio de cristalografia (Ippolito et al. 2008), forneceu novos elementos para a compreensão do seu modo de ação no ribossomo bacteriano. Essa importante pesquisa mostrou que a linezolida se liga por meio de pontes de hidrogênio e interações hidrofóbicas a uma área localizada dentro do PTC. O anel oxazolidinona é posicionado na base U2539 (*E. coli* 2504) e tanto esse anel como a acetamida C-5 se complementam com uma parte específica da superfície do sítio A. A acetamida NH da linezolida participa de uma ponte de hidrogênio com o grupo fosfato de G2540 (*E. coli* 2505) e a fração fluorofenil, supostamente, se acomoda em uma fenda formada pelos resíduos A2486 e C2487 (respectivamente, *E. coli* 2451 e 2452) do PTC se envolvendo simultaneamente em interações com essas duas bases. Este local, conhecido como fenda do sítio A, também é alvo de atuação de outros antibióticos e, possivelmente, local onde as cadeias laterais dos aminoácidos dos aminoacil-tRNAs se ligam (Figura 1).

Figura 1. Linezolida ligada à subunidade 50S de *H. marismortui*. Cristalografia (Ippolito et al. 2008).

Ainda no estudo de Ippolito et al. (2008), foi observado que a ligação da linezolida induz algumas mudanças significativas de conformação dentro do PTC (Figura 2). O antimicrobiano promove um giro dos resíduos C2487 (*E. coli* 2452) e U2539 (*E. coli* 2504) em direção ao lúmen do sítio ativo, permitindo a formação de importantes interações. C2487 (*E. coli* 2452) oscila em direção à linezolida aparentemente para otimizar sua interação com o anel fluorofenil, que completa a interação dos anéis aromáticos, incluindo os nucleotídeos C2487, A2488 e G2489 (*E. coli* 2452, 2453, 2454). A rotação de U2539 (*E. coli* 2504), também induzida pela ligação da linezolida, resulta na acomodação desta base com o anel oxazolidinona. Este movimento altera a posição do grupo fosfato da base G2540 (*E. coli* 2505), permitindo a formação de pontes de hidrogênio com a acetamida da linezolida.

Figura 2. Conformações dos resíduos C2487 (*E. coli* 2452) e U2539 (*E. coli* 2504) em resposta à ligação da linezolida. Cristalografia (Ippolito et al. 2008).

Essa análise permitiu inferir que, pelo fato de se sobrepor à parte aminoacil de um tRNA ligado ao sítio A, é provável que a linezolida possa competir com substratos que se ligam a esse sítio. No entanto, essa forma particular de ligação ao sítio A não explica o modo como a linezolida poderia bloquear a ligação de fMet-tRNA^{fMet} com o

sítio P durante a etapa de iniciação da síntese protéica, como proposto por outros autores (Swaney et al. 1998). Para essa outra forma de interferência da linezolida, Wilson et al. (2008) sugeriram uma atuação indireta do antimicrobiano na ligação de fMet-tRNA ao sítio P. A presença da linezolida no sítio A afetaria a ligação ou o posicionamento do peptidil iniciador, provavelmente, induzindo uma alteração na conformação do nucleotídeo U2585 com o qual ela estabelece pontos de ligação (anel C). Como U2585 é essencial para o correto posicionamento do P-tRNA no sítio P, essa nova conformação não seria produtiva para a formação da ligação peptídica, acentuando a ação inibitória da linezolida.

1.2 Mecanismos de resistência

A resistência à linezolida não está completamente esclarecida. No entanto, três mecanismos têm sido associados ao fenótipo resistente em estafilococos: mutações na região central do domínio V do gene rRNA 23S, aquisição do gene *cfr* e, mais recentemente, mutações nos genes *rplC*, *rplD* e *rplV*, codificadores das proteínas ribossômicas L3, L4 e L22, respectivamente.

1.2.1 Mutações no gene rRNA 23S

A resistência à linezolida mediada pelo rRNA 23S está relacionada com a presença de múltiplos alelos desse gene no genoma bacteriano. Diferentes mutações na região central do domínio V dos alelos rRNA 23S estão sendo associadas ao fenótipo resistente e tem se tentado estabelecer uma relação entre os níveis de resistência à

linezolida, a posição dos nucleotídeos mutados e o número de alelos portadores desses nucleotídeos mutados.

Logo após a introdução da linezolida na prática clínica, os poucos casos de resistência a essa nova oxazolidinona ocorreram principalmente durante o tratamento de infecções mais complicadas causadas por VRE. O primeiro relato de resistência à linezolida em estafilococos foi feito por Tsiodras et al. (2001). Uma cepa MRSA (CIM > 32 µg/ml para linezolida) foi isolada do fluido peritoneal de um paciente de 85 anos de idade com peritonite e outras três cepas resistentes à linezolida, do fluido de diálise peritoneal. Todas tinham a mutação G2576T na região central do domínio V do gene rRNA 23S.

O segundo caso clínico de MRSA resistente à linezolida foi descrito por Wilson et al. (2002). Durante um período de tratamento com linezolida iniciado após uma punção do tórax, onze isolados foram coletados. Observou-se um aumento da CIM de linezolida dos isolados sensíveis vinte dias após o término do tratamento (de 2 para 32 µg/ml). A mutação G2576T foi novamente identificada em todos os isolados resistentes, sendo sua presença em dois de seis alelos rRNA 23S associada a uma CIM de 8 µg/ml e, em cinco de seis alelos, a uma CIM de 32 µg/ml. Uma análise dos perfis de restrição gerados por PFGE confirmou a derivação da cepa MRSA resistente à linezolida a partir de um progenitor MRSA sensível. Setenta e um dias após a punção, uma amostra de pus apresentou tanto isolados MRSA sensíveis como resistentes à linezolida.

A estabilidade do fenótipo resistente à linezolida foi analisada pela primeira vez por Pillai et al. (2002). Os autores submeteram o isolado clínico MRSA previamente descrito por Tsiodras et al. (2001) a uma série de 15 passagens em meio sem linezolida ou qualquer outro antimicrobiano e observaram que cinco dos seis alelos do gene rRNA 23S desse isolado permaneceram com a mutação G2576T no domínio V após as

passagens, sem redução da CIM de linezolida (CIM de 64 µg/ml). Nenhuma diferença significativa em relação à taxa de crescimento foi observada entre o isolado resistente à linezolida e um isolado sensível (ATCC 33591), sugerindo, de acordo com os autores, que a mutação G2576T não prejudica o metabolismo da bactéria não oferecendo, portanto, qualquer desvantagem seletiva.

Dois anos depois, outro estudo para verificar a estabilidade do fenótipo resistente foi realizado por Meka et al. (2004). Desta vez, o processo de reversão ao fenótipo sensível foi promovido por uma série de 60 passagens em meio sem linezolida. Na ausência da pressão do antimicrobiano, observou-se que a CIM do isolado original resistente, portador da mutação G2576T, diminuiu de 16 para 8 µg/ml após 30 passagens e de 8 para 2 µg/ml, depois de outras 30 passagens, correspondendo, respectivamente a 4 (*rrn1*, *rrn2*, *rrn3*, *rrn5*), 2 (*rrn2*, *rrn3*) e apenas um (*rrn2*) alelo mutado.

As passagens adicionais até a redução da CIM e a presença de um alelo selvagem preservado no isolado clínico *S. aureus* analisado por Meka et al. (2004) poderiam, segundo os autores, explicar a reversão ao fenótipo sensível. O alelo selvagem poderia atuar como um *template* no processo de recombinação homóloga, promovendo a reversão à sensibilidade. Outro aspecto interessante apontado pelos autores, foi o fato de o isolado ter mantido um gene rRNA mutado mesmo após as 60 passagens, sugerindo que apenas uma cópia mutada gere pouco custo ao *fitness* da bactéria.

A persistência dos alelos mutados do operon rRNA 23S e sua relação com a re-emergência da resistência à linezolida continuaram a ser investigadas por Tsakris et al. (2007). Após uma série de 60 passagens em meio sem linezolida, um isolado clínico *S. aureus* sensível a esse antimicrobiano (CIM de 2 µg/ml), com apenas um alelo rRNA

23S mutado, foi derivado de seu progenitor resistente à linezolida (CIM de 16 µg/ml), portador de quatro alelos mutados. Com o intuito de verificar a estabilidade do alelo mutado ainda presente no derivado sensível, 40 passagens adicionais foram realizadas e originaram outro isolado sensível à linezolida, com a mesma CIM e com o mesmo alelo mutado do anterior. Este novo derivado sensível, quando exposto a concentrações crescentes de linezolida, mostrou ser possível uma rápida re-emergência da resistência. Um mutante espontâneo (CIM de 64 µg/ml) com os mesmos alelos mutados (*rrn1*, *rrn2*, *rrn3*, *rrn5*) de seu progenitor resistente foi identificado.

Os resultados do estudo de Tsakris et al. (2007) reforçaram a hipótese de que a presença de apenas um alelo com a mutação G2576T poderia servir como *template* para a recombinação homóloga, explicando tanto a relação entre níveis elevados de resistência à linezolida e o aumento do número de alelos rRNA 23S mutados como a relação entre níveis mais baixos e um menor número de cópias mutadas.

No Brasil, o primeiro relato de um isolado clínico MRSA resistente à linezolida foi feito por Gales et al. (2006). A cepa (CIMs de 16 e 12 µg/ml, respectivamente, pelos métodos de diluição em caldo e E-test) foi isolada de uma cultura de escarro de uma paciente com fibrose cística com recorrentes infecções pulmonares causadas por MRSA. Com o intuito de prolongar a terapia com linezolida, uma vez que seu estado clínico rapidamente piorava com a retirada do antimicrobiano, a dose diária prescrita foi reduzida pela metade sem orientação médica. Tal procedimento, associado aos repetidos e prolongados períodos de exposição ao fármaco, segundo os autores, provavelmente, favoreceu a seleção da cepa MRSA portadora da mutação G2576T, que apresentava um perfil de restrição por PFGE muito similar ao do clone endêmico brasileiro.

Estafilococos coagulase-negativos resistentes à linezolida têm sido associados, principalmente, à ocorrência de surtos clonais em UTIs (Potoski et al. 2006; Kelly et al. 2008; Treviño et al. 2009; Biedenbach et al. 2010; Mulanovich et al. 2010)

No Brasil, o primeiro isolado clínico *S. epidermidis* resistente à linezolida (CIM de 32 µg/ml) foi obtido da cultura de uma ponta de cateter de uma paciente com 75 anos internada em uma UTI de um hospital em São Paulo. A cepa foi isolada após 21 dias de terapia com linezolida para o tratamento de uma infecção do trato urinário devido à presença de *E. faecium* resistente à vancomicina (Lincopan et al. 2009). Três anos depois, uma disseminação desse mesmo clone *S. epidermidis* (ST-2) (CIMs entre 16-64 µg/ml) foi relatada na mesma instituição. Assim como o primeiro isolado, todos apresentaram a mutação G2576T no gene rRNA 23S (de Almeida et al. 2012a).

Relatos de resistência à linezolida em *S. haemolyticus* são mais recentes e, ainda, pouco frequentes. O primeiro caso foi relatado por Tarazona et al. em 2007, na Espanha. O isolado (CIM de 12 µg/ml) foi obtido de um segmento de cateter femoral após quatro dias de exposição à linezolida. Ainda na Espanha, outro estudo documentou a disseminação de um único clone de *S. haemolyticus* resistente à linezolida (CIM entre 32-128 µg/ml) e à teicoplanina em um ambiente hospitalar por um período de 18 meses. Esses isolados foram associados com bacteremia relacionada a cateter em pacientes de UTI (Rodríguez-Aranda et al. 2009). Mais recentemente, (Mazzariol et al. 2012) relataram um surto de *S. haemolyticus* resistentes à linezolida (CIM de 32 µg/ml) em uma UTI na Itália. A mutação G2576T foi identificada em todos esses isolados.

No Brasil, uma disseminação clonal de *S. haemolyticus* resistentes à linezolida (CIM entre 32-128 µg/ml) foi recentemente relatada em um hospital terciário do Estado de São Paulo (de Almeida et al. 2012b) e, assim como os isolados *S. haemolyticus* mencionados anteriormente, todos tinham a mutação G2576T no rRNA 23S.

Relatos de resistência à linezolida em *S. hominis* também são bem incomuns. Em 2011, na Espanha, uma disseminação nosocomial de um único clone de *S. hominis* resistente à linezolida (CIM ≥ 96 $\mu\text{g/ml}$) e à teicoplanina foi relatada por Gopegui et al. (2011). Dos 14 pacientes envolvidos, três não foram tratados com linezolida. Todos os isolados tinham a mutação G2576T no domínio V do rRNA 23S.

No Brasil, também em 2011, Teodoro et al. relataram a ocorrência de três isolados *S. hominis* resistentes à linezolida (12-64 $\mu\text{g/ml}$) em um hospital terciário do Estado do Rio de Janeiro. No entanto, nenhum mecanismo de resistência foi investigado.

*

A descoberta de outras mutações ao longo da última década, além de G2576T, apontou para a existência de múltiplos sítios no gene rRNA 23S de diferentes espécies de *Staphylococcus* propensos a alterações capazes de conferir resistência à linezolida.

Em 2004, *S. aureus* isolados de hemoculturas de um mesmo paciente durante um período de dois anos apresentaram uma mutação até então desconhecida, T2500A, após um período de 20 e 21 meses de exposição à linezolida (Meka et al. 2004). Neste período, a perda de um alelo rRNA 23S (*rrn6*) foi notada em dois dos isolados resistentes que, por sua vez, apresentaram T2500A em dois ou três de seus alelos: *rrn4* e *rrn5* (CIM de 8 $\mu\text{g/ml}$) e *rrn2*, *rrn4* e *rrn5* (CIM de 16 $\mu\text{g/ml}$). Sete meses após o término do tratamento, um isolado sensível (CIM de 4 $\mu\text{g/ml}$) geneticamente relacionado aos isolados resistentes não apresentava mais T2500A, apenas T2537C, uma mutação que esteve presente na cópia *rrn1* de todos os isolados, independente dos

valores de CIM à linezolida e que, por essa razão, foi considerada pelos autores uma mutação silenciosa sem envolvimento com o fenótipo resistente.

Mais uma vez, foi atribuído ao processo de conversão do gene, dependente de Rec-A, o papel de balancear os custos e benefícios da manutenção de operons selvagens e mutados na presença ou ausência da pressão seletiva, como previamente demonstrado na seleção *in vitro* de *E. faecalis* resistente à linezolida (Lobritz et al. 2003). A conversão do gene explicaria a perda da mutação T2500A e a reversão ao fenótipo sensível, apresentada pelo isolado obtido sete meses após a terapia com linezolida (Meka et al. 2004).

Cinco anos após a descoberta de T2500A, Liakopoulos et al. (2009) relataram a ocorrência de outra mutação próxima a esse nucleotídeo, T2504A. Um isolado clínico *S. epidermidis* resistente à linezolida exibindo altos níveis de resistência (CIM de 256 µg/ml) foi obtido da hemocultura de um paciente com bacteremia internado em UTI, após 20 dias de exposição à linezolida. O isolado não era portador do gene *cfr* ou de qualquer mutação na proteína ribossômica L4, porém apresentou T2504A em cinco de seus seis alelos rRNA23S. Após ser submetido a uma série de 38 passagens em meio sem linezolida, a CIM desse isolado diminuiu de 256 para 8 µg/ml, com apenas um alelo mutado.

Um ano após esse relato, Liakopoulos et al. (2010) descreveram a ocorrência de três mutações em isolados *S. epidermidis* resistentes à linezolida obtidos de amostras de hemocultura e cateter de diferentes pacientes internados em UTIs de quatro hospitais na Grécia, sendo a mutação T2504A identificada em quase 50% dos casos. Assim como o primeiro isolado descrito em 2009, esses também não eram portadores do gene *cfr* nem de qualquer mutação na proteína L4, no entanto, alguns apresentaram simultaneamente T2504A e C2534T no domínio V do gene rRNA 23S. Já a mutação G2576T, também

identificada em alguns isolados desta pesquisa, não esteve presente naqueles portadores de T2504A.

A mutação C2534T, na verdade, foi descrita pela primeira vez por Zhu et al. (2007), ao usarem o método de pirosequenciamento para uma rápida caracterização de isolados *S. aureus* e *S. epidermidis* resistentes à linezolida. A princípio, este método foi adaptado para a pesquisa da mutação G2576T, encontrada em dois ou três dos cinco alelos rRNA 23S dos isolados *S. aureus*. Como a mutação esperada foi identificada em apenas um dos isolados *S. epidermidis*, modificações no ensaio foram necessárias para verificar a presença de outras alterações no gene rRNA 23S envolvidas com a resistência à linezolida. O resultado foi a identificação de uma nova mutação, C2534T, presente em dois dos cinco alelos desses isolados *S. epidermidis* resistentes à linezolida (CIM de 16-32 µg/ml).

Outra mutação detectada devido às modificações no ensaio de pirosequenciamento de Zhu et al. (2007) foi a G2447T, presente em todos os alelos rRNA 23S do único isolado *S. epidermidis* (CIM 64 µg/ml) deste estudo que apresentou essa substituição. Até então, G2447T havia sido descrita apenas em um isolado *Mycobacterium smegmatis* resistente à linezolida, quatro anos antes (Sander et al. 2002).

Tanto a mutação G2447T como T2500A e G2576T foram novamente identificadas em isolados *S. aureus* selecionados *in vitro* com concentrações crescentes de linezolida (Locke et al. 2009a), reforçando o envolvimento desses sítios ribossômicos com a resistência à linezolida em estafilococos.

Da mesma forma, G2447T, G2576T e C2534T foram novamente associadas ao fenótipo resistente de 46 estafilococos resistentes à linezolida obtidos de diferentes instituições dos Estados Unidos entre 2004 e 2007 (Wong et al. 2010). Ainda nesse

estudo, duas outras mutações menos conhecidas nesse momento foram identificadas, T2504A e G2631T. A primeira, simultaneamente descrita por Liakopoulos et al. (2009), ocorreu em apenas dois isolados *S. epidermidis* (ST-5), mas foi considerada pelos autores uma boa candidata à produção do fenótipo resistente, uma vez que nenhuma outra mutação no domínio V do gene rRNA 23S ou na proteína L4 desses isolados *cfr*-negativos foi identificada. Além disso, 16 isolados *S. epidermidis* do mesmo ST, sensíveis à linezolida, não apresentaram T2504A. Já a segunda mutação identificada por Wong et al. (2010), G2631T, recebeu pouco crédito pelo fato de ter ocorrido em apenas um isolado *S. epidermidis* (ST-22) que também possuía as mutações C2534T e G2576T.

Embora a seleção da resistência por mutação seja considerada um evento raro, uma vez que depende de alterações nas múltiplas cópias do gene rRNA 23S, esse processo requer um monitoramento, pois tais mutações estão presentes em importantes espécies bacterianas provenientes de amostras clínicas (Xiong et al. 2000).

Tabela 1. Mutações no gene rRNA 23S associadas com a resistência à linezolida em *Staphylococcus* spp. (n° de alelos mutados/ n° total de alelos: CIM de linezolida)

Mutação	<i>S. aureus</i>	<i>S. epidermidis</i>	<i>S. haemolyticus</i>	<i>S. hominis</i>
G2576U	<p>Tsiodras et al. 2001*</p> <p>Pillai et al. 2002 (5/5: 64 µg/ml)</p> <p>Wilson et al. 2003 (2/6: 8 µg/ml; 5/6: 32 µg/ml)</p> <p>Machado et al. 2003</p> <p>Paterson et al. 2003</p> <p>Meka et al. 2004 (1/5: 2 µg/ml ; 2/5: 8 µg/ml; 4/5:12 µg/ml)</p> <p>Gales et al. 2006</p> <p>Zhu et al. 2006 (2/5: 8 µg/ml ; 2/5: 16 µg/ml; 3/5:32 µg/ml)</p> <p>Tsakris et al. 2007 (1/5: 2 µg/ml ; 4/5: 16 µg/ml; 4/5:64 µg/ml)</p> <p>Wong et al. 2010</p> <p>Hill et al. 2010 (2/4 e 3/5:16 µg/ml)</p> <p>Endimiani et al. 2011 (0/5: 8 µg/ml; 1/5:16 µg/ml; 3 e 4/5:32 µg/ml; 3 e 4/5:64 µg/ml; 3 e 4/5:>256 µg/ml)</p> <p>Ikeda-Dantsuji et al. 2011 (1/5: 8 µg/ml; 2/5: 16 µg/ml; 3 e 4/5: 32 µg/ml; 4/5: 64 µg/ml)</p> <p>Locke et al. 2009a (0/6: 1 µg/ml ; 1 e 2/6: 4 µg/ml; 3/6:16 µg/ml; 4/6: 32 µg/ml)</p>	<p>Potoski et al. 2006</p> <p>Zhu et al. 2006 (3/5: 16 µg/ml;)</p> <p>Kelly et al. 2008</p> <p>Trevino et al. 2009</p> <p>Liakopoulos et al. 2010 (4/6: 16-24 µg/ml; 5/6: 64 µg/ml)</p> <p>Mulanovich et al. 2010</p> <p>Wong et al. 2010</p> <p>Lincopan et al. 2009</p> <p>Almeida et al. 2012a</p> <p>Kosowska-shick et al. 2010 (5/5:32 µg/ml e 2,3 e 5/5: 32/64 µg/ml; 3, 4 e 5/5: >256 µg/ml)</p>	<p>Tarazona et al. 2007*</p> <p>Rodríguez-Aranda et al. 2009</p> <p>Mazzariol et al. 2011 (5/5: 32/64 µg/ml)</p> <p>Almeida et al. 2012b</p>	<p>Sorlozano et al.2010</p> <p>Gopegui et al. 2011</p> <p>Teodoro et al.2011</p>
C2192U	Howe et al. 2002 lab			
G2447U	<p>Wong et al. 2010</p> <p>Livermore et al. 2007</p> <p>Miller et al. 2008</p>	<p>Howe et al. 2002 lab</p> <p>Zhu et al. 2006 (5/5: 64 µg/ml)</p> <p>Locke et al. 2009 (5/5: 256 µg/ml)</p> <p>Wong et al. 2010</p>		
C2534U		<p>Zhu et al. 2006* (2/5: 16-32 µg/ml)</p> <p>Liakopoulos et al. 2010 (2/6: 8-10 µg/ml)</p> <p>Wong et al. 2010</p>		
U2504A		<p>Liakopoulos et al. 2009* (1/6: 8 µg/ml; 5/6: 256 µg/ml)</p> <p>Liakopoulos et al. 2010 (4/6: 1024 µg/ml)</p> <p>Wong et al. 2010</p>		
U2504C	Livermore et al. 2007			
U2500A	<p>Meka et al. 2004 (0/5: 4 µg/ml; 2/5: 8 µg/ml; 3/5: 16 µg/ml)</p> <p>Miller et al. 2008</p> <p>Locke et al. 2009</p>			
U2537C	Meka et al. 2004 (alelo <i>rrnI</i> mutado em todas as cepas independente da CIM)			
G2631U		Wong et al. 2010		

* : primeiro relato em um isolado clínico; lab: mutação gerada em laboratório.

1.2.2 Metilação do rRNA 23S causada pelo gene *cfr*

Descrito pela primeira vez em uma cepa de *S. sciuri* e associado à resistência ao cloranfenicol (Schwarz et al. 2000), o gene *cfr* (*chloranphenicol-florfenicol resistance*) geralmente é identificado em plasmídios, como o pSCFS1 de 17.1Kb (Kehrenberg et al. 2004) ou em outros com tamanhos entre 17 e 43Kb (Kehrenberg & Schwarz 2006; Kehrenberg et al. 2007). O gene *cfr* codifica uma metiltransferase que promove a metilação do rRNA 23S na posição A2503, afetando a ligação de várias classes de antimicrobianos (fenicol, lincosamida, pleuromutilina e estreptogramina A), incluindo as oxazolidinonas (Long et al. 2006).

A aquisição do gene *cfr* parecia estar restrita a isolados de *Staphylococcus* spp. provenientes de animais. No entanto, desde o primeiro relato de uma cepa clínica MRSA *cfr*-positiva na Colômbia (Toh et al. 2007), tem se observado um aumento significativo do número de isolados clínicos de estafilococos contendo esse gene (Mendes et al. 2008; Farrell et al. 2009; Mendes et al. 2010; Morales et al. 2010). A cepa MRSA *cfr*-positiva identificada por Toh et al. (2007) foi obtida de um paciente internado com pneumonia em um hospital na Colômbia em 2005 e apresentava uma CIM de 16 µg/ml para linezolida. Embora um plasmídio de 32Kb tenha sido identificado nessa cepa, o gene *cfr* foi encontrado inserido em seu cromossomo, no mesmo operon (*mlr*) que o gene *ermB*, responsável por uma dimetilação na posição A2058 do rRNA 23S e, consequentemente, pela resistência aos macrolídeos, lincosamidas e estreptograminas do tipo B (fenótipo MLS_B). A co-expressão desses dois genes confere resistência a todos os fármacos que têm como alvo a subunidade 50S do ribossomo bacteriano.

A IS21-558, responsável pela mobilização do plasmídio contendo o gene *cfr* em isolados animais, estava intacta na cepa clínica MRSA descrita por Toh et al. (2007). Além disso, o gene *cfr* estava posicionado próximo ao gene *repS* que tem como produto a proteína RepS, envolvida com o início da replicação do plasmídio. Já a sequência promotora identificada nos plasmídios de origem animal foi eliminada pela inserção do gene *ermB*, um fato curioso, uma vez que *ermB* é prevalente em enterococos, enquanto somente o gene *ermA* é encontrado em isolados MRSA na Colômbia (Reyes et al. 2007). Essa observação levou à hipótese de que esse operon tenha se constituído em enterococos e, então, passado para a cepa MRSA. Uma análise do perfil de restrição desta cepa por PFGE mostrou similaridade com o clone chileno, que emergiu nos hospitais da Colômbia nos últimos cinco anos (Arias et al. 2002) e não com os clones que circulavam nesse país. Essa cepa *cfr*-positiva foi selvagem para o gene rRNA 23S e para a proteína ribossômica L4.

Devido a essa ocorrência do gene *cfr* em uma cepa clínica MRSA, Arias et al. 2008 analisaram vários isolados provenientes de pessoas que tiveram contato com esse paciente e outros 68 isolados MRSA resistentes ao cloranfenicol obtidos de diferentes hospitais na Colômbia entre 2001 e 2004. Nenhum foi portador do gene *cfr*, indicando que a aquisição do elemento móvel que carrega esse gene seja um evento raro na Colômbia. Algumas características epidemiológicas da cepa MRSA *cfr*-positiva também foram investigadas, ela pertencia ao ST-5 e carregava um SCCmec do tipo I (Arias et al. 2008).

Durante o programa LEADER de 2007 que avaliou mais de 50 centros médicos nos Estados Unidos, dois isolados *cfr*-positivos foram identificados, um MRSA e um MRSE. Assim como o isolado descrito por Toh et al. (2007), esses não possuíam nenhuma mutação no rRNA 23S ou na proteína L4. No entanto, carregavam o gene *cfr*

em um plasmídio. O plasmídio da cepa *S. aureus*, p004-737X, apresentou as sequências *istAS* e *istBS* como no pSCFS3, identificado em uma cepa *S. aureus* do trato respiratório de suíno (Kehrenberg et al. 2007), sugerindo que essas sequências de inserção possam estar envolvidas com a mobilização do plasmídio. Porém, outros trechos conhecidos do plasmídio de origem suína não foram amplificados no isolado clínico MRSA, evidenciando diferenças entre esses dois elementos móveis. Quanto ao plasmídio do isolado MRSE, p426-3147L, permaneceu sem caracterização (Mendes et al. 2008).

Dados mais recentes desse mesmo programa de monitoramento da resistência à linezolida (LEADER) mostraram apenas quatro isolados clínicos portadores do gene *cfr* no ano de 2009 - dois *S. aureus*, um *S. epidermidis* e um *S. capitis*. A ocorrência desses isolados em quatro Estados diferentes sugere, segundo os autores, persistência, mas não a disseminação desse elemento de resistência (Farrell et al. 2011).

1.2.3 Mutações nas proteínas ribossômicas L3, L4 e L22

A identificação de isolados resistentes à linezolida *cfr*-negativos e selvagens para o gene rRNA 23S tem levado à análise de outros componentes estruturais do ribossomo que podem estar envolvidos no processo de ligação às oxazolidinonas. Este terceiro mecanismo de resistência foi inicialmente associado a estreptococos com sensibilidade reduzida à linezolida (Feng et al. 2009) e é mediado por mutações nas proteínas L3, L4 ou L22 da subunidade 50S, codificadas, respectivamente, pelos genes *rplC*, *rplD* e *rplV*. Essas proteínas interagem especificamente com o sítio de ligação da linezolida (PTC) e as mutações, possivelmente, promoveriam a resistência por alterar a estrutura do rRNA 23S (Gregory & Dahlberg 1999).

Estudos que mostram o envolvimento de mutações nas proteínas ribossômicas com a resistência à linezolida em estafilococos são bem recentes e, até o momento, limitados a poucas espécies do gênero (Long & Vester 2012) (Tabela 2).

Em 2009, Locke et al. (2009b) incluíram em sua pesquisa dois isolados resistentes à linezolida (*cfr*-negativos) previamente descritos como portadores de um mecanismo desconhecido não baseado no rRNA 23S (Shaw et al. 2008). Análises adicionais indicaram a presença de mutações na proteína L3 como a causa da resistência nesses isolados. Um deles (MRSA com CIM de 8 µg/ml) apresentou uma mutação no gene *rplC* (Δ T433-T435), causa de uma deleção na proteína L3 (Δ Ser145) e, confirmando as análises feitas por Shaw et al. (2008), não apresentou qualquer mutação em seus seis alelos rRNA 23S. O outro isolado (MRSE com CIM de 256 µg/ml) também tinha mutações no gene *rplC* (G469A e C470G), o que gerou a substituição Ala157Arg na proteína L3 e, além disso, tinha a mutação G2447T em cinco cópias do rRNA 23S, não foi possível amplificar o alelo *rrlB* deste isolado (Locke et al. 2009b). A

associação de G2447T com uma mutação na proteína L3 (Gly152Asp) tinha sido observada até o momento apenas *in vitro*, após uma série de passagens da cepa *S. aureus* ATCC 29213 em meio com linezolida (Locke et al. 2009a)¹. Esses dois isolados foram selvagens para a proteína L22.

Um ano após as pesquisas de Locke et al. (2009a,b), o envolvimento de outra proteína ribossômica com a resistência à linezolida foi relatado por Wong et al. (2010). Neste estudo, os autores identificaram quatro mutações na proteína L4 de isolados clínicos *S. epidermidis* resistentes à linezolida (CIM > 4 µg/ml): as substituições K68N, L108S e N158S e a inserção $_{71}\text{GR}_{72} \rightarrow _{71}\text{GGR}_{72}$. Até esse momento, exceto a substituição Lys68Gln gerada em laboratório (Locke et al. 2009a), nenhuma mutação na proteína L4 havia sido identificada em estafilococos resistentes à linezolida. Dois isolados deste estudo, por serem selvagens para o rRNA 23S, permaneceram com o mecanismo de resistência não detectado, no entanto, mutações nas proteínas ribossômicas L3 e L22 não foram investigadas por Wong et al. (2010). Todos os isolados foram *cfr*-negativos.

Pouco tempo depois, novas mutações foram detectadas tanto na proteína ribossômica L3 como na L4 de *S. epidermidis* resistentes à linezolida (CIM $\geq$ 4 µg/ml) provenientes de casos de bacteremia na Itália (Mendes et al. 2010): Phe147Leu, Ala157Arg² e Leu101Val na proteína L3 e Asn158Ser e Lys68Arg em um trecho

¹Mutações na proteína L3 descritas em isolados *S. aureus* selecionados *in vitro* com linezolida e torezolid TR-700 (Locke et al, 2009b) haviam sido anteriormente associadas com a resistência às pleuromutilinas, tiamulina e retapamulina (Kosowska-Shick et al., 2006; Miller et al., 2008). O sítio de ligação desses antimicrobianos se sobrepõe ao das oxazolidinonas no PTC.

² Uma alteração na posição G2447U do rRNA 23S, a qual interage diretamente com U2504 (Davidovich et al., 2008), poderia ser sinérgica com Ala157Arg, explicando o alto nível de CIM de linezolida (256 µg/ml) apresentado pelo isolado *S. epidermidis* do estudo de Locke et al. (2009b). A presença de Ala157Arg na proteína L3 dos isolados *S. epidermidis* (selvagens para o rRNA 23S e para a proteína L22) do estudo de Mendes et al (2010) foi associada a níveis mais baixos de CIM de linezolida (4-8 µg/ml), mesmo em associação com Phe147Leu na L3 e Asn158Ser na L4, reforçando a hipótese proposta anteriormente.

conservado da proteína L4³. Mutações na proteína L22 ou no gene rRNA 23S não foram identificadas neste estudo e apenas um isolado foi portador do gene *cfr*.

A tabela 2 sumariza as diferentes mutações descritas nas proteínas ribossômicas de *Staphylococcus* spp. associadas com a resistência à linezolida desde os primeiros estudos de 2009. Mutações na proteína L22 ainda não foram identificadas em estafilococos resistentes à linezolida, até o momento, foram associadas apenas com a resistência aos macrolídeos em *S. pneumoniae* (Wolter et al. 2005).

³ Mutações que ocorrem dentro de uma região conservada da proteína L4, com aproximadamente doze aminoácidos (₆₃KPWRQKGTGRAR₇₄), e que podem interagir com o rRNA 23S (Tait-Kamradt et al., 2000) têm sido consideradas boas candidatas à determinação do fenótipo resistente, é o caso da inserção ₇₁GGR₇₂ (Wong et al., 2010) e da substituição Lys68Arg (Mendes et al., 2010) identificadas em isolados *S. epidermidis* resistentes à linezolida com CIMs >4 e 8 µg/ml, respectivamente. Mutações nessa região conservada já foram associadas com resistência cruzada a oxazolidinonas, macrolídeos e cloranfenicol em *S. pneumoniae* (Wolter et al. 2005), *S. aureus* (Locke et al. 2009b) e *C. perfringens* (Holzel et al. 2010).

Tabela 2. Alterações nas proteínas ribossômicas associadas com a resistência à linezolida em *Staphylococcus* spp.

Alterações	<i>S. aureus</i>	<i>S. epidermidis</i>	<i>S. cohnii</i>
ΔSer145 na L3	Locke et al. 2009a * Locke et al. 2009c lab		
Ala157Arg na L3		Locke et al. 2009a Mendes et al. 2010a	
Gly152Asp na L3	Locke et al. 2009c lab		
Gly155Arg na L3	Locke et al. 2009c lab		
Leu101Val na L3		Mendes et al. 2010a Kosowska-shick et al. 2010	
Phe147Leu na L3		Mendes et al. 2010a	
Phe147Ile		Kosowska-shick et al. 2010	
Ser158Tyr na L3			Mendes et al. 2010b
Asp159Tyr na L3			Mendes et al. 2010b
His146Arg na L3		Kosowska-shick et al. 2010	
Met156Thr na L3		Kosowska-shick et al. 2010	
Lys68Gln na L4	Locke et al. 2009c lab	Wong et al. 2010	
Leu108Ser na L4		Wong et al. 2010	
Asn158Ser na L4		Wong et al. 2010 Kosowska-shick et al. 2010 Mendes et al. 2010a	
₇₁ GR ₇₂ → ₇₁ GGR ₇₂ na L4		Wong et al. 2010	
Lys68Arg na L4		Mendes et al. 2010a	
Asn20Ser na L4			Mendes et al. 2010b
Ala133Thr na L4			Mendes et al. 2010b
Val155Ile na L4			Mendes et al. 2010b

*, primeiro relato em um isolado clínico; lab, mutação gerada em laboratório.

1.3 Mecanismo de conversão do gene mediado por RecA

Em bactérias, os ribossomos determinam a capacidade de tradução. Por este processo estar diretamente ligado ao crescimento celular, o controle da transcrição de rRNA e a biogênese do ribossomo são de grande importância para a adaptação às mudanças ambientais. Em *E. coli*, a transcrição de seus sete operons rRNA (*rrnA*, *rrnB*, *rrnC*, *rrnD*, *rrnE*, *rrnG*, e *rrnH*) representa mais da metade do total de RNA sintetizado na célula em condições de crescimento rápido (Condon et al. 1995).

Como se sabe, o rRNA é alvo para alguns antibióticos ou outros agentes que inibem a síntese protéica. A frequência com que bactérias com mutações em múltiplas cópias do gene rRNA 23S são identificadas na clínica sugere que a recombinação homóloga entre os alelos mutados e selvagens desse gene possa promover altos níveis de resistência sob condições de pressão seletiva. Este fenômeno, conhecido como conversão do gene, já foi relacionado ao aumento do nível de resistência a aminoglicosídeos em *M. smegmatis* (Prammananan et al. 1999), à evermicina em *S. pneumoniae* (Adrian et al. 2000) e à linezolida em *E. faecalis* (Lobritz et al. 2003).

Em *M. smegmatis*, espécie portadora de dois operons rRNA (*rrnA*/*rrnB*), a proteína RecA foi associada ao mecanismo de conversão do gene. A transformação de um mutante *rrnB/recA* com um vetor expressando um operon rRNA mutado na posição 1408 (A→G) gerou um fenótipo sensível aos aminoglicosídeos, ao contrário dos transformados resistentes não deficientes de *recA* que apresentaram um genótipo heterozigoto ($rRNA^{selv}/rRNA^{mut}$) caracterizado por um nucleotídeo mutado e um selvagem na posição 1408 do rRNA 16S. Como o genótipo homozigoto mutante também foi observado nos transformados resistentes ($rRNA^{mut}/rRNA^{mut}$), a conversão do gene mediada por RecA teria sido o mecanismo responsável pela resistência nas

cepas heterozigotas. Na ausência de RecA, a heterozigose implicaria em sensibilidade aos aminoglicosídeos (Prammananan et al. 1999).

Uma alta frequência do processo de conversão do gene entre alelos *rrn* também foi associada ao surgimento de cepas de *S. pneumoniae* resistentes à evermicina. Uma vez que várias cópias do operon *rrn* estão presentes no cromossomo, a conversão de alelos rRNA 23S selvagens a mutantes poderia ser necessária para a estabilidade do fenótipo resistente em *S. pneumoniae* (Adrian et al. 2000).

Em uma terceira situação, envolvendo *E. faecalis*, o mecanismo de conversão do gene foi responsável pela estabilidade do fenótipo resistente em cepas com a mutação G2576T no gene rRNA 23S. Lobritz et al. (2003) selecionaram mutantes resistentes de *E. faecalis* por meio de passagens em meio contendo linezolida. O mutante resistente apresentou somente a mutação G2576T, sendo o menor nível de resistência detectado nesta cepa associado a duas cópias mutadas. A ausência desta mutação na cepa deficiente de recombinação sugeriu que maiores porcentagens de alelos rRNA 23S promoveriam a conversão do gene (recombinação homóloga entre alelos resistentes e sensíveis). Segundo os autores, a cepa deficiente de recombinação poderia ser capaz de mutar apenas um alelo, mas não teria como desenvolver as recombinações subsequentes para gerar níveis detectáveis de resistência. Já o fato de outra mutação, G2505A, ter aparecido somente na cepa deficiente de recombinação em diferentes concentrações de CIM de linezolida permaneceu sem explicação. Testes adicionais como a procura de outras mutações no domínio V do rRNA 23S ou outros mecanismos de resistência que poderiam estar associados a níveis mais elevados de CIMs não foram realizados.

Em bactérias, a proteína RecA pode promover o pareamento de bases entre uma fita simples de DNA e sua complementar em uma molécula duplex, atividade que ocorre na presença de ATP. Este processo conhecido como captação ou assimilação de

fita simples está relacionado à iniciação da recombinação. RecA atua nos substratos gerados por RecBCD. O desenovelamento e a clivagem feitos por este sistema deixam fitas simples com a extremidade 3' liberada, disponível para a atuação de RecA (Kowalczykowski et al. 1994).

1.4 Resistência cruzada a antimicrobianos que atuam no PTC

Nucleotídeos comuns envolvidos com a resistência a diferentes classes de antimicrobianos ocorre, ao que tudo indica, devido à sobreposição dos sítios de ligação desses fármacos no PTC. Um número limitado de nucleotídeos no PTC propensos a mutações aumenta a probabilidade de aquisição de resistência a mais de uma classe de antimicrobiano quando um deles é alterado. Essa situação é acentuada ainda mais pela flexibilidade e localização central do resíduo U2504. Por estar localizado na camada de nucleotídeos que define a área de ligação com os antimicrobianos no PTC, perturbações em sua conformação, geradas por alterações em nucleotídeos vizinhos, remodelam a área de ligação a fenicóis, lincosamidas (Schlünzen et al. 2001), pleuromutilinas (Schlünzen et al. 2004) e oxazolidinonas (Wilson et al. 2008).

Alterações em outros nucleotídeos também estão sendo associadas com a resistência a diferentes antimicrobianos no PTC. Em *E. coli*, por exemplo, a mutação C2032A parece ser responsável pela resistência ao cloranfenicol e clindamicina (Douthwaite 1992), enquanto G2057A, ao cloranfenicol e eritromicina (Ettayebi et al. 1985). As mutações A2058G e A2058U, também em *E. coli*, promovem redução de sensibilidade ao cloranfenicol e resistência à clindamicina e eritromicina (Douthwaite 1992). Em *S. pneumoniae*, A2062C, com a mutação Ser20Asn na proteína L4, é causa da resistência a estreptograminas e macrolídeos (Mankin & Garrett 1991).

Em estafilococos, o fenótipo de múltipla resistência (PhLOPS_A) determinado pela expressão do gene *cfr* (Kehrenberg et al. 2005; Long et al. 2006) é um exemplo de resistência cruzada envolvendo linezolida. Outra possibilidade de resistência cruzada no PTC entre linezolida e tiamulina foi descrita por Miller et al. em (2008).

Após a aprovação do uso de retapamulina, um derivado semi-sintético de pleuromutilina, para o tratamento de impetigo causado por MSSA e *S. pyogenes* (Jones et al. 2006), Miller et al. (2008) investigaram se outros mecanismos de resistência à linezolida em isolados clínicos *S. aureus* – além da metilação do nucleotídeo A2503 do rRNA 23S mediada pelo gene *cfr* – poderiam conferir resistência às pleuromutilinas. Os autores observaram que mutantes *S. aureus* resistentes à linezolida exibiam resistência à tiamulina. No entanto, a resistência foi unidirecional porque mutantes *S. aureus* resistentes à tiamulina não exibiam resistência à linezolida, uma situação diferente da apresentada por isolados com o fenótipo PhLOPS_A. A análise do genótipo desses mutantes mostrou que a seleção com tiamulina resultou em alterações na proteína L3 (Gly155Arg; Ser158Leu ou Arg149Ser), enquanto a seleção com linezolida gerou mutantes com G2576T em todas as cinco cópias do gene rRNA 23S.

Essa resistência cruzada unidirecional, segundo Miller et al. (2008), poderia limitar o uso sistêmico de pleuromutilinas em pacientes nos quais o tratamento com linezolida não foi bem sucedido. Por outro lado, a emergência de isolados resistentes às pleuromutilinas devido a mutações de ponto (em apenas uma cópia do gene *rplC*, ao invés de múltiplas cópias mutadas do rRNA 23S) poderia ter pouco impacto na sensibilidade à linezolida. Segundo os autores, a relativa facilidade com que mutações no gene *rplC* são adquiridas, comparado com a aquisição de mutações nas múltiplas cópias do gene rRNA 23S, poderia explicar porque a resistência à tiamulina, causada por mutações nos alelos deste gene, seria um evento improvável. Além disso, o nível de

resistência conferido por mutações no gene *rpIC* foi muito similar ao mediado pelo rRNA 23S, sugerindo que não há vantagem seletiva no acúmulo de mutações nas cópias desse gene.

1.5 Estafilococos coagulase-negativos

Estafilococos coagulase-negativos pertencem ao gênero *Staphylococcus*, atualmente composto por 37 espécies (<http://www.bacterio.cict.fr/>). Diferem de *S. aureus* e das demais espécies coagulase-positivas do gênero, como sugere o nome, pela ausência da enzima coagulase. São bactérias que podem constituir a microbiota da pele e membranas mucosas de humanos e de outros mamíferos. Geralmente estabelecem uma relação simbiótica com seus hospedeiros, mas podem se tornar patogênicos ao invadir o tecido hospedeiro por meio de traumas, inoculação de agulhas ou implantação direta de dispositivos médicos (Murray et al. 2007).

O papel das espécies de SCNs como patógenos nosocomiais vem sendo reconhecido em um crescente número de relatos, especialmente para *S. epidermidis*. Sempre considerado um microrganismo comensal inofensivo da pele humana, é agora visto como um importante patógeno oportunista responsável por infecções nosocomiais associadas a dispositivos médicos de longa permanência (Otto 2009). O tratamento de infecções associadas a esse patógeno é complicado devido a sua capacidade de formar biofilmes (Costerton 1999) e à presença de diferentes genes de resistência a antimicrobianos em isolados dessa espécie. Análises do genoma de *S. epidermidis* mostraram que a espécie possui muitos genes que parecem estar envolvidos com funções de adaptação ao ambiente natural (Zhang et al. 2003), enfatizando a natureza acidental das infecções causadas por essa bactéria (Otto 2009).

Outras espécies de SCNs como *S. haemolyticus*, *S. hominis* e *S. warneri* também têm sido associadas a infecções nosocomiais em diferentes países, incluindo meningite, bacteremia, endocardite e sepse (Chaves et al. 2005; Sunbul et al. 2006; Azevedo et al. 2008; Palazzo et al. 2008).

2. Objetivos

2.1 Gerais

- Determinar os mecanismos envolvidos com a resistência à linezolida em cepas de estafilococos coagulase-negativos e analisar a estabilidade do fenótipo resistente.

2.2 Específicos

- Verificar a presença do gene *cfr* e a ocorrência de mutações no domínio V do gene rRNA 23S e nos genes *rplC*, *rplD* e *rplV*, codificadores, respectivamente, das proteínas ribossômicas L3, L4 e L22.
- Promover a reversão ao fenótipo sensível e analisar a estabilidade de eventuais mutações no domínio V do gene rRNA 23S e nos genes *rplC*, *rplD* e *rplV*.
- Relacionar os níveis de concentração inibitória mínima (CIM) de linezolida com o número de alelos rRNA 23S mutados.
- Conhecer a clonalidade molecular das cepas de estafilococos coagulase-negativos resistentes à linezolida.

3. Material e Métodos

3.1 Amostras bacterianas

Foram incluídas 38 cepas de SCN resistentes à linezolida (20 *S. epidermidis*, 14 *S. haemolyticus*, 3 *S. hominis* e 1 *S. warneri*) isoladas de hemoculturas e pontas de cateter de diferentes pacientes internados em dois hospitais terciários do Estado de São Paulo. Essas amostras foram coletadas no período de 2008 a 2011. Uma cepa de cada espécie (sensível à linezolida), obtidas de pacientes internados no mesmo hospital neste período, também foram incluídas como controle.

3.2 Metodologia

3.2.1 Identificação das espécies de SCNs

As espécies de SCNs foram identificadas pelo sistema Vitek-2 (bioMérieux, St Louis, MO, USA) e confirmadas genotipicamente segundo Hirota et al. 2011 e Iorio et al. 2011.

3.2.2 Antibiograma

Para a avaliação do perfil de sensibilidade a antimicrobianos das cepas em estudo foi empregado o método de disco-difusão conforme recomendações do CLSI/M02-A10 (2009). A interpretação dos resultados foi feita segundo as atualizações do documento M100-S22 (CLSI, 2012). Os seguintes discos de antimicrobianos foram utilizados: ciprofloxacina (5µg); teicoplanina (30µg), sulfametoxazol-trimetoprim (23.75/1.25µg); ampicilina (30µg), gentamicina (10µg), eritromicina (15µg),

azitromicina (15µg); clindamicina (2µg); tetraciclina (30µg), cloranfenicol (30µg). A cepa de *S. aureus* ATCC 25923 foi usada como controle de qualidade da técnica e dos discos utilizados.

3.2.3 Concentração inibitória mínima (CIM)

A determinação da concentração inibitória mínima (CIM) de linezolida foi realizada por meio da técnica de microdiluição em caldo conforme recomendações do CLSI/ M07-A8 (2009) e a interpretação dos resultados foi feita segundo as atualizações do documento M100-S22 (CLSI, 2012). Fitas E-test (AB bioMérieux, Marcy l'Étoile, France) foram utilizadas para a determinação da CIM de oxacilina e vancomicina. A cepa de *S. aureus* ATCC 29213 foi utilizada como controle dos testes.

3.2.4 Extração do DNA cromossômico

A obtenção do DNA cromossômico das cepas foi feita por meio da técnica de extração fenol-clorofórmio adaptada de Sambrook et al. (1989). As bactérias foram cultivadas por 24 horas a 37°C em caldo BHI (*Brain Heart Infusion* – DIFCO, Detroit, EUA). Desta cultura, 1ml foi centrifugado a 5000 rpm/ 10 minutos para a precipitação das células bacterianas. O sobrenadante foi descartado e o *pellet* ressuspenso em 500µl de tampão de lise (50mM Tris, pH 8; 5mM EDTA pH 8; 50mM NaCl). Lisostafina a uma concentração final de 20µl/ml foi adicionada a esta suspensão para a digestão da parede celular e a solução incubada em banho-maria a 37°C por 2 horas. A membrana celular foi rompida com 30µl de uma solução de duodecil sulfato de sódio (SDS) a 20% e, para a lise das proteínas presentes, foi utilizada a enzima proteinase K (100mg/ml) a

uma concentração final de 6µl/ml. Esta solução foi novamente incubada em banho-maria por 2 horas a 50°C. A remoção das proteínas foi realizada por meio de separação de fases com 500µl de uma mistura de clorofórmio com álcool isoamílico (24:1). Após centrifugação a 5000 rpm/ 10 minutos, a fase superior foi transferida para outro tubo onde foram adicionados 700µl de etanol absoluto gelado e 50µl de NaCl 5M para a precipitação do DNA. Esta solução permaneceu a -20°C por 12 horas e depois foi centrifugada a 15000 rpm/ 20 minutos. O sobrenadante foi descartado e outra centrifugação a 15000 rpm/ 20 minutos foi realizada com adição de etanol 70% gelado. Após descarte do sobrenadante, o tubo permaneceu aberto no fluxo até evaporação total do etanol e o *pellet* foi solubilizado em 100µl de tampão TE (10mM Tris; 1mM EDTA - pH 8). Esta solução ficou armazenada a -20°C até ser utilizada.

3.2.5 Amplificação e sequenciamento do domínio V do gene rRNA 23S

O domínio V do gene rRNA 23S foi, em um primeiro momento, amplificado com a utilização dos iniciadores descritos por Tsiodras et al. (2001). Para análise de outro trecho do domínio V novos iniciadores foram sintetizados (Tabela 3). As sequências *forward* e *reverse* desses novos iniciadores correspondem, respectivamente, às bases 2097 – 2119 e 2703 – 2724 do gene rRNA 23S de *S. aureus* (nº de acesso no GenBank X68425). Para a amplificação do domínio V desse gene foi preparada uma mistura contendo: 4µL de DNA a uma concentração aproximada de 10ng/µL; 0,5µL de DNA polimerase de alta fidelidade (Phusion® 2,000 U/ml); 10µL do tampão concentrado fornecido com a enzima; 1µL de dNTP (cada um a 200µM); 2µL de cada iniciador a 250nM e água deionizada para completar o volume final de 50µL.

As reações foram amplificadas no termociclador Veriti Thermal Cycler 6.5 (Applied Biosystems) com as seguintes condições: um ciclo de 5 minutos a 94°C seguido de trinta ciclos de amplificação, cada um consistindo de 30 segundos a 95°C, 1 minuto a 55°C e 1 minuto a 72°C. A reação foi concluída com um ciclo de 5 minutos a 72°C. O produto amplificado foi visualizado por meio de eletroforese em gel de agarose conforme descrito no item 3.2.6.

Os produtos da PCR foram purificados e sequenciados conforme descrito no item 3.2.12. As sequências genéticas do domínio V do rRNA 23S das cepas de *S. epidermidis*, *S. haemolyticus* e *S. hominis* foram alinhadas, por meio do programa Bioedit, tanto com as sequências de cepas sensíveis usadas como referência, respectivamente CP000029.1, AP006716.1 e 629742 (n^{os} de acesso no GenBank), como com as respectivas sequências das cepas controle obtidas no próprio hospital. Porém, o relato dos nucleotídeos mutados foi feito segundo o sistema de numeração padrão correspondente ao alelo *rrnB* da cepa *E.coli* K12.

3.2.6 Eletroforese em gel de agarose

Para a visualização e análise dos fragmentos de DNA amplificados, 1µL de uma solução aquosa (1:1000) contendo GelRedTM (Biotium/ Hayward, CA) foi adicionado a cerca de 8µL do produto da PCR e a uma pequena alíquota de uma solução tampão (azul de bromofenol 0,25%; xileno cianol FF 0,25%; glicerol 30%). Essa mistura foi submetida à eletroforese em um gel de agarose a 1%, preparado com tampão TBE 1X (Tris base 890mM; EDTA 25mM; ácido bórico 89mM), por cerca de 40 minutos a 100 volts. Foi utilizado um padrão de massa molecular conhecido (100 pb DNA Ladder –

Invitrogen™) e, posteriormente, o gel foi fotografado sob transiluminação com luz ultravioleta no equipamento Alpha Digi Doc® Pro (Alpha Innotech).

3.2.7 Amplificação e sequenciamento dos genes *rplC*, *rplD* e *rplV*

Os genes *rplC*, *rplD* e *rplV*, codificadores das proteínas L3, L4 e L22, respectivamente, foram amplificados com os iniciadores apresentados na tabela 3. Para a amplificação desses genes foi preparada a mesma mistura descrita no item 3.2.5 e para a visualização dos fragmentos amplificados foi utilizada a eletroforese em gel de agarose conforme descrito no item 3.2.6.

Os produtos da PCR foram purificados e sequenciados conforme descrito no item 3.2.12 e as sequências de proteínas correspondentes foram alinhadas, por meio do programa Bioedit, tanto com as sequências das cepas sensíveis de *S. epidermidis*, *S. haemolyticus* e *S. hominis* usadas como referência (n^{os} de acesso no GenBank, respectivamente, CP000029.1, AP006716.1 e 629742), como com as sequências de proteínas das cepas controle obtidas no próprio hospital. As proteínas L3, L4 e L22 contém, respectivamente, 220, 207 e 117 aminoácidos.

3.2.8 Identificação do gene *cfr* por meio da reação em cadeia da polimerase (PCR)

A identificação do gene *cfr* foi realizada conforme descrito por Kehrenberg & Schwarz (2006) (Tabela 3). Para a amplificação desse gene foi preparada uma mistura contendo: 2µL de DNA a uma concentração aproximada de 10ng/µL; 0,25µL de Taq polimerase (Fermentas 0,5U); 2,5µL do tampão concentrado fornecido com a enzima;

2,5µL de MgCl₂ a 2,5mM; 2,5µL de dNTP (cada um a 200µM); 1µL de cada iniciador a 250nM e água deionizada para completar o volume final de 25µL. As reações foram amplificadas no termociclador Veriti Thermal Cycler 6.5 (Applied Biosystems) com as seguintes condições: um ciclo de 5 minutos a 94°C seguido de trinta ciclos de amplificação, cada um consistindo de 30 segundos a 95°C, 1 minuto a 40-60°C e 1 minuto a 72°C. A reação foi concluída com um ciclo de 5 minutos a 72°C. A eletroforese em gel de agarose e visualização dos fragmentos amplificados foram realizadas conforme descrito no item 3.2.6.

3.2.9 Reversão ao fenótipo sensível à linezolida

Após a confirmação da presença da mutação G2576T no domínio V do rRNA 23S (conforme descrito no item 3.2.5), algumas cepas selecionadas com base nos perfis de restrição definidos por PFGE e nos níveis de CIM de linezolida (Tabela 6) foram submetidas a uma série de 130 passagens em meio sem linezolida ou qualquer outro antimicrobiano. Durante essa série, as cepas de SCNs foram semeadas em ágar Mueller Hinton (MH) e incubadas a 37°C durante um período de 18-24 horas.

A determinação da concentração inibitória mínima (CIM) de linezolida foi realizada conforme descrito no item 3.2.3, inicialmente, a cada dois ou três dias e depois com intervalos maiores, quinze dias a um mês.

3.2.10 Identificação do número de alelos rRNA 23S mutados

Uma estimativa do número de alelos mutados de todas as cepas deste estudo foi obtida por meio da restrição do domínio V do rRNA 23S (item 3.2.10.a) e o

sequenciamento individual do domínio V de cada cópia do rRNA 23S (item 3.2.10.b) foi feito – no dia 1 e no dia 130 da série de passagens – para algumas das cepas submetidas ao processo de reversão ao fenótipo sensível.

3.2.10.a Restrição do domínio V do rRNA 23S

O produto amplificado do domínio V do rRNA 23S, conforme descrito no item 3.2.5, foi submetido à restrição com a utilização da enzima NheI (Invitrogen), que reconhece e cliva o trecho 5'-G↓CTAG C-3'

A visualização do número e do tamanho dos fragmentos obtidos com a restrição foi realizada conforme descrito no item 3.2.6.

3.2.10.b Sequenciamento individual do domínio V dos alelos *rrlA-F*

Os alelos *rrlA-F* foram amplificados individualmente com os iniciadores apresentados na tabela 3. A amplificação desses alelos foi realizada segundo o procedimento descrito no item 3.2.5, porém com temperaturas de anelamento e tempo de extensão de 40-50°C e 3 minutos, respectivamente. Para a visualização dos múltiplos alelos *rrl*, foi preparado um gel de agarose de 0.8% e utilizado um padrão de massa molecular de 1 Kb (DNA Ladder – Invitrogen™).

Subsequentemente, o domínio V de cada alelo *rrl* foi amplificado segundo o procedimento descrito no item 3.2.5 e a visualização dos produtos amplificados foi realizada conforme o item 3.2.6. Os produtos da reação de PCR foram purificados e sequenciados conforme o item 3.2.12.

Tabela 3. Iniciadores utilizados na amplificação dos genes envolvidos com a resistência à linezolida.

Genes	Iniciadores	Sequências (5'-3')	Fragmentos (pb)	Referências
<i>cfr</i>	<i>cfr</i> - F	TGAAGTATAAAGCAGGTTGGGAGTCA	746	Kehrenberg e Schwarz, 2006
	<i>cfr</i> - R	ACCATATAATTGACCACAAGCAGC		Kehrenberg e Schwarz, 2006
rRNA 23S	<i>domV</i> - F	GCTTTACTGTAGCCTGATATTGA	618	Almeida et al. 2012a,b
	<i>domV</i> - R	GACAACTGGTACACCAGAGGTA		Almeida et al. 2012a,b
<i>rrlA</i>	<i>rrlA</i> - F	AAACCAATTGGGATTAAAGT	5548	Liakopoulos et al. 2009
	<i>rrlA</i> - R	TTCGAGGGATCTTATAACCG		Liakopoulos et al. 2009
<i>rrlB</i>	<i>rrlB</i> - F	CCTCCAACCTGGTGGTCTAGG	6083	Liakopoulos et al. 2009
	<i>domV</i> - R	GACAACTGGTACACCAGAGGTA		Almeida et al. 2012a,b
<i>rrlC</i>	<i>rrlC</i> - F	GAGTCCAACCTAGGCCACCA	2928	Liakopoulos et al. 2009
	<i>domV</i> - R	GACAACTGGTACACCAGAGGTA		Almeida et al. 2012a,b
<i>rrlD</i>	<i>domV</i> - F	GCTTTACTGTAGCCTGATATTGA	6375	Almeida et al. 2012a,b
	<i>rrlD</i> - R	AACATTTATTCTCGATGAAA		Liakopoulos et al. 2009
<i>rrlE</i>	<i>rrlE</i> - F	TGTTGATGGAGCTTCAGTAG	4358	Liakopoulos et al. 2009
	<i>rrlE</i> - R	TAACCATTTGGAGCTAGCCG		Liakopoulos et al. 2009
<i>rrlF</i>	<i>rrlF</i> - F	TCTTGTATCTCTTCCTACTA	6058	Liakopoulos et al. 2009
	<i>rrlF</i> - R	TAACCATTTGGAGCTAGCCG		Liakopoulos et al. 2009
<i>rplC</i>	<i>rplC</i> - F	AACCTGATTTAGTTCCGCTCTA	822	Miller et al. 2008
	<i>rplC</i> - R	GTTGACGCTTTAATGGGCTTA		Miller et al. 2008
<i>rplD</i>	<i>rplD</i> - F	TCGCTTACCTCCTTAATG	1200	Miller et al. 2008
	<i>rplD</i> - R	GGTGGAACACTGTAACCTG		Miller et al. 2008
<i>rplV</i>	<i>rplV</i> - F	CAACACGAAGTCCGATTGGA	350	Mendes et al. 2010
	<i>rplV</i> - R	GCAGACGACAAGAAAACAAG		Mendes et al. 2010

3.2.11 Eletroforese em gel de campo pulsado (PFGE)

As cepas de SCNs foram semeadas em ágar sangue de carneiro a 5% (*Columbia Blood Agar*, DIFCO, enriquecido com 5% de sangue de carneiro desfibrinado) e incubadas a 37°C durante 24 horas. Após este período, as colônias foram transferidas para tubos de microcentrífuga e ressuspensas com EDTA 50mM pH 8,0 (concentração final de 100µg de massa bacteriana por µl). Desta suspensão, 15µl foram transferidos

para outros tubos de microcentrífuga contendo 215µl de tampão EC. A esta solução foram adicionados 250µl de agarose de baixo ponto de fusão a 2% (Sigma, USA) e 20µl de solução de lisostafina (100µg/ml; Sigma, USA). Esta mistura foi transferida para os moldes onde permaneceu por 30 minutos a 4°C para solidificação dos blocos. Após esta etapa, os blocos foram colocados em uma placa de cultura de células contendo 2ml de tampão EC em cada orifício. Esta placa foi incubada a 37°C por um período de 5 horas sob leve agitação. Após a incubação, os blocos foram lavados com 2,5ml de tampão CHEF TE e, a seguir, incubados com 1ml de tampão ES adicionado de 50µl de solução de proteinase K (20mg/ml - Invitrogen USA) por 12 horas à temperatura de 50°C. Na sequência, os blocos foram lavados com 2,5ml de tampão CHEF TE e incubados à temperatura ambiente por 1 hora sob leve agitação (4 lavagens com incubações de uma hora cada). Foram armazenados nesta solução até serem submetidos à digestão enzimática e eletroforese (Pfaller 1993).

A digestão do DNA cromossômico foi realizada com a enzima de restrição FastDigest® SmaI (CCC↓GGG) (Fermentas *Life Sciences*, Canadá), que reconhece e cliva seqüências de nucleotídeos que aparecem poucas vezes ao longo do DNA de *Staphylococcus* spp. (12 a 20 sítios de restrição) (Prevost et al. 1992; Struelens et al, 1992). Para o tratamento com a enzima de restrição, um bloco de agarose de cada amostra foi transferido a uma placa de cultura de células de 96 orifícios contendo 300µl de tampão DNS. A seguir, este tampão foi retirado e, novamente, foram adicionados 300µl do mesmo tampão. Os blocos foram incubados à temperatura ambiente por 1 hora e este procedimento foi repetido por quatro vezes. Após esta série de lavagens, o tampão DNS foi substituído por 100µl de uma solução contendo tampão FastDigest® IX e a enzima FastDigest® SmaI. Em seguida, os blocos foram incubados por 6 minutos a 37°C.

A eletroforese em campo pulsado foi realizada em gel de agarose a 1% (sigma, USA) em TBE 0,5X (90mM Tris; 90mM ácido bórico; 2mM EDTA *Amersham Pharmacia Biotech*, USA) (Sambrook et al. 1989) no equipamento CHEF DRII System (BIO-RAD, USA) programado para dois blocos de 12 horas cada com intervalos de tempo de pulso de 5 e 15 segundos, ângulo de 120°, temperatura de 14°C e voltagem de 6,0 volts/cm (Pfaller 1993).

O gel foi corado com uma solução contendo GelRedTM (Biotium/ Hayward, CA) e fotografado sob transiluminação com luz ultravioleta no equipamento Alpha Digi Doc® Pro (Alpha Innotech). Foi utilizado como padrão de peso molecular o Lambda DNA ladder PFGE (*New England Biolabs, Inc.*, USA), com extensão das bandas de 48,5Kb até 1,0Mb (Pfaller 1993). Os perfis de restrição do DNA gerados com a utilização da enzima SmaI foram analisados por meio de um dendrograma gerado com a utilização do coeficiente de similaridade DICE (programa BioNumerics) e segundo os critérios de Tenover et al. (1995).

3.2.12 *Multilocus sequence typing* (MLST)

Fragmentos internos de sete genes conservados de *S. epidermidis* foram amplificados segundo Thomas et al. (Thomas et al. 2007) (Tabela 4). Para a amplificação de cada um desses genes foi preparada uma mistura contendo: 4µL de DNA a uma concentração de 10ng/µL; 0,5µL de Taq polimerase (Fermentas 0,5U); 5µL do tampão concentrado; 5µL de MgCl₂ a 2,5mM; 5µL de dNTP (cada um a 200µM); 2µL de cada iniciador a 250nM e água deionizada para completar o volume final de 50µL. As reações foram amplificadas no termociclador Veriti Thermal Cycler 6.5 (Applied Biosystems) com as seguintes condições: um ciclo de 5 minutos a 94°C

seguido de trinta ciclos de amplificação, cada um consistindo de 30 segundos a 95°C, 1 minuto a 55°C e 1 minuto a 72°C. A reação foi concluída com um ciclo de 5 minutos a 72°C.

Os produtos da PCR foram purificados com a utilização do kit de purificação GE Healthcare segundo as recomendações do fabricante e enviados ao Centro de Estudos do Genoma Humano para sequenciamento. Foi utilizado um sistema de análise de DNA de 48 capilares, o ABI 3730 DNA Analyser (Applied Biosystems) e as reações de sequenciamento foram feitas com o BigDye®Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (código 4337456). As sequências genéticas foram analisadas e comparadas com as sequências publicadas na base de dados www.mlst.net por meio do programa Bioedit. A técnica de MLST foi realizada apenas para *S. epidermidis*, pois ainda não foi descrita para as demais espécies de SCNs.

Tabela 4. Iniciadores utilizados na amplificação dos fragmentos internos dos genes analisados pela técnica de MLST

Genes	Iniciadores	Sequências (5'-3')	Fragmentos (pb)	Referências
<i>arcC</i>	<i>arcC</i> - F	TGTGATGAGCACGCTACCGTTAG	465	Thomas et al. 2007
	<i>arcC</i> - R	TCCAAGTAAACCCATCGGTCTG		Thomas et al. 2007
<i>aroE</i>	<i>aroE</i> - F	CATTGGATTACCTCTTTGTTTCAGC	420	Thomas et al. 2007
	<i>aroE</i> - R	CAAGCGAAATCTGTTGGGG		Thomas et al. 2007
<i>gtr</i>	<i>gtr</i> - F	CAGCCAATTCTTTTATGACTTTT	438	Thomas et al. 2007
	<i>gtr</i> - R	GTGATTAAAGGTATTGATTGAAT		Thomas et al. 2007
<i>mutS</i>	<i>mutS</i> – F3	GATATAAGAATAAGGGTTGTGAA	412	Thomas et al. 2007
	<i>mutS</i> – R3	GTAATCGTCTCAGTTATCATGTT		Thomas et al. 2007
<i>pyrR</i>	<i>pyrR</i> – F2	GTTACTAATACTTTTGCTGTGTTT	428	Thomas et al. 2007
	<i>pyrR</i> – R4	GTAGAATGTAAAGAGACTAAAATGAA		Thomas et al. 2007
<i>tpiA</i>	<i>tpiA</i> – F2	ATCCAATTAGACGCTTTAGTAAC	424	Thomas et al. 2007
	<i>tpiA</i> – R2	TTAATGATGCGCCACCTACA		Thomas et al. 2007
<i>yqiL</i>	<i>yqiL</i> – F2	CACGCATAGTATTAGCTGAAG	416	Thomas et al. 2007
	<i>yqiL</i> – R2	CTAATGCCTTCATCTTGAGAAATAA		Thomas et al. 2007

arcC (carbamate kinase); *aroE* (shikimate dehydrogenase); *gtr* (ABC transporter); *mutS* (DNA mismatch repair protein); *pyrR* (pyrimidine operon regulatory protein); *tpiA* (triosephosphate isomerase) e *yqiL* (acetyl coenzyme A acetyltransferase).

4. Resultados

4.1 Identificação das espécies de SCNs

As espécies de SCNs foram previamente identificadas pelo sistema Vitek-2 (bioMérieux, St. Louis, MO) e confirmadas genotipicamente segundo Hirotaki et al. (2011) e Iorio et al. 2011 (Figura 3).

Figura 3. Identificação genotípica das espécies de SCNs. **A:** Fragmento referente a um trecho específico do gene *nuc* em *S. epidermidis* - 251 pb. **B:** Trechos específicos dos genes *recN* - 219 pb - e *mecA* - 154 pb - de *S. epidermidis*. **C:** Fragmentos referentes a trechos específicos do gene *nuc* em *S. haemolyticus* - 434 pb - e *S. hominis* - 177 pb. Marcadores de peso molecular de 100 pb em A, B e C.

4.2 Perfil de sensibilidade aos antimicrobianos

As cepas de SCNs apresentaram um perfil de multiresistência aos diferentes antimicrobianos testados, permanecendo sensíveis à vancomicina (CIM < 4 µg/ml) e, exceto a cepa *S. epidermidis* 19/532, à teicoplanina (Tabela 5).

Em relação aos macrolídeos, maior sensibilidade foi observada entre as cepas de *S. epidermidis*, sendo três cepas sensíveis aos dois antimicrobianos testados dessa classe e cinco cepas sensíveis à azitromicina com resistência intermediária à eritromicina. Entre as cepas de *S. haemolyticus*, apenas a 27/274 foi sensível à eritromicina,

permanecendo resistente à azitromicina. Já em relação aos aminoglicosídeos, maior sensibilidade foi observada entre as cepas de *S. haemolyticus*. Exceto as cepas 29/312, 44/862, 49/1162 e 52/978, resistentes à gentamicina, todas as cepas dessa espécie apresentaram sensibilidade tanto à amicacina como à gentamicina. Um perfil de sensibilidade à tetraciclina foi comum a quase todas as cepas de SCNs, exceto sete cepas de *S. epidermidis* que apresentaram resistência intermediária e duas cepas, *S. epidermidis* 19/532 e *S. hominis* 46/97, que foram resistentes ao antimicrobiano. Por fim, apenas a cepa controle *S. haemolyticus* 52/978 foi sensível ao cloranfenicol.

4.3 Domínio V do gene rRNA 23S

O sequenciamento do domínio V do gene rRNA 23S (618 pb) revelou a presença da mutação G2576T (segundo o sistema de numeração padrão de *E. coli*) em todas as cepas de SCNs resistentes à linezolida deste estudo, exceto na cepa *S. haemolyticus* 29/312. Nenhuma outra mutação foi identificada no domínio V do gene rRNA 23S dessas cepas. As sequências dos controles sensíveis à linezolida de cada espécie se mostraram selvagens para o domínio V do rRNA 23S ao serem alinhadas com as respectivas sequências das cepas de referência publicadas no GenBank (Tabela 5; Figura 4).

Figura 4. Substituição de G por T na posição 2576 referente aos alelos *rrn* de *E. coli*.

4.4 Proteínas ribossômicas

Todas as cepas de *S. epidermidis* do hospital A, incluindo a cepa controle sensível à linezolida (23/1116), apresentaram a substituição Leu101Val na proteína L3. A única cepa proveniente do hospital B (*S. epidermidis* 24) foi selvagem para essa proteína ribossômica. Entre as cepas de *S. haemolyticus*, apenas a cepa 27/274 apresentou uma alteração na L3, a substituição Val154Leu. Em *S. hominis*, Phe147Ile foi identificada em uma única cepa (35/1228), enquanto a associação de Gly139Arg e Met156Thr, nas outras duas cepas dessa espécie. Ao contrário da cepa controle de *S. epidermidis* (23/1116), as cepas controle de *S. haemolyticus* (52/978) e *S. hominis* (6/831), também sensíveis à linezolida, não apresentaram nenhuma mutação na proteína L3. Todas as cepas de SCNs resistentes ou sensíveis à linezolida, independente da espécie, foram selvagens para as proteínas L4 e L22 (Tabela 5).

4.5 Gene *cfr*

Nenhuma cepa deste estudo foi positiva para o gene *cfr* (Tabela 5). Os iniciadores de Kehrenberg e Schwarz (2006), usados nesta pesquisa para a amplificação desse gene, amplificaram um fragmento de 804 pb – tamanho similar ao do gene *cfr* (746 pb) – em todas as cepas de *S. haemolyticus*. No entanto, o produto de PCR sequenciado mostrou 100% de homologia com uma proteína de função desconhecida de *S. haemolyticus* JCSC 1435 (nº de acesso no GenBank: AP006716.1).

Tabela 5. Características microbiológicas e epidemiológicas das cepas de SCNs

Cepas	UTI	Data da cultura	Amostra clínica	Mutações								Perfil de resistência													
				PFGE	MLST	gene <i>cfr</i>	rRNA 23S	L3	L4	L22	LZD	VAN	OXA	CIP	TEC	STX	AMK	GEN	ERY	AZY	CLI	TET	CHL		
											CIM (µg/ml)														
<i>S. ep</i> 1/734 ^A	sim	Mar-08	Cateter	I	ST2	–	G2576T	Leu101Val	sv	sv	32	<4	>256	R	S	R	R	R	I	S	R	I	R		
<i>S. ep</i> 12/1095 ^A	não	Jul-08	Cateter	I	ST2	–	G2576T	Leu101Val	sv	sv	128	<4	>256	R	S	R	R	R	I	S	R	S	R		
<i>S. ep</i> 11/1031 ^A	não	Ago-08	Crânio	I	ST2	–	G2576T	Leu101Val	sv	sv	128	<4	>256	R	S	R	R	R	I	S	R	I	R		
<i>S. ep</i> 2/734 ^A	não	Nov-08	Cateter	I	ST2	–	G2576T	Leu101Val	sv	sv	128	<4	>256	R	S	R	R	R	I	S	R	I	R		
<i>S. ep</i> 4/1003 ^A	não	Nov-08	Cateter	I	ST2	–	G2576T	Leu101Val	sv	sv	128	<4	>256	R	S	R	R	R	R	R	R	I	R		
<i>S. ep</i> 7/971 ^A	não	Nov-08	Hemocultura	I	ST2	–	G2576T	Leu101Val	sv	sv	128	<4	>256	R	S	R	R	R	I	S	R	I	R		
<i>S. ep</i> 13/694 ^A	sim	Mar-09	Hemocultura	I	ST2	–	G2576T	Leu101Val	sv	sv	128	<4	>256	R	S	R	R	R	R	R	R	I	R		
<i>S. ep</i> 16/419 ^A	sim	Jun-09	Hemocultura	I	ST2	–	G2576T	Leu101Val	sv	sv	64	<4	>256	R	S	R	R	R	R	R	R	S	R		
<i>S. ep</i> 19/532 ^A	sim	Set-09	Hemocultura	III	ST2	–	G2576T	Leu101Val	sv	sv	32	<4	>256	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R		
<i>S. ep</i> 20/661 ^A	sim	Nov-09	Hemocultura	I	ST2	–	G2576T	Leu101Val	sv	sv	16	<4	>256	R	S	R	R	R	R	R	R	S	R		
<i>S. ep</i> 25/228 ^A	sim	Nov-09	Hemocultura	II	ST2	–	G2576T	Leu101Val	sv	sv	64	<4	>256	R	S	R	R	R	R	R	R	S	R		
<i>S. ep</i> 23/1116 ^A	não	Jan-10	Cateter	IV	ST2	–	sv	Leu101Val	sv	sv	1	<4	>256	R	S	R	R	I	R	R	R	S	I		
<i>S. ep</i> 30/315 ^A	sim	Mai-10	Cateter	II	ST2	–	G2576T	Leu101Val	sv	sv	32	<4	>256	R	S	R	R	R	R	R	R	S	R		
<i>S. ep</i> 31/321 ^A	não	Jun-10	cateter	II	ST2	–	G2576T	Leu101Val	sv	sv	64	<4	>256	R	S	R	R	R	S	S	R	S	R		
<i>S. ep</i> 32/330 ^A	sim	Jun-10	hemocultura	II	ST2	–	G2576T	Leu101Val	sv	sv	64	<4	>256	R	S	R	R	R	S	S	I	S	R		
<i>S. ep</i> 36/391 ^A	sim	Set-10	hemocultura	II	ST2	–	G2576T	Leu101Val	sv	sv	64	<4	48	I	S	R	R	R	R	R	R	S	R		
<i>S. ep</i> 24 ^B	sim	Nov-10	hemocultura	II	ST2	–	G2576T	Leu101Val	sv	sv	32	<4	>256	R	S	R	R	R	R	R	R	I	R		
<i>S. ep</i> 39/476 ^A	sim	Jan-11	cateter	II	ST2	–	G2576T	Leu101Val	sv	sv	64	<4	6	I	S	R	R	R	S	S	R	S	R		
<i>S. ep</i> 47/647 ^A	sim	Jul-11	cateter	II	ST2	–	G2576T	Leu101Val	sv	sv	64	<4	0.25	I	S	R	R	R	R	R	R	S	R		
<i>S. ep</i> 48/753 ^A	sim	Jul-11	cateter	II	ST2	–	G2576T	Leu101Val	sv	sv	64	<4	>256	I	S	R	R	R	R	R	R	S	R		
<i>S. ep</i> 45/583 ^A	não	Set-11	hemocultura	II	ST2	–	G2576T	Leu101Val	sv	sv	32	<4	>256	R	S	R	R	R	R	R	R	S	R		
<i>S. haem.</i> 9/1110 ^A	sim	Set-08	cateter	Iha	ND	–	G2576T	sv	sv	sv	64	<4	>256	R	S	R	S	S	R	R	I	S	I		
<i>S. haem.</i> 10/578 ^A	sim	Set-08	hemocultura	Iha	ND	–	G2576T	sv	sv	sv	64	<4	>256	R	S	R	S	S	R	R	I	S	I		

<i>S. haem.</i> 3/193 ^A	sim	Nov-08	hemocultura	Iha	ND	–	G2576T	sv	sv	sv	32	<4	>256	R	S	R	S	S	R	R	I	S	I
<i>S. haem.</i> 5/780 ^A	não	Nov-08	cateter	Iha	ND	–	G2576T	sv	sv	sv	16	<4	>256	R	S	R	S	S	R	R	R	S	I
<i>S. haem.</i> 8/41 ^A	não	Dez-08	cateter	Iha	ND	–	G2576T	sv	sv	sv	32	<4	>256	R	S	R	S	S	R	R	R	S	I
<i>S. haem.</i> 15/903 ^A	sim	Jun-09	cateter	Iha	ND	–	G2576T	sv	sv	sv	32	<4	>256	R	S	R	S	S	R	R	I	S	I
<i>S. haem.</i> 17/504 ^A	não	Ago-09	hemocultura	Iha	ND	–	G2576T	sv	sv	sv	32	<4	>256	R	S	R	S	S	R	R	R	S	R
<i>S. haem.</i> 21/705 ^A	sim	Mar-10	hemocultura	Iha	ND	–	G2576T	sv	sv	sv	32	<4	>256	R	S	R	S	S	R	R	I	S	R
<i>S. haem.</i> 22/987 ^A	sim	Abr-10	hemocultura	Iha	ND	–	G2576T	sv	sv	sv	32	<4	>256	R	S	R	S	S	R	R	I	S	R
<i>S. haem.</i> 26/261 ^A	sim	Mar-10	cateter	Iha	ND	–	G2576T	sv	sv	sv	64	<4	>256	R	S	R	S	S	I	R	I	S	R
<i>S. haem.</i> 27/274 ^A	sim	Abr-10	hemocultura	Iha	ND	–	G2576T	Val154Leu	sv	sv	64	<4	>256	R	S	R	S	S	S	R	I	S	R
<i>S. haem.</i> 29/312 ^A	sim	Mai-10	hemocultura	IIha	ND	–	sv	sv	sv	sv	64	<4	>256	R	S	R	S	R	R	R	R	S	R
<i>S. haem.</i> 49/1162 ^A	não	Mar-11	cateter	Iha	ND	–	G2576T	sv	sv	sv	64	<4	>256	R	S	R	S	R	R	R	R	S	R
<i>S. haem.</i> 44/862 ^A	sim	Ago-11	hemocultura	Iha	ND	–	G2576T	sv	sv	sv	64	<4	>256	R	S	R	S	R	R	R	R	S	R
<i>S. haem.</i> 52/978 ^A	não	Dez-11	hemocultura	IIIha	ND	–	sv	sv	sv	sv	1	<4	>256	R	S	I	S	R	R	R	S	S	S
<i>S. hom.</i> 6/831 ^A	sim	Set-08	hemocultura	IIho	ND	–	sv	sv	sv	sv	1	<4	>256	R	S	S	S	R	R	R	R	S	R
<i>S. hom.</i> 35/1228 ^A	sim	Ago-10	cateter	Iho	ND	–	G2576T	Phe147Ile	sv	sv	32	<4	>256	I	S	R	I	R	R	R	R	S	R
<i>S. hom.</i> 41/1283 ^A	sim	Abr-11	hemocultura	Iho	ND	–	G2576T	Gly139Arg/ Met156Thr	sv	sv	64	<4	>256	R	S	R	R	R	R	R	R	S	R
<i>S. hom.</i> 43/257 ^A	sim	Set-11	cateter	Iho	ND	–	G2576T	Gly139Arg/ Met156Thr	sv	sv	64	<4	>256	I	S	R	R	R	R	R	R	S	R
<i>S. war.</i> 33/1163 ^A	sim	Jul-10	hemocultura	-	ND	–	G2576T	sv	sv	sv	64	<4	>256	R	S	R	R	R	R	R	R	S	R

^A: hospital A; ^B: hospital B; cepas marcadas (com cinza): controles sensíveis à linezolida; UTI: unidade de terapia intensiva; ND: técnica de MLST ainda não desenvolvida para a espécie; sv: selvagem (ausência de mutações nos genes rRNA 23S, *rpIC*, *rpID* ou *rpIV*); LZD: linezolida; VAN: vancomicina; OXA: oxacilina; CIP: ciprofloxacina 5µg; TEC: teicoplanina 30µg; STX: trimethoprim/sulfamethoxazol 1.25/23.75µg; AMK: amikacina 30µg; GEN: gentamicina 10µg; ERY: eritromicina 15µg; AZY 15µg: azitromicina µg; CLI: clindamicina 2µg; TET: tetraciclina 30µg; CHL: cloranfenicol 30µg.

4.6 Reversão ao fenótipo sensível à linezolida

Após a série de 130 passagens em meio sem antimicrobianos, as cepas de SCNs, independente da espécie, permaneceram resistentes à linezolida sem reduções significativas nos níveis de CIM, exceto as cepas *S. epidermidis* 19/532 e *S. haemolyticus* 29/312 que apresentaram um fenótipo sensível, respectivamente, com reduções de duas e seis diluições em relação à CIM inicial de linezolida (Tabela 6)⁴. Para todas as cepas que permaneceram resistentes à linezolida foi possível observar ao longo da série de passagens uma variação de apenas uma diluição em relação à CIM inicial.

Tabela 6. Níveis de CIM de linezolida (µg/ml) das cepas de SCNs ao longo da série de passagens em meio sem antimicrobianos

Cepas	dia 1	dia 7	dia 12	dia 17	dia 21	dia 29	dia 35	dia 37	dia 46	dia 61	dia 83	dia 110	dia 130
<i>S. ep</i> 12/1095	32	16	16	16	16	32	16	32	32	32	16	32	16
<i>S. ep</i> 20/661	16	16	16	16	32	32	16	32	32	32	16	32	16
<i>S. ep</i> 16/419	16	16	16	16	16	32	16	32	32	32	16	32	16
<i>S. ep</i> 19/532	4	2	2	2	2	1	2	2	2	1	1	2	1
<i>S. ep</i> 24	32	16	16	16	16	32	32	32	32	16	16	16	32
<i>S. ep</i> 30/315	32	16	16	16	16	32	32	32	32	16	16	16	16
	dia 1	dia 6	dia 11	dia 15	dia 23	dia 29	dia 31	dia 40	dia 55	dia 77	dia 104	dia 130	
<i>S. haem.</i> 3/193	32	32	32	32	16	16	32	32	32	16	32	16	
<i>S. haem.</i> 5/780	16	16	16	32	16	16	32	32	32	16	32	16	
<i>S. haem.</i> 10/578	32	32	32	32	32	16	32	32	32	32	32	16	
<i>S. haem.</i> 21/705	32	32	32	32	32	32	32	32	32	16	32	16	
	dia 1	dia 7	dia 28	dia 60									
<i>S. haem.</i> 29/312	64	1	1	1									
	dia 1	dia 7	dia 9	dia 18	dia 33	dia 55	dia 82	dia 130					
<i>S. hom.</i> 35/1228	16	32	32	32	32	16	16	16					
<i>S. hom.</i> 41/1283	32	32	64	64	32	32	32	32					
	dia 1	dia 7	dia 9	dia 18	dia 33	dia 55	dia 82	dia 130					
<i>S. war.</i> 33/1163	64	32	64	64	32	32	64	32					

⁴Alguns valores de CIM de linezolida das cepas submetidas à série de passagens diferem dos apresentados na tabela 3 para essas mesmas cepas. Os resultados da tabela 5 foram obtidos a partir das amostras originais (ainda não congeladas no nosso laboratório), enquanto os valores de CIM no dia 1 da série de passagens (Tabela 6) foram obtidos após as amostras terem sido congeladas.

4.7 Relação entre a CIM de linezolida e o número de alelos rRNA 23S mutados

A restrição do domínio V do gene rRNA 23S com a utilização da enzima NheI gerou dois perfis entre as cepas de SCNs deste estudo (Figura 5). Todas as cepas resistentes à linezolida apresentaram o perfil 1, exceto a cepa *S. haemolyticus* 29/312 (CIM de 64 µg/ml) que por ser selvagem para o gene rRNA 23S apresentou o perfil 2, assim como os controles sensíveis à linezolida (CIM de 1 µg/ml) e a cepa *S. epidermidis* 19/532 (CIMs de 4 e 1 µg/ml, respectivamente nos dias 1 e 130 da série de passagens).

Figura 5. Perfis de restrição do domínio V do rRNA 23S das cepas de SCNs gerados por NheI. Coluna 1: perfil 1. Coluna 2: perfil 2. Coluna 3: marcador de peso molecular de 100 pb.

O perfil 1 indica tanto a presença de alelos selvagens como mutados na mesma cepa. Os fragmentos de 430 pb e de 126 pb resultaram do corte feito por NheI no trecho referente à mutação G2576T (entre as posições 2595 e 2600 do alelo *rrlA* de *S. epidermidis* CP000029.1), indicando, portanto, a presença de alelos mutados. O fragmento de 556 pb, por sua vez, indica a presença de alelos selvagens. A banda menor com cerca de 70 pb representa um trecho entre o início da sequência delimitado pelo iniciador *forward* e outro ponto também reconhecido pela enzima NheI no alelo rRNA 23S, sem relação com a mutação G2576T (respectivamente, as posições 2093 e 2165 do alelo *rrlA* de *S. epidermidis* CP000029.1).

O perfil 2 indica ausência de alelos mutados. Por não reconhecer o trecho referente à mutação G2576T, *NheI* clivou apenas o ponto 2165 referente ao alelo *rrlA* de *S. epidermidis* CP000029.1, o que gerou apenas dois fragmentos: a mesma banda menor com cerca de 70 pb do perfil 1 e o fragmento de 556 pb, indicando a presença de alelos selvagens.

Esses resultados mostram que a restrição do domínio V do gene rRNA 23S fornece apenas uma estimativa da presença de alelos com a mutação G2576T. Níveis de CIM de linezolida entre 16-64 µg/ml, independente da espécie e do número de passagens ao qual as cepas foram submetidas, foram associados a um único perfil de restrição (perfil 1). Essa técnica, portanto, não permitiu estabelecer uma associação precisa, caso exista, entre os diferentes níveis de resistência à linezolida e o número de cópias mutadas e, embora tenha definido outro perfil (perfil 2) para o fenótipo sensível (CIM de 1-4 µg/ml), diferenciando do resistente, não detectou proporções menores de alelos mutados, como no caso da cepa *S. epidermidis* 19/532.

Por outro lado, o sequenciamento individual dos alelos *rrlA-F* mostrou a presença da mutação G2576T em 100% das cópias amplificadas (Tabela 7). Níveis de CIM de linezolida entre 16-32 µg/ml, independente da espécie, foram associados à presença de G2576T em todos os alelos amplificados: em 4 de 4 ou em 5 de 5 para as cepas de *S. epidermidis* e em 3 de 3 alelos para a cepa de *S. haemolyticus*. Não foi possível amplificar o alelo *rrlD* de nenhuma das cepas selecionadas para o sequenciamento individual das cópias do rRNA 23S. Ao final da série de passagens, também não foi possível amplificar o alelo *rrlB*, mesmo para as cepas *S. epidermidis* 12/1095 e 24, que haviam apresentado esse alelo mutado no dia 1 da série de passagens. Como todas essas cepas apresentaram o perfil 1 de acordo com a restrição do domínio

V, não é possível afirmar a perda desses alelos não amplificados por PCR ou excluir a possibilidade da presença de outros alelos, além das cópias *rrlA-F*.

A CIM de 4 µg/ml, apresentada pela cepa *S. epidermidis* 19/532, foi associada à presença de G2576T apenas em seu alelo *rrlC*. A redução de 4 para 1 µg/ml ao final do processo não foi decorrente da perda desse alelo mutado ou de sua reversão ao fenótipo selvagem, mas talvez da diminuição da proporção dos alelos mutados em relação aos selvagens, uma vez que os alelos *rrlA* e *rrlE*, não mutados, foram identificados ao final da série de passagens. A técnica de restrição do domínio V, nesse caso, não foi sensível o suficiente para detectar a ocorrência de um único alelo mutado.

Tabela 7. Níveis de CIM de linezolida (µg/ml) e o número de alelos rRNA 23S mutados

Cepas	dia 1	<i>rrlA</i>	<i>rrlB</i>	<i>rrlC</i>	<i>rrlD</i>	<i>rrlE</i>	<i>rrlF</i>	dia 130	<i>rrlA</i>	<i>rrlB</i>	<i>rrlC</i>	<i>rrlD</i>	<i>rrlE</i>	<i>rrlF</i>
<i>S. ep</i> 12/1095	32	X	X	X		X	X	16	X		X		X	X
<i>S. ep</i> 16/419	16	X		X		X	X	16	X		X		X	X
<i>S. ep</i> 24	32	X	X	X		X	X	32	X		X		X	X
<i>S. ep</i> 19/532	4			X				1			X			
<i>S. haem.</i> 3/193	32	X		X		X		16	X		X		X	

X, alelos com a mutação G2576T; quadros em branco, alelos não mutados; quadros em preto, alelos não amplificados.

4.8 Epidemiologia molecular das cepas de SCNs resistentes à linezolida

Figura 6. Perfis de restrição do DNA das cepas de *S. epidermidis* gerados por PFGE. Os STs e o CC obtidos por MLST também são mostrados.

A análise dos perfis de restrição das cepas de *S. epidermidis* resistentes à linezolida gerados por PFGE mostrou a ocorrência de dois clones predominantes no hospital A, o primeiro identificado no período de 2008 a 2009 (clone I) e o segundo entre 2010 e 2011 (clone II). A cepa de *S. epidermidis* proveniente do hospital B, isolada em novembro de 2010, apresentou um perfil de restrição idêntico ao do clone II do hospital A. Os clones I e II apresentaram um coeficiente de similaridade de 60% (com tolerância de 2%) ou de 72% (com tolerância de 3%). De acordo com a análise de MLST, todas as cepas de *S. epidermidis*, incluindo a cepa 19/532 (clone III) e a cepa controle 23/1116 (clone IV), apresentaram o ST-2, pertencente ao complexo clonal 2 (CC2).

Figura 7. Perfis de restrição do DNA das cepas de *S. haemolyticus* gerados por PFGE.

Os perfis de restrição gerados para as cepas de *S. haemolyticus* resistentes à linezolida indicaram a disseminação de um clone predominante (Iha) durante o período de 2008 a 2011. Apenas a cepa 29/2312, selvagem para o rRNA 23S, apresentou um perfil diferente (IIha). A mesma situação foi observada para *S. hominis*, os perfis de restrição (Iho) das três cepas resistentes à linezolida dessa espécie foram indistinguíveis pela técnica de PFGE.

5. Discussão

O uso de linezolida para o tratamento de infecções causadas por SCNs, especialmente em UTIs, aumentou muito nos últimos anos. O desenvolvimento da resistência a essa oxazolidinona tem sido associado principalmente à prévia administração do antimicrobiano, embora alguns casos de infecção ou colonização por SCNs resistentes à linezolida em pacientes que não fizeram uso do fármaco já tenham sido relatados (Potoski et al. 2006; Kelly et al. 2008; Ikeda-Dantsuji et al. 2011).

Linezolida foi aprovada no Brasil em junho de 2000 e introduzida em novembro desse mesmo ano no hospital A para o tratamento de infecções causadas por VRE. Desde então, devido à alta prevalência dessas infecções, essa opção terapêutica vem sendo frequentemente utilizada nessa instituição. Todas as cepas provenientes do hospital A, incluídas neste estudo, foram isoladas de amostras clínicas de pacientes submetidos à terapia com linezolida. O primeiro caso de resistência a esse antimicrobiano nessa instituição ocorreu em março de 2008. A cepa *S. epidermidis* 01/734 (CIM de 32 µg/ml) foi isolada, após um período de 21 dias, da ponta de um cateter de um paciente que recebeu linezolida para o tratamento de uma infecção do trato urinário causada por *E. faecium* resistente à vancomicina (Lincopan et al. 2009). Desde então, clones de *S. epidermidis* resistentes à linezolida (CIM entre 16-128 µg/ml) relacionados geneticamente tem se disseminado em diferentes setores desse hospital, representando 0.04% do total de isolados dessa espécie entre 2008 e 2011. O uso excessivo de linezolida, provavelmente, favoreceu a seleção e a disseminação de um clone endêmico de *S. epidermidis*, no caso, o clone ST-2, portador da mutação G2576T no domínio V do gene rRNA 23S.

A pressão seletiva do antimicrobiano no hospital A foi responsável também por uma disseminação clonal de *S. haemolyticus* (CIM entre 16-128 µg/ml) e de *S. hominis* (CIM entre 32-64 µg/ml) resistentes à linezolida, correspondendo, respectivamente, a 1% e 1.2% do total de isolados dessas espécies entre 2008 e 2011. Apenas uma cepa de *S. warneri* resistente à linezolida (CIM de 64 µg/ml) foi identificada nessa instituição durante esse período.

Ao contrário do que ocorre no hospital A, o uso de linezolida no hospital B é extremamente controlado e restrito a pacientes com infecções associadas a VRE. O uso reduzido do antimicrobiano, no entanto, não impediu uma provável transmissão nosocomial da cepa *S. epidermidis* 24 (ST-2) – isolada de hemocultura de um paciente sem prévia exposição à linezolida. Esse foi o único caso de resistência ao fármaco nesse hospital desde sua introdução no ano de 2005⁵.

⁵ Paciente de 75 anos, sexo masculino, internado por 26 dias na Cirurgia Vascular com diagnóstico de pé diabético, insuficiência renal aguda e hiperpotassemia. Nesse período, utilizou teicoplanina, ciprofloxacina e metronidazol por 14 dias. Recebeu alta e 8 dias depois foi internado novamente com piora da lesão. O exame de hemocultura realizado 4 dias após essa segunda internação identificou a presença de um isolado *S. hominis* sensível à linezolida. O paciente recebeu vancomicina, cefepima e piperacilina/tazobactam por 20 dias. Sem apresentar melhora, ao final desse tratamento foi transferido para a UTI com diagnóstico de sepse e suspeita de endocardite. Os antimicrobianos foram trocados por teicoplanina e meropenem e o paciente teve alta da UTI em 12 dias sendo transferido para a Clínica Médica. Um exame de hemocultura realizado no último dia de internação na UTI revelou a presença de um isolado *S. epidermidis* resistente à linezolida. Na Clínica Médica, foi introduzido fluconazol por 14 dias devido a uma urocultura positiva para *Candida* sp. e o paciente permaneceu com teicoplanina e meropenem por 52 dias, em função de um diagnóstico de abscesso esplênico, drenado por punção guiada durante esse período. Ao final desse tratamento, permaneceu 11 dias sem antimicrobianos. Porém, devido a uma pneumonia, foi novamente introduzido piperacilina/tazobactam e 4 dias depois ocorreu o óbito com diagnóstico de sepse grave, pneumonia nosocomial, abscesso esplênico e úlcera necrótica infectada. Em nenhum momento o paciente fez uso de linezolida.

A presença de múltiplas cópias do gene rRNA 23S no cromossomo de importantes patógenos Gram-positivos foi, no final da década de 90, uma razão de otimismo em relação à atuação da linezolida. Como a aquisição de resistência a essa oxazolidinona requer mutações nessas múltiplas cópias, presentes em estafilococos e enterococos (Klappenbach et al. 2001), a seleção de mutantes resistentes, ao que tudo indica, seria um processo raro. Uma curta experiência clínica ao longo da última década, no entanto, mostrou o contrário.

Cerca da metade dos nucleotídeos envolvidos com a resistência aos antimicrobianos que atuam no PTC localiza-se a distâncias entre 6 a 12 Å do sítio de atuação desses fármacos. Como essas distâncias são consideradas muito longas para uma interação direta com o antimicrobiano, nucleotídeos adicionais podem ser envolvidos para promover alterações na conformação da área de ligação com o fármaco, gerando resistência. Mutações em nucleotídeos muito afastados (>10 Å) alteram menos a conformação do sítio de ligação do antimicrobiano e podem ser compensadas pela alteração de mais de um nucleotídeo. Por outro lado, mutações em nucleotídeos muito próximos do sítio de ligação não são favoráveis, podendo comprometer funções vitais do ribossomo (Davidovich et al. 2008).

Quanto às mutações no gene rRNA 23S que conferem resistência à linezolida, observa-se que a maioria ocorre em nucleotídeos adjacentes aos que se ligam diretamente ao fármaco. Alterações em bases vizinhas de pontos centrais como U2504⁶, por exemplo, nucleotídeo ao qual o anel oxazolidinona se liga, podem conferir resistência devido a um efeito alostérico, provavelmente por perturbação do posicionamento desse nucleotídeo central (Wilson et al. 2008). Já alterações nas bases

⁶ U2504 é um nucleotídeo central no PTC. Localizado no sítio A, também está envolvido com a ligação a fenicóis, lincosamidas e pleuromutilinas. Mutações nesta posição já foram identificadas em patógenos veterinários resistentes a pleuromutilinas (Pringle et al. 2004) e em *H. halobium* resistente à linezolida (Kloss et al. 1999).

que se ligam diretamente à linezolida, como U2504, eram consideradas improváveis, pois poderiam causar sérios danos à bactéria (Davidovich et al. 2008).

Ao contrário do que se pensava, níveis elevados de CIM de linezolida (1024 µg/ml) já foram associados à presença de T2504A em quatro dos seis alelos rRNA 23S de isolados clínicos *S. epidermidis* resistentes à linezolida (Liakopoulos et al. 2010) e, em outro estudo, em cinco dos seis alelos de um isolado clínico da mesma espécie (CIM de 256 µg/ml) (Liakopoulos et al. 2009). Nos dois casos, os isolados foram *cfr*-negativos e selvagens para a proteína L4. Alterações nas proteínas L3 e L22, não investigadas, talvez explicassem o fato de os isolados com menor número de alelos mutados terem apresentado níveis mais elevados de CIM. No entanto, esses dados levantam uma questão. Os altos níveis de CIM de linezolida seriam decorrentes da substituição de uma base central do PTC (U2504) que se liga diretamente à linezolida e/ou consequência da presença de múltiplos alelos portadores desse nucleotídeo mutado?

Considerando ainda os dados da pesquisa de Liakopoulos et al. (2010), níveis mais baixos de CIM de linezolida (8 µg/ml) foram associados à presença de outra mutação (C2534T) em apenas dois dos seis alelos rRNA 23S de isolados clínicos *S. epidermidis* resistentes à linezolida. Alguns anos antes, CIMs entre 16-32 µg/ml foram apresentadas por isolados clínicos da mesma espécie portadores de C2534T em dois dos cinco alelos rRNA 23S (Zhu et al. 2007). Nesses casos, níveis mais baixos de CIM de linezolida foram associados a uma mutação em um nucleotídeo que não se liga diretamente ao fármaco e, também, a um número menor de alelos mutados. Logo, esses dados mostram o outro lado da mesma questão. Os níveis mais baixos de CIM de linezolida seriam decorrentes da substituição de uma base mais afastada do sítio de ligação da linezolida ou de um menor número de alelos mutados? Poderia um aumento

do número de alelos com C2534T aumentar os níveis de CIM compensando essa distância?

Além de C2534, outros dois pontos que constituem a segunda camada⁷ de nucleotídeos que definem a área de ligação da linezolida tem se mostrado propensos a alterações, gerando resistência: U2500 e G2447. Essas bases interagem diretamente com U2504 no PTC e estão localizadas, respectivamente, a 7.2 Å e 6.2 Å do sítio de ligação com o fármaco (Wilson et al. 2008).

Uma clara associação entre os níveis de CIM de linezolida e o número de alelos com uma substituição na posição U2500⁸ (T2500A) foi observada por Meka et al. (2004) em isolados clínicos *S. aureus*, embora os demais mecanismos de resistência não tenham sido investigados. O fenótipo resistente foi associado à presença de T2500A em dois de cinco ou seis alelos (CIM de 8 µg/ml) e em dois de cinco ou três de seis alelos (CIM de 16 µg/ml), enquanto o fenótipo sensível (CIM de 4 µg/ml) foi apresentado por um isolado sem T2500A ou qualquer mutação no domínio V de suas seis cópias do rRNA 23S, sete meses após o término do tratamento com linezolida. No caso de mutantes da cepa MSSA 29213 selecionados *in vitro* com concentrações crescentes de linezolida, a presença de T2500A em dois de seis alelos também gerou o fenótipo resistente (CIM de 8 µg/ml), mas a CIM de 4 µg/ml (fenótipo supostamente sensível) foi associada à presença de T2500A em um dos seis alelos (Locke et al. 2009a). Neste caso, as proteínas L3, L4 e L22 foram analisadas e para esses mutantes se apresentaram selvagens.

⁷ A segunda camada é definida pelas bases que se ligam aos nucleotídeos que estabelecem ligações diretamente com a linezolida (pertencentes à primeira camada). Em geral, as bases da segunda camada estão a uma distância de 3Å das bases da primeira camada e cerca de 6-8Å do sítio de ligação da linezolida.

⁸ U2500, ao lado de A2453, forma uma barreira evitando que o nucleotídeo central U2504 se “incline” em outra direção no PTC. Logo, mutações nesses pontos poderiam “relaxar” essa barreira e permitir o deslocamento de U2504, impedindo a ligação da linezolida (Davidovich et al. 2008).

Uma relação direta entre os níveis de CIM de linezolida e o número de alelos portadores de G2447T também pode estar ocorrendo. CIMs de 4, 8, 16 e 32 µg/ml foram associadas, respectivamente, à presença de G2447T em um de seis, dois de seis, dois de cinco⁹ e três de cinco¹⁰ alelos rRNA 23S de mutantes da cepa MSSA 29213 (Locke et al. 2009a). De acordo com essa progressão, uma CIM de 64 µg/ml foi associada a 100% dos alelos mutados em um isolado clínico *S. epidermidis* (Zhu et al. 2006). Retomando os dados do estudo *in vitro* de Locke et al. (2009a), um maior nível de resistência à linezolida (CIM de 128 µg/ml) envolvendo G2447T foi associado a três ou quatro alelos mutados¹¹, porém esses mutantes também tinham uma substituição na proteína L3 (Gly152Asp).

Uma relação mais clara, talvez devido a um número maior de relatos, tem sido observada entre os níveis de CIM de linezolida e o número de alelos portadores de G2576T, a única mutação identificada no domínio V do gene rRNA 23S das cepas de SCNs desse estudo. A base G2576 também está situada na segunda camada de nucleotídeos que definem a área de ligação da linezolida (a 7.9 Å do sítio de ligação) e se liga diretamente à G2505 que, por sua vez, liga-se à acetamida NH da linezolida (Wilson et al. 2008).

Assim como observado para as demais mutações em nucleotídeos que constituem a segunda camada da área de ligação da linezolida, a presença de G2576T em mais de 50% do total do número de alelos rRNA 23S está associada a níveis de CIM de linezolida acima de 16 µg/ml, exceto em alguns casos em que a presença de apenas um ou dois alelos mutados (em cinco) determinaram CIMs de 16-32 µg/ml tanto em *S. aureus* como em *S. epidermidis* (Zhu et al. 2007; Ikeda-Dantsuji et al. 2011; Endimiani

⁹ A cópia *rrm6* não foi detectada por PCR nessa etapa do processo *in vitro* de seleção da resistência, portanto o número total de alelos rRNA 23S foi igual a cinco.

¹⁰ *idem*

¹¹ *idem*

et al. 2011). Da mesma forma, CIMs de 4-8 µg/ml estão sendo associadas a menos de 50% das cópias rRNA 23S mutadas.

Com base nos níveis de resistência à linezolida detectados, portanto, é possível estimar o número de cópias rRNA 23S mutadas, mas a relação entre os níveis de CIM determinados como *breakpoint* para a linezolida em estafilococos (S, ≤4 µg/ml; R, ≥8 µg/ml) e o número de alelos mutados permanece indefinida.

Dados referentes a isolados clínicos com CIM de 4 µg/ml são escassos. O único relato existente, salvo engano, foi apresentado por Meka et al. (2004) ao investigar a ocorrência de T2500A em isolados MRSA obtidos de hemoculturas de um paciente submetido a um longo período de exposição à linezolida. Ao apresentar a CIM de 4 µg/ml, o isolado não tinha mais T2500A em nenhuma cópia do rRNA 23S, ao contrário dos isolados resistentes que apresentaram essa mutação em pelo menos dois alelos (CIM de 8-16 µg/ml). Já no estudo *in vitro* de Locke et al. (2009a), a CIM de 4 µg/ml foi associada à presença de T2500A ou G2447T em um dos seis alelos rRNA 23S da cepa MSSA 29231, submetida a um processo de seleção com linezolida.

Apesar do crescente número de relatos envolvendo G2576T, os dados disponíveis até o momento ainda são insuficientes para definir uma relação precisa entre os níveis de CIM de 4-8 µg/ml e o número de alelos rRNA 23S com a mutação G2576T. Em um processo de seleção *in vitro* com linezolida (Locke et al. 2009a), a CIM de 4 µg/ml foi observada em mutantes da cepa MRSA 33591 portadores de G2576T em um ou dois dos seis alelos rRNA 23S, enquanto em isolados clínicos *S. aureus* a presença de apenas uma cópia com G2576T (em cinco alelos) ou não foi suficiente para conferir o fenótipo resistente (CIM de 2 µg/ml) (Meka et al. 2004; Tsakris et al. 2007) ou foi associada a CIMs de 8 e 16 µg/ml (Ikeda-Dantsuji et al. 2011; Endimiani et al. 2011). Ainda em isolados clínicos *S. aureus*, duas cópias com G2576T

(em cinco ou seis alelos) foram associadas à CIM de 8 µg/ml (Wilson et al. 2003; Meka et al. 2004; Zhu et al. 2006) e, em quatro ou cinco alelos, à CIM de 16 µg/ml (Hill et al. 2010; Zhu et al. 2007; Ikeda-Dantsuji et al. 2011).

A CIM de linezolida de 4 µg/ml apresentada pela cepa *S. epidermidis* 19/532 deste estudo, ao que parece, foi decorrente da presença de G2576T em apenas um de seus alelos, assim como observado para a cepa MRSA do estudo *in vitro* com linezolida de Locke et al. (2009). A restrição do domínio V não diferenciou o fenótipo sensível da cepa *S. epidermidis* 19/532 (CIM de 4 µg/ml) do fenótipo das cepas controle, também sensíveis à linezolida e selvagens para o rRNA 23S (CIM de 1 µg/ml). Da mesma forma, métodos convencionais de determinação da resistência a antimicrobianos classificam um isolado portador de um único alelo rRNA 23S mutado como sensível à linezolida. Com que frequência e em quais condições esse isolado poderia se tornar resistente, caso fosse exposto novamente ao antimicrobiano, são questões que permanecem em aberto.

Os dados disponíveis até o momento ainda são insuficientes para definir uma relação satisfatória entre os níveis de CIM de linezolida (especialmente entre 4-8 µg/ml), a posição dos nucleotídeos propensos a alterações no domínio V do gene rRNA 23S e o número de alelos portadores desses nucleotídeos mutados. A ausência de dados referentes aos demais mecanismos de resistência à linezolida na maioria dos estudos torna essas relações ainda mais imprecisas.

Ainda com relação ao número de alelos rRNA 23S mutados, nossos resultados mostraram que a presença de G2576T em 100% das cópias amplificadas não implica necessariamente em níveis extremos de resistência (>256 µg/ml) em estafilococos coagulase-negativos.

A presença de G2576T em 100% dos alelos rRNA 23S já foi relacionada a níveis de CIM de linezolida >256 µg/ml em isolados *S. epidermidis*, porém associada à presença de outra mutação no domínio V (G2215A), substituições na proteína L3 e uma inserção na proteína L4 (Kosowska-Shick et al. 2010). Esse mesmo estudo também relatou alguns isolados *S. epidermidis* com 100% das cópias mutadas (apenas G2576T)¹² e níveis de CIM de linezolida (32-64 µg/ml) próximos aos apresentados aqui pelos isolados da mesma espécie (16-64 µg/ml), o que poderia colocar em dúvida o envolvimento de F147I na proteína L3, presente nesses isolados do estudo de Kosowska-Shick et al. (2010). Por outro lado, um isolado *S. epidermidis* com CIM de 64 µg/ml apresentou G2576T em apenas 50% dos seus alelos rRNA 23S (Kosowska-Shick et al. 2010), o que coloca em questão a necessidade ou a vantagem de as nossas cepas de *S. epidermidis* manterem 100% de seus alelos mutados ao exibirem CIMs de linezolida entre 16-64 µg/ml.

Quanto a *S. haemolyticus*, nossos dados (CIMs de 16-64 µg/ml com 100% das cópias amplificadas mutadas) estão próximos ao do único relato feito até o momento para essa espécie sobre a relação entre os níveis de resistência à linezolida e o número de alelos rRNA 23S mutados. Em um surto recentemente descrito em uma UTI na Itália, G2576T também foi identificada em 100% dos alelos rRNA 23S (número total de cópias não mencionado) de isolados *S. haemolyticus* resistentes à linezolida (CIM de 32 µg/ml), *cfr*-negativos e selvagens para as proteínas L3 e L4 (Mazzariol et al. 2012).

Os níveis de CIM de linezolida entre 32-64 µg/ml apresentados pelas cepas de *S. hominis* deste estudo – provavelmente associados ao mesmo número de alelos mutados das cepas de *S. epidermidis* e *S. haemolyticus* – colocam em questão o envolvimento das substituições identificadas na proteína L3 dessas cepas (discutido a seguir). Relatos

¹² Ao afirmar 100% das cópias mutadas, os autores consideraram o total do número de alelos igual a cinco, com base no estudo de Zhu et al. 2007. O número de alelos mutados foi determinado por restrição com NheI.

de isolados *S. hominis* resistentes à linezolida são raros e tais estudos não investigaram a relação entre a CIM de linezolida e o número de alelos mutados (Sorlozano et al. 2010; Gopegui et al. 2011; Teodoro et al. 2011).

Além da presença de G2576T em 100% dos alelos rRNA 23S amplificados, nossos resultados mostraram uma forte estabilidade dessa mutação nas múltiplas cópias desse operon das cepas de SCNs provenientes dos dois hospitais – ao contrário do que já foi relatado para *S. aureus* nos poucos estudos realizados sobre a persistência dos alelos rRNA 23S mutados (Meka et al. 2004; Tsakris et al. 2007). Embora a cepa *S. epidermidis* 19/532 tenha apresentado uma redução da CIM de linezolida de 4 para 2 µg/ml em apenas sete dias da série de passagens em meio sem linezolida e, subsequentemente, outra redução de 2 para 1 µg/ml, seu alelo *rrlC* permaneceu mutado ao longo de todo o processo (130 dias de passagens). A diminuição do nível de resistência da cepa *S. epidermidis* 19/532 poderia ser explicada pelo aumento do número de alelos rRNA 23S selvagens em relação aos mutados ao final do processo de reversão ao fenótipo sensível.

Uma população homogênea de ribossomos mutantes na célula já foi proposto em algumas situações para explicar o aumento do nível de resistência. Para *H. halobium*, por exemplo, a mutação T2500C em sua única cópia do gene rRNA 23S implicaria em níveis elevados de CIM de linezolida (> 64 µg/ml) (Kloss et al. 1999). Da mesma forma, Meka et al. (2004) sugerem que a ausência da cópia *rrn6* em seu isolado MRSA poderia ter aumentado a proporção de ribossomos mutantes em relação aos selvagens, promovendo um aumento da resistência.

Para *S. epidermidis*, o único relato até o momento de uma reversão ao fenótipo sensível à linezolida não envolveu a base G2576 e sim o nucleotídeo central ao qual o anel oxazolidinona se liga (U2504). Neste caso, a CIM de linezolida de um isolado *S.*

epidermidis com T2504A em cinco de seus seis alelos diminuiu de 256 para 8 µg/ml, com apenas um alelo mutado, após uma série de 38 passagens em meio sem antimicrobianos (Liakopoulos et al. 2009). Já para *S. haemolyticus*, a persistência da mutação G2576T foi recentemente comunicada por Mazzariol et al. (2012), mesmo após terem submetido uma cepa resistente (CIM de 32 µg/ml) a uma série de apenas 30 passagens em meio sem linezolida.

Embora os primeiros estudos sobre o sítio de ligação e a forma de atuação das oxazolidinonas tenham considerado o rRNA como elemento central (Swaney et al. 1998; Kloss et al. 1999; Sander et al. 2002), o envolvimento das proteínas ribossômicas nunca foi excluído. No entanto, mutações nos genes *rplC*, *rplD* e *rplV* que possam levar, respectivamente, a alterações nas proteínas L3, L4 e L22 promovendo resistência à linezolida, ainda estão sendo apontadas com muito cuidado.

Uma das razões que dificultam definir o envolvimento de mutações nas proteínas ribossômicas com a resistência à linezolida é o fato de que algumas substituições, inserções ou deleções nessas proteínas de isolados resistentes também são observadas em isolados sensíveis, sugerindo que tais modificações sejam marcadores clonais de determinadas populações dentro da espécie e não mutações envolvidas com a resistência à linezolida. É o caso da substituição Leu101Val na proteína L3, identificada em todas as cepas de *S. epidermidis* provenientes do hospital A, incluindo a cepa sensível à linezolida usada como controle comparativo. Essa mesma situação também foi observada por Mendes et al. (2010) em *S. epidermidis* resistentes à linezolida (CIM de 4-8 µg/ml) isolados de amostras de sangue de diferentes pacientes internados em um hospital na Itália entre 2006 e 2008, a cepa usada como controle sensível (CIM de 1 µg/ml) também tinha a substituição Leu101Val, como as cepas resistentes. Mendes et

al. (2010) também identificaram outra mutação nas cepas resistentes, a Asn158Ser na proteína L4, nesse caso, ausente na cepa controle sensível, mas devido ao relato de sua ocorrência em outra cepa *S. epidermidis* sensível (Wong et al. 2010), os autores questionaram se alterações no resíduo Asn158 poderiam, de fato, conferir resistência à linezolida.

Outro fator que limita determinar se, e o quanto, a presença de mutações nas proteínas ribossômicas alteram os níveis de CIM de linezolida é a frequência com que elas ocorrem simultaneamente com mutações no gene rRNA 23S de isolados clínicos resistentes, como por exemplo as substituições K68N e L108S na proteína L4, identificadas em isolados *S. epidermidis* (CIM > 4 µg/ml) que também tinham, respectivamente, as mutações G2576T e C2534T no rRNA 23S (Wong et al. 2010).

Têm recebido maior crédito na determinação da resistência à linezolida mutações que se situam em locais próximos ao sítio de ligação do fármaco (PTC), como a substituição Ala157Arg, que ocorre dentro de uma extensão central da proteína L3 que se projeta em direção ao PTC ou mutações em resíduos não tão próximos, mas que ocorrem em isolados resistentes à linezolida selvagens para o gene rRNA 23S, como é o caso da deleção de uma serina na posição 145 da proteína L3 (Δ Ser145) (Locke et al. 2009b). Embora Ala157 não seja um resíduo conservado, ele está localizado bem próximo a bases críticas do PTC (7 Å), incluindo G2505 e U2506 que estão envolvidas com a ligação à linezolida. Perturbações nessa posição poderiam afetar a sensibilidade ao antimicrobiano (Davidovich et al. 2008; Wilson et al. 2008). Ao contrário da Ala157, a Ser145 não interage diretamente com as bases que delimitam o PTC (> 25 Å), o que torna difícil definir seu envolvimento com a resistência à linezolida, mas como Δ Ser145 já foi observada em um isolado clínico *S. aureus* resistente ao fármaco (CIM de 8

µg/ml) selvagem para o rRNA 23S e *cfr*-negativo (Locke et al. 2009b), pode ser considerada responsável pelo fenótipo resistente.

Assim como Δ Ser145, as mutações identificadas na proteína L3 das cepas de *S. hominis* deste estudo não ocorreram em bases muito próximas do sítio de ligação da linezolida, mas, provavelmente, têm algum envolvimento na determinação do fenótipo resistente, uma vez que não foram encontradas na cepa sensível usada como controle e, além disso, já foram descritas em isolados *S. aureus* e *S. epidermidis* resistentes à linezolida (Kosowska-Shick et al. 2010; Endimiani et al. 2011).

Apesar da distância do sítio de ligação com o fármaco (22.4 Å), a substituição Phe147Ile, identificada na cepa *S. hominis* 35/1228, está próxima de um local propenso a mutações na proteína L3. Diferentes modificações no aminoácido adjacente (19.3 Å) já foram associadas com a resistência à linezolida: Δ His146 em mutantes *S. aureus* (CIM de 4-8 µg/ml) originados *in vitro* com TR700, selvagens para o rRNA 23S e proteína L4 (Locke et al. 2009 TR700); His146Tyr em um isolado clínico *S. aureus* (CIM de 32 µg/ml), com Δ Ser145 na L3, *cfr*-positivo e selvagem para o rRNA 23S (Locke et al. 2010c); His146Arg em isolados clínicos *S. epidermidis* (CIM > 256 µg/ml) com Met156Thr na L3, Ins70G na L4 e G2576T/ G2215A no rRNA 23S e, por fim, His146Gln em isolados clínicos *S. epidermidis* (CIM de 32-64 µg/ml) com Val154Leu/ Ala157Arg na L3, Ins70G/ Asn158Ser na L4 e selvagens para o rRNA 23S (Kosowska-Shick et al. 2010).

O nível de resistência à linezolida da cepa *S. hominis* 35/1228 (CIM de 32 µg/ml) foi similar ao relatado por Kosowska-Shick et al. (2010) para dois isolados clínicos *S. epidermidis* (CIM de 32-64 µg/ml). Nesses isolados, selvagens para a proteína L4 e *cfr*-negativos, Phe147Ile também foi identificada simultaneamente com G2576T em 100% das cópias do rRNA 23S. Esta posição parece ser propensa a

alterações, pois outra substituição (Phe147Leu) também já foi identificada em isolados clínicos *S. epidermidis* com sensibilidade reduzida à linezolida (CIM de 4-8 µg/ml), porém ao lado de Ala157Arg na L3 e Asn158Ser na L4, esses isolados foram selvagens para o rRNA 23S e proteína L22 (Mendes et al. 2010).

As substituições Gly139Arg e Met156Thr, identificadas simultaneamente nas outras três cepas de *S. hominis* deste estudo (CIM de 64 µg/ml), também não ocorreram em bases muito próximas do sítio de ligação da linezolida, >25 Å e 15.2 Å, respectivamente, mas já foram descritas em isolados de outras espécies resistentes ao fármaco: Gly139Arg em um isolado clínico *S. aureus cfr*-negativo (CIM > 256 µg/ml) com G2576T no rRNA 23S e selvagem para L4 e L22 (Endimiani et al. 2011); Met156Thr em isolados clínicos *S. epidermidis cfr*-negativos (CIM > 256 µg/ml) com G2576U/G2215A no rRNA23S, His146Arg na L3 e Ins70G na L4 (Kosowska-Shick et al. 2010).

A associação de Gly139Arg e Met156Thr na L3 ainda não foi relatada e, mesmo com G2576T presente em múltiplas cópias dos alelos rRNA 23S, não determinou níveis tão altos de resistência nas cepas de *S. hominis* analisadas aqui. Mutações adicionais tanto no gene rRNA 23S como nas proteínas L3 e L4, além de Met156Thr, provavelmente, foram responsáveis pelos altos níveis de CIM de linezolida observados nos isolados *S. epidermidis* do estudo de Kosowska-Shick et al. 2010. Por outro lado, a presença de uma única mutação na L3, no caso, Gly139Arg, foi suficiente para promover níveis mais altos de CIM de linezolida em *S. aureus* (Endimiani et al. 2011) do que a associação dessa substituição com Met156Thr nas cepas de *S. hominis* deste estudo.

Aminoácidos adjacentes a Met156 na L3 já foram relacionados com a resistência à linezolida. É o caso da substituição Gly155Arg (15.5 Å), identificada em mutantes *S.*

aureus (CIM de 4-8 µg/ml) originados *in vitro*, selvagens para o rRNA 23S e L4 (Locke et al. 2009 TR700) e o da substituição Ala157Arg (7.0 A°), identificada em: *S. epidermidis* (CIM de 256 µg/ml) com G2447T presente em 5 cópias do rRNA 23S (Locke et al. 2009b); *S. epidermidis cfr*-negativos (CIM de 4-8 µg/ml) selvagens para o rRNA 23S e L22 (Mendes et al. 2010) e em *S. epidermidis cfr*-negativos (CIM de 32-64 µg/ml), selvagens para o rRNA 23S, com His146Gln e Val154Leu na L3 e com Ins70G e Asn158Ser na L4 (Kosowska-Shick et al. 2010).

A mutação Val154Leu, identificada em apenas uma cepa de *S. haemolyticus* (27/274) deste estudo também portadora de G2576T no rRNA 23S (CIM de 64 µg/ml), ocorreu a uma distância de 22.1 A° do sítio de ligação da linezolida. Val154Leu já foi descrita em um clone de *S. epidermidis* representado por dois isolados resistentes à linezolida com CIMs de 32 e 64 µg/ml (Kosowska-Shick et al. 2010). No caso desses isolados *S. epidermidis cfr*-negativos e selvagens para o rRNA 23S, a mutação Val154Leu foi encontrada simultaneamente com as alterações Leu101Val, His146Gln e Ala157Arg na L3 e Ins70G e Asn158Ser na L4.

Pouco se sabe sobre a resistência à linezolida mediada por mutações nas proteínas ribossômicas em SCNs. De acordo com uma recente revisão de literatura (Gu et al. 2012), um número significativo de estudos que relatam a ocorrência de resistência à linezolida não investigam tais proteínas. Esta pesquisa mostrou que somente 29.2% dos SCNs resistentes à linezolida foram testados para L3 e L4. Algumas mutações na L3 já foram associadas com a resistência à linezolida em *S. aureus*, *S. cohnii* e *S. epidermidis* (Long & Vester 2011), no entanto, os poucos relatos de isolados *S. hominis* resistentes à linezolida feitos até o momento (Sorlozano et al. 2010; Gopegui et al. 2011) mencionaram somente G2576T no rRNA 23S como causa da resistência, as proteínas L3, L4 e L22 não foram investigadas.

A compreensão da epidemiologia molecular de SCNs resistentes à linezolida permanece desconhecida. No caso de *S. epidermidis*, alguns estudos já mostraram que clones como o ST-2, amplamente disseminados em hospitais de diferentes países, podem apresentar diferentes mutações no domínio V do gene rRNA 23S. Exposições cada vez mais frequentes à linezolida com consequente pressão seletiva estariam promovendo a emergência desse clone.

Ao contrário do que tem ocorrido em *S. aureus*, a resistência à linezolida em *S. epidermidis* está distribuída em diferentes subgrupos, pertencentes a um único complexo clonal (CC) predominante. Embora um recente aperfeiçoamento na técnica de MLST (Thomas et al. 2007) tenha mostrado maior diversidade de STs para *S. epidermidis*, a maioria dos isolados resistentes à linezolida dessa espécie ainda é relacionada a um único complexo clonal, o CC2.

Entre os STs pertencentes ao CC2, o ST-2, identificado nas cepas de *S. epidermidis* deste estudo, vem sendo descrito com muita frequência entre isolados *S. epidermidis* resistentes à linezolida. Em 2010, Liakopoulos et al. identificaram o ST-2 em uma disseminação clonal de isolados *S. epidermidis* resistentes à linezolida em quatro hospitais na Grécia. Nos Estados Unidos, dos oito STs pertencentes ao CC2 encontrados por Wong et al. (2010) (ST-2, ST-5, ST-6, ST-22, ST-23, ST-87, ST-185 e ST-186), em um estudo de epidemiologia molecular de infecções estafilocócicas causadas por cepas resistentes à linezolida (2004 a 2007), o ST-2 correspondeu a 45% dos isolados. Embora esses dados demonstrem que a resistência à linezolida em *S. epidermidis* está restrita a apenas um CC, não se pode excluir a possibilidade desses STs serem incluídos em outros CCs com o aumento do número de registros no banco de dados www.mlst.net. Limitações na técnica de MLST para *S. epidermidis* podem ainda não discriminar clones com ancestrais distintos.

6. Conclusões

- A mutação G2576T no domínio V do gene rRNA 23S provavelmente foi o mecanismo determinante da resistência à linezolida nas cepas de SCNs deste estudo. As alterações identificadas na proteína L3 podem estar envolvidas com o desenvolvimento do fenótipo resistente de algumas cepas, porém, mesmo em associação com G2576T, não promoveram aumentos significativos nas CIMs de linezolida. Apenas uma cepa de *S. haemolyticus* (CIM de 64 µg/ml; *cfr*-negativa, selvagem para o rRNA 23S e proteínas ribossômicas L3, L4 e L22) permaneceu com o mecanismo de resistência não definido.
- O fenótipo resistente à linezolida mediado pela mutação G2576T no domínio V do gene rRNA 23S foi estável para todas as cepas de SCNs (CIMs de 16-64 µg/ml) submetidas à série de passagens em meio sem antimicrobianos. A persistência de G2576T foi observada mesmo no caso de uma cepa de *S. epidermidis* sensível à linezolida, a qual manteve seu único alelo mutado ao longo da série de passagens, com uma redução da CIM de 4 para 1 µg/ml. A reversão à sensibilidade foi observada apenas para a cepa de *S. haemolyticus* que permaneceu com o mecanismo de resistência à linezolida indefinido.

- Níveis de CIM de linezolida entre 16-32 µg/ml, independente da espécie de SCN, foram associados à presença de G2576T em todos os alelos rRNA 23S amplificados (4/4 e 5/5 em cepas de *S. epidermidis* e 3/3 em cepas de *S. haemolyticus*), enquanto níveis de CIM entre 1-4 µg/ml foram associados à presença de G2576T em apenas uma cópia rRNA 23S. De acordo com a restrição do domínio V, níveis de CIM de linezolida entre 16-64 µg/ml foram associados à ocorrência de alelos selvagens e mutados na mesma cepa e níveis de CIM entre 1-4 µg/ml, decorrentes da presença de alelos selvagens ou de uma única cópia mutada não foram diferenciados.
- A resistência à linezolida nas cepas de *S. epidermidis* deste estudo está circunscrita a um único complexo clonal (CC2), representada pelo clone ST-2. Exposições frequentes ao antimicrobiano, no hospital A, provavelmente favoreceram a seleção e a disseminação de clones endêmicos de SCNs desde 2008. Por outro lado, a ocorrência de um caso isolado de resistência à linezolida no hospital B, sem associação com a administração do fármaco, pode ser decorrente de uma transmissão nosocomial e reforça a predominância do clone ST-2 em ambientes hospitalares.

7. Referências bibliográficas

- Adrian, P.V. et al. 2000. Evernimicin (SCH27899) inhibits a novel ribosome target site: analysis of 23S ribosomal DNA mutants. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 44(11), pp.3101–6. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=101610&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
- de Almeida, L.M. et al. 2012a. Clonal dissemination of linezolid-resistant *Staphylococcus haemolyticus* exhibiting the G2576T mutation in the 23S rRNA gene in a tertiary care hospital in Brazil. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 56(5), pp.2792–3. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3346601&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> [Accessed November 3, 2012].
- de Almeida, L.M. et al. 2012b. Dissemination of the linezolid-resistant *Staphylococcus epidermidis* clone ST2 exhibiting the G2576T mutation in the 23S rRNA gene in a tertiary-care hospital, Brazil. *The Journal of antimicrobial chemotherapy*, 67(3), pp.768–9. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22186879> [Accessed November 3, 2012].
- Diekema, D.J & Jones, R.N. 2001. Oxazolidinone antibiotics. *The Lancet*, 358, pp.1975-82.
- Arias, C. a et al. 2008. Clinical and microbiological aspects of linezolid resistance mediated by the cfr gene encoding a 23S rRNA methyltransferase. *Journal of clinical microbiology*, 46(3), pp.892–6. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2268374&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> [Accessed November 10, 2012].
- Arias, C. a., 2002. Multicentre surveillance of antimicrobial resistance in enterococci and staphylococci from Colombian hospitals, 2001-2002. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 51(1), pp.59–68. Available at: <http://www.jac.oupjournals.org/cgi/doi/10.1093/jac/dkg002> [Accessed November 10, 2012].
- d' Azevedo, P. a et al. 2008. Outbreak of *Staphylococcus hominis* subsp. novobiosepticus bloodstream infections in São Paulo city, Brazil. *Journal of medical microbiology*, 57(Pt 2), pp.256–7. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18201999> [Accessed November 10, 2012].
- Condon, N. et al. 1995. rRNA operon multiplicity in *Escherichia coli* and the physiological implications of rrn inactivation . These include : rRNA Operon Multiplicity in *Escherichia coli* and the Physiological Implications of rrn Inactivation. , 177(14).
- Costerton, J.W., 1999. Bacterial Biofilms: A Common Cause of Persistent Infections. *Science*, 284(5418), pp.1318–1322. Available at:

<http://www.sciencemag.org/cgi/doi/10.1126/science.284.5418.1318> [Accessed November 5, 2012].

- Davidovich, C., Bashan, A. & Yonath, A., 2008. Structural basis for cross-resistance to ribosomal PTC antibiotics. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 105(52), pp.20665–70. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2605634&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
- Endimiani, A. et al. 2011. Emergence of linezolid-resistant *Staphylococcus aureus* after prolonged treatment of cystic fibrosis patients in Cleveland, Ohio. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 55(4), pp.1684–92. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3067150&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> [Accessed October 22, 2012].
- Farrell, D.J. et al. 2011. LEADER Program results for 2009: an activity and spectrum analysis of linezolid using 6,414 clinical isolates from 56 medical centers in the United States. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 55(8), pp.3684–90. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3147616&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> [Accessed October 31, 2012].
- Farrell, D.J. et al. 2009. Linezolid surveillance program results for 2008 (LEADER Program for 2008). *Diagnostic microbiology and infectious disease*, 65(4), pp.392–403. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19913682> [Accessed August 2, 2012].
- Gales, A.C. et al. 2009. Antimicrobial susceptibility of gram-positive bacteria isolated in Brazilian hospitals participating in the SENTRY Program (2005-2008). *The Brazilian journal of infectious diseases : an official publication of the Brazilian Society of Infectious Diseases*, 13(2), pp.90–8. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20140350>.
- Gales, A.C. et al. 2006. Emergence of linezolid-resistant *Staphylococcus aureus* during treatment of pulmonary infection in a patient with cystic fibrosis. *International journal of antimicrobial agents*, 27(4), pp.300–2. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16527459> [Accessed November 3, 2012].
- Gregory, S.T. & Dahlberg, a E., 1999. Erythromycin resistance mutations in ribosomal proteins L22 and L4 perturb the higher order structure of 23 S ribosomal RNA. *Journal of molecular biology*, 289(4), pp.827–34. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10369764>.
- Hill, R.L.R. et al. 2010. Linezolid-resistant ST36 methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* associated with prolonged linezolid treatment in two paediatric cystic fibrosis patients. *The Journal of antimicrobial chemotherapy*, 65(3), pp.442–5. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20089543> [Accessed October 31, 2012].

- Hirota, S. et al. 2011. Rapid and accurate identification of human-associated staphylococci by use of multiplex PCR. *Journal of clinical microbiology*, 49(10), pp.3627–31. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3187289&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> [Accessed November 2, 2012].
- Ikedo-Dantsuji, Y. et al. 2011. Linezolid-resistant *Staphylococcus aureus* isolated from 2006 through 2008 at six hospitals in Japan. *Journal of infection and chemotherapy : official journal of the Japan Society of Chemotherapy*, 17(1), pp.45–51. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20607345> [Accessed October 31, 2012].
- Iorio, N.L. et al. 2011. Methicillin-resistant *Staphylococcus epidermidis* carrying biofilm formation genes: detection of clinical isolates by multiplex PCR. *Int Microbiol*, 14(1), pp.13–7.
- Ippolito, J.A. et al. 2008. Crystal structure of the oxazolidinone antibiotic linezolid bound to the 50S ribosomal subunit. *Journal of medicinal chemistry*, 51(12), pp.3353–6. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18494460> [Accessed November 9, 2012].
- Jones, R.N. et al. 2006. Oxazolidinone susceptibility patterns in 2004: report from the Zyvox Annual Appraisal of Potency and Spectrum (ZAAPS) Program assessing isolates from 16 nations. *The Journal of antimicrobial chemotherapy*, 57(2), pp.279–87. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16326811> [Accessed November 1, 2012].
- Kehrenberg, Corinna et al. 2005. A new mechanism for chloramphenicol, florfenicol and clindamycin resistance: methylation of 23S ribosomal RNA at A2503. *Molecular microbiology*, 57(4), pp.1064–73. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16091044> [Accessed August 4, 2012].
- Kehrenberg, Corinna, Aarestrup, F.M. & Schwarz, Stefan, 2007. IS21-558 insertion sequences are involved in the mobility of the multiresistance gene cfr. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 51(2), pp.483–7. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1797725&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> [Accessed August 4, 2012].
- Kehrenberg, Corinna, Ojo, K.K. & Schwarz, Stefan, 2004. Nucleotide sequence and organization of the multiresistance plasmid pSCFS1 from *Staphylococcus sciuri*. *The Journal of antimicrobial chemotherapy*, 54(5), pp.936–9. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15471995> [Accessed November 2, 2012].
- Kehrenberg, Corinna & Schwarz, Stefan, 2006. Distribution of Florfenicol Resistance Genes *fexA* and *cfr* among Chloramphenicol-Resistant *Staphylococcus* Isolates. , 50(4), pp.1156–1163.
- Kelly, S. et al. 2008. An outbreak of colonization with linezolid-resistant *Staphylococcus epidermidis* in an intensive therapy unit. *The Journal of*

- antimicrobial chemotherapy*, 61(4), pp.901–7. Available at:
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18272512> [Accessed October 31, 2012].
- Klappenbach, J. a et al. 2001. rrndb: the Ribosomal RNA Operon Copy Number Database. *Nucleic acids research*, 29(1), pp.181–4. Available at:
<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=29826&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
- Kloss, P et al. 1999. Resistance mutations in 23 S rRNA identify the site of action of the protein synthesis inhibitor linezolid in the ribosomal peptidyl transferase center. *Journal of molecular biology*, 294(1), pp.93–101. Available at:
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10556031>.
- Kosowska-Shick, K. et al. 2010. Molecular and epidemiologic characteristics of linezolid-resistant coagulase-negative staphylococci at a tertiary care hospital. *Diagnostic microbiology and infectious disease*, 68(1), pp.34–9. Available at:
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20727467> [Accessed October 31, 2012].
- Kowalczykowski, SC. et al 1994. Biochemistry of homologous recombination in *Escherichia coli*. *Microbiol. Rev*, 58, pp. 401–465.
- Liakopoulos, a et al. 2010. Dissemination of two international linezolid-resistant *Staphylococcus epidermidis* clones in Greek hospitals. *The Journal of antimicrobial chemotherapy*, 65(5), pp.1070–1. Available at:
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20207718> [Accessed November 10, 2012].
- Liakopoulos, A. et al. 2009. A T2504A mutation in the 23S rRNA gene responsible for high-level resistance to linezolid of *Staphylococcus epidermidis*. *The Journal of antimicrobial chemotherapy*, 64(1), pp.206–7. Available at:
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19429927> [Accessed November 2, 2012].
- Lin, a H. et al. 1997. The oxazolidinone eperezolid binds to the 50S ribosomal subunit and competes with binding of chloramphenicol and lincomycin. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 41(10), pp.2127–31. Available at:
<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=164081&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
- Lincopan, N. et al. 2009. Linezolid resistance in *Staphylococcus epidermidis* associated with a G2603T mutation in the 23S rRNA gene. *International journal of antimicrobial agents*, 34(3), pp.281–2. Available at:
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19376688> [Accessed August 4, 2012].
- Lobritz, M. et al. 2003. Recombination Proficiency Influences Frequency and Locus of Mutational Resistance to Linezolid in *Enterococcus faecalis*. , 47(10), pp.3318–3320.
- Locke, J.B. et al. 2010. Structure-activity relationships of diverse oxazolidinones for linezolid-resistant *Staphylococcus aureus* strains possessing the cfr methyltransferase gene or ribosomal mutations. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 54(12), pp.5337–43. Available at:

<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2981267&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> [Accessed October 31, 2012].

Locke, J.B., Hilgers, M. & Shaw, Karen Joy, 2009a. Mutations in ribosomal protein L3 are associated with oxazolidinone resistance in staphylococci of clinical origin. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 53(12), pp.5275–8. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2786331&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> [Accessed October 5, 2012].

Locke, J.B., Hilgers, M. & Shaw, Karen Joy, 2009b. Novel ribosomal mutations in *Staphylococcus aureus* strains identified through selection with the oxazolidinones linezolid and torezolid (TR-700). *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 53(12), pp.5265–74. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2786364&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> [Accessed October 5, 2012].

Long, K.S. et al. 2006. The Cfr rRNA methyltransferase confers resistance to Phenicol, Lincosamides, Oxazolidinones, Pleuromutilins, and Streptogramin A antibiotics. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 50(7), pp.2500–5. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1489768&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> [Accessed October 5, 2012].

Long, K.S. & Vester, B., 2012. Resistance to linezolid caused by modifications at its binding site on the ribosome. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 56(2), pp.603–12. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3264260&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> [Accessed November 2, 2012].

Mankin, a S. & Garrett, R. a, 1991. Chloramphenicol resistance mutations in the single 23S rRNA gene of the archaeon *Halobacterium halobium*. *Journal of bacteriology*, 173(11), pp.3559–63. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=207972&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.

Mazzariol, a et al. 2012. Outbreak of linezolid-resistant *Staphylococcus haemolyticus* in an Italian intensive care unit. *European journal of clinical microbiology & infectious diseases : official publication of the European Society of Clinical Microbiology*, 31(4), pp.523–7. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21792559> [Accessed November 2, 2012].

Meka, V.G., Pillai, S.K., et al. 2004. Linezolid resistance in sequential *Staphylococcus aureus* isolates associated with a T2500A mutation in the 23S rRNA gene and loss of a single copy of rRNA. *The Journal of infectious diseases*, 190(2), pp.311–7. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15216466>.

Meka, V.G., Gold, H.S., et al. 2004. Reversion to susceptibility in a linezolid-resistant clinical isolate of *Staphylococcus aureus*. *The Journal of antimicrobial chemotherapy*, 54(4), pp.818–20. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15347637> [Accessed November 1, 2012].

- Mendes, R.E., Deshpande, L.M., et al. 2010a. Assessment of linezolid resistance mechanisms among *Staphylococcus epidermidis* causing bacteraemia in Rome, Italy. *The Journal of antimicrobial chemotherapy*, 65(11), pp.2329–35. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20841419> [Accessed October 31, 2012].
- Mendes, R.E., Deshpande, L., et al. 2010b. First report of *Staphylococcal* clinical isolates in Mexico with linezolid resistance caused by cfr: evidence of in vivo cfr mobilization. *Journal of clinical microbiology*, 48(8), pp.3041–3. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2916560&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> [Accessed October 31, 2012].
- Mendes, R.E. et al. 2008. First report of cfr-mediated resistance to linezolid in human *staphylococcal* clinical isolates recovered in the United States. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 52(6), pp.2244–6. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2415768&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> [Accessed October 31, 2012].
- Miller, K. et al. 2008. Linezolid and tiamulin cross-resistance in *Staphylococcus aureus* mediated by point mutations in the peptidyl transferase center. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 52(5), pp.1737–42. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2346621&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> [Accessed October 31, 2012].
- Mutnick, A.H., Enne, V. & Jones, R.N., 2003. Linezolid Resistance Since 2001: SENTRY Antimicrobial Surveillance Program. *The Annals of Pharmacotherapy*, 37, pp.769–774. Available at: <http://www.theannals.com/cgi/doi/10.1345/aph.1C437> [Accessed November 4, 2012].
- Otto, M., 2009. *Staphylococcus epidermidis*--the “accidental” pathogen. *Nature reviews. Microbiology*, 7(8), pp.555–67. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2807625&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> [Accessed November 7, 2012].
- Pillai, S.K. et al. 2002. Linezolid resistance in *Staphylococcus aureus*: characterization and stability of resistant phenotype. *The Journal of infectious diseases*, 186(11), pp.1603–7. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12447736>.
- Potoski, B. a et al. 2006. Epidemiological profile of linezolid-resistant coagulase-negative staphylococci. *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America*, 43(2), pp.165–71. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16779742>.
- Prammananan, T. et al. 1999. RecA-Mediated gene conversion and aminoglycoside resistance in strains heterozygous for rRNA. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 43(3), pp.447–53. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=89142&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.

- Pringle, M. et al. 2004. Mutations in ribosomal protein L3 and 23S ribosomal RNA at the peptidyl transferase centre are associated with reduced susceptibility to tiamulin in *Brachyspira* spp. isolates. *Molecular microbiology*, 54(5), pp.1295–306. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15554969> [Accessed October 31, 2012].
- Rodríguez-Aranda, A. et al. 2009. Nosocomial spread of linezolid-resistant *Staphylococcus haemolyticus* infections in an intensive care unit. *Diagnostic microbiology and infectious disease*, 63(4), pp.398–402. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19232856> [Accessed November 2, 2012].
- Ruiz de Gopegui, E. et al. 2011. [Nosocomial spread of linezolid-resistant *Staphylococcus hominis* in two hospitals in Majorca]. *Enfermedades infecciosas y microbiología clínica*, 29(5), pp.339–44. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21435748> [Accessed November 11, 2012].
- Sander, P. et al. 2002. Ribosomal and non-ribosomal resistance to oxazolidinones: species-specific idiosyncrasy of ribosomal alterations. *Molecular microbiology*, 46(5), pp.1295–304. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12453216>.
- Schlünzen, F et al. 2001. Structural basis for the interaction of antibiotics with the peptidyl transferase centre in eubacteria. *Nature*, 413(6858), pp.814–21. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11677599>.
- Schlünzen, Frank et al. 2004. Inhibition of peptide bond formation by pleuromutilins: the structure of the 50S ribosomal subunit from *Deinococcus radiodurans* in complex with tiamulin. *Molecular microbiology*, 54(5), pp.1287–94. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15554968> [Accessed November 7, 2012].
- Schwarz, S, Werckenthin, C. & Kehrenberg, C, 2000. Identification of a plasmid-borne chloramphenicol-florfenicol resistance gene in *Staphylococcus sciuri*. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 44(9), pp.2530–3. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=90098&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
- Shaw, K J et al. 2008. In Vitro Activity of TR-700 , the Antibacterial Moiety of the Prodrug TR-701 , against Linezolid-Resistant Strains In Vitro Activity of TR-700 , the Antibacterial Moiety of the Prodrug TR-701 , against Linezolid-Resistant Strains .
- Sorlozano, a et al. 2010. Detection of new mutations conferring resistance to linezolid in glycopeptide-intermediate susceptibility *Staphylococcus hominis* subspecies *hominis* circulating in an intensive care unit. *European journal of clinical microbiology & infectious diseases : official publication of the European Society of Clinical Microbiology*, 29(1), pp.73–80. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19876662> [Accessed October 31, 2012].
- States, U. et al. 2010. Polyphyletic Emergence of Linezolid-Resistant *Staphylococci* in the. , 54(2), pp.742–748.

- Sunbul, M. et al. 2006. Pacemaker lead endocarditis caused by *Staphylococcus hominis*. *Pacing and clinical electrophysiology : PACE*, 29(5), pp.543–5. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16689853>.
- Swaney, S.M. et al. 1998. The oxazolidinone linezolid inhibits initiation of protein synthesis in bacteria. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 42(12), pp.3251–5. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=106030&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
- Tenover, Fred C et al. 1995. GUEST COMMENTARY Interpreting Chromosomal DNA Restriction Patterns Produced by Pulsed-Field Gel Electrophoresis : Criteria for Bacterial Strain Typing. , 33(9), pp.2233–2239.
- Thomas, J.C. et al. 2007. Improved multilocus sequence typing scheme for *Staphylococcus epidermidis*. *Journal of clinical microbiology*, 45(2), pp.616–9. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1829011&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> [Accessed November 4, 2012].
- Toh, S.-M. et al. 2007. Acquisition of a natural resistance gene renders a clinical strain of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* resistant to the synthetic antibiotic linezolid. *Molecular microbiology*, 64(6), pp.1506–14. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2711439&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> [Accessed November 2, 2012].
- Tsakris, A. et al. 2007. Persistence of rRNA operon mutated copies and rapid re-emergence of linezolid resistance in *Staphylococcus aureus*. *The Journal of antimicrobial chemotherapy*, 60(3), pp.649–51. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17623697> [Accessed October 31, 2012].
- Tsiodras, S. et al. 2001. Linezolid resistance in a clinical isolate of *Staphylococcus aureus* Detection of variant Creutzfeldt- Jakob disease infectivity in extraneural tissues For personal use . Only reproduce with permission from The Lancet Publishing Group . , 358, pp.207–208.
- Wasserscheid, J. et al. 2009. Genome sequencing of linezolid-resistant *Streptococcus pneumoniae* mutants reveals novel mechanisms of resistance. , pp.1214–1223.
- Wilson, D.N. et al. 2008. The oxazolidinone antibiotics perturb the ribosomal peptidyl-transferase center and effect tRNA positioning. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 105(36), pp.13339–44. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2533191&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
- Wilson, P., 2002. Linezolid resistance in clinical isolates of *Staphylococcus aureus*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 51(1), pp.186–188. Available at: <http://www.jac.oupjournals.org/cgi/doi/10.1093/jac/dkg104> [Accessed November 1, 2012].

- Wolter, N. et al. 2005. Novel Mechanism of Resistance to Oxazolidinones , Macrolides , and Chloramphenicol in Ribosomal Protein L4 of the Pneumococcus. , 49(8), pp.3554–3557.
- Xiong, Liqun et al. 2000. Oxazolidinone Resistance Mutations in 23S rRNA of Escherichia coli Reveal the Central Region of Domain V as the Primary Site of Drug Action Oxazolidinone Resistance Mutations in 23S rRNA of Escherichia coli Reveal the Central Region of Domain V as the Pri.
- Zhang, Y.-Q. et al. 2003. Genome-based analysis of virulence genes in a non-biofilm-forming Staphylococcus epidermidis strain (ATCC 12228). *Molecular Microbiology*, 49(6), pp.1577–1593. Available at: <http://doi.wiley.com/10.1046/j.1365-2958.2003.03671.x> [Accessed October 30, 2012].
- Zhu, W. et al. 2007. Use of pyrosequencing to identify point mutations in domain V of 23S rRNA genes of linezolid-resistant Staphylococcus aureus and Staphylococcus epidermidis. *European journal of clinical microbiology & infectious diseases : official publication of the European Society of Clinical Microbiology*, 26(3), pp.161–5. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17393201> [Accessed November 4, 2012].
- Zurenko, G.E. et al. 1996. In Vitro Activities of U-100592 and U-100766 , Novel Oxazolidinone Antibacterial Agents. , 40(4), pp.839–845.

8. ANEXOS

	2610	2620	2630	2640	2650	2660	2670	2680
cepa 12 rrlA F (dia 1)	TCCCAAGGGT	TGGGCTGTTT	CGCCATTAAAG	CGGTAGG	TAGCTGGGTT	CAGAACGTC	GTGAGACAGTT	CGGTCCCTATC
cepa 12 rrlA R (dia 1)	TCCCAAGGGT	TGGGCTGTTT	CGCCATTAAAG	CGGTAGG	TAGCTGGGTT	CAGAACGTC	GTGAGACAGTT	CGGTCCCTATC
cepa 16 rrlA F (dia 1)	TCCCAAGGGT	TGGGCTGTTT	CGCCATTAAAG	CGGTAGG	TAGCTGGGTT	CAGAACGTC	GTGAGACAGTT	CGGTCCCTATC
cepa 16 rrlA R (dia 1)	TCCCAAGGGT	TGGGCTGTTT	CGCCATTAAAG	CGGTAGG	TAGCTGGGTT	CAGAACGTC	GTGAGACAGTT	CGGTCCCTATC
cepa 24 rrlA F (dia 1)	TCCCAAGGGT	TGGGCTGTTT	CGCCATTAAAG	CGGTAGG	TAGCTGGGTT	CAGAACGTC	GTGAGACAGTT	CGGTCCCTATC
cepa 24 rrlA R (dia 1)	TCCCAAGGGT	TGGGCTGTTT	CGCCATTAAAG	CGGTAGG	TAGCTGGGTT	CAGAACGTC	GTGAGACAGTT	CGGTCCCTATC
cepa 3 rrlA F (dia 1)	TCCCAAGGGT	TGGGCTGTTT	CGCCATTAAAG	CGGTAGG	TAGCTGGGTT	CAGAACGTC	GTGAGACAGTT	CGGTCCCTATC
cepa 3 rrlA R (dia 1)	TCCCAAGGGT	TGGGCTGTTT	CGCCATTAAAG	CGGTAGG	TAGCTGGGTT	CAGAACGTC	GTGAGACAGTT	CGGTCCCTATC
E. coli K12 rrnB	TCCCAAGGGT	TGGGCTGTTT	CGCCATTAAAG	TGGTAGG	TAGCTGGGTT	TAGAACGTC	GTGAGACAGTT	CGGTCCCTATC
cepa 12 rrlA F (dia 130)	TCCCAAGGGT	TGGGCTGTTT	CGCCATTAAAG	CGGTAGG	TAGCTGGGTT	CAGAACGTC	GTGAGACAGTT	CGGTCCCTATC
cepa 12 rrlA R (dia 130)	TCCCAAGGGT	TGGGCTGTTT	CGCCATTAAAG	CGGTAGG	TAGCTGGGTT	CAGAACGTC	GTGAGACAGTT	CGGTCCCTATC
cepa 16 rrlA F (dia 130)	TCCCAAGGGT	TGGGCTGTTT	CGCCATTAAAG	CGGTAGG	TAGCTGGGTT	CAGAACGTC	GTGAGACAGTT	CGGTCCCTATC
cepa 16 rrlA R (dia 130)	TCCCAAGGGT	TGGGCTGTTT	CGCCATTAAAG	CGGTAGG	TAGCTGGGTT	CAGAACGTC	GTGAGACAGTT	CGGTCCCTATC
cepa 24 rrlA F (dia 130)	TCCCAAGGGT	TGGGCTGTTT	CGCCATTAAAG	CGGTAGG	TAGCTGGGTT	CAGAACGTC	GTGAGACAGTT	CGGTCCCTATC
cepa 24 rrlA R (dia 130)	TCCCAAGGGT	TGGGCTGTTT	CGCCATTAAAG	CGGTAGG	TAGCTGGGTT	CAGAACGTC	GTGAGACAGTT	CGGTCCCTATC
cepa 3 rrlA F (dia 130)	TCCCAAGGGT	TGGGCTGTTT	CGCCATTAAAG	CGGTAGG	TAGCTGGGTT	CAGAACGTC	GTGAGACAGTT	CGGTCCCTATC
cepa 3 rrlA R (dia 130)	TCCCAAGGGT	TGGGCTGTTT	CGCCATTAAAG	CGGTAGG	TAGCTGGGTT	CAGAACGTC	GTGAGACAGTT	CGGTCCCTATC

Substituição de G por T na posição 2576 referente aos alelos *rrn* de *E. coli*. Alinhamento das sequências do domínio V do alelo *rrlA* das cepas de SCNs resistentes à linezolida submetidas ao processo de reversão ao fenótipo sensível.

	60	70	80	90	100	110	120	130	140	150
S. epid R	AYKFGSKSNKYANK	PAEGHAKKAD	TAPKRFIRE	EFNRNVN	DEYEVGQ	EVSVDTFET	GDIIIDVT	GVSKGKGFQ	GAIKRHGQGR	GPMAHGSHFHRAPG
controle S	AYKFGSKSNKYANK	PAEGHAKKAD	TAPKRFIRE	EFNRNVN	DEYEVGQ	EVSVDTFET	GDIIIDVT	GVSKGKGFQ	GAIKRHGQGR	GPMAHGSHFHRAPG
CP000029.1	AYKFGSKSNKYANK	PAEGHAKKAD	TAPKRFIRE	EFNRNVN	DEYELGQ	EVSVDTFET	GDIIIDVT	GVSKGKGFQ	GAIKRHGQGR	GPMAHGSHFHRAPG

3: CP000029.1 101

Substituição Leu101Val identificada na proteína L3 das cepas de *S. epidermidis* do hospital A.

																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																											</
--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	----

Mutações Gly139Arg, Phe147Ile e Met156Thr identificadas na proteína L3 das cepas de *S. hominis* resistentes à linezolida

	110	120	130	140	150	160	170	180	190	200																																																																																			
cepa 27/987	T	F	E	A	G	D	I	I	D	V	T	G	T	S	K	G	F	Q	G	A	I	K	R	H	G	Q	A	R	G	P	M	A	H	G	S	H	F	H	R	A	P	G	S	I	G	M	A	S	I	A	S	R	V	F	K	G	Q	K	M	P	G	R	M	G	G	N	T	V	T	V	Q	N	L	E	V	V	Q	V	D	T	E	N	N	V	I	L	V	K	G	N	V	P	C
controle S	T	F	E	A	G	D	I	I	D	V	T	G	T	S	K	G	F	Q	G	A	I	K	R	H	G	Q	A	R	G	P	M	A	H	G	S	H	F	H	R	A	P	G	S	V	G	M	A	S	I	A	S	R	V	F	K	G	Q	K	M	P	G	R	M	G	G	N	T	V	T	V	Q	N	L	E	V	V	Q	V	D	T	E	N	N	V	I	L	V	K	G	N	V	P	C
AP006716.1	T	F	E	A	G	D	I	I	D	V	T	G	T	S	K	G	F	Q	G	A	I	K	R	H	G	Q	A	R	G	P	M	A	H	G	S	H	F	H	R	A	P	G	S	V	G	M	A	S	I	A	S	R	V	F	K	G	Q	K	M	P	G	R	M	G	G	N	T	V	T	V	Q	N	L	E	V	V	Q	V	D	T	E	N	N	V	I	L	V	K	G	N	V	P	C

3: AP006716.1 154

Mutação Val154Leu - identificada na proteína L3 de uma das cepas de *S. haemolyticus* resistentes à linezolida