



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA

FELIPE CREPALDI DUARTE

***Staphylococcus aureus* ISOLADOS DE PNEUMONIA E
BACTEREMIA EM UM HOSPITAL TERCIÁRIO DO SUL DO
BRASIL:
RESISTÊNCIA AOS ANTIMICROBIANOS, FATORES DE
VIRULÊNCIA E CLONALIDADE**

Londrina
2018

FELIPE CREPALDI DUARTE

***Staphylococcus aureus* ISOLADOS DE PNEUMONIA E
BACTEREMIA EM UM HOSPITAL TERCIÁRIO DO SUL DO
BRASIL:
RESISTÊNCIA AOS ANTIMICROBIANOS, FATORES DE
VIRULÊNCIA E CLONALIDADE**

Dissertação apresentada ao Programa de Mestrado em Fisiopatologia Clínica e Laboratorial da Universidade Estadual de Londrina, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Fisiopatologia Clínica e Laboratorial.

Orientadora: Profa. Dra. Márcia Regina Eches Perugini

Coorientadora: Profa. Dra. Sueli Fumie Yamada-Ogatta

Londrina
2018

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor, através do Programa de Geração Automática do Sistema de Bibliotecas da UEL

Duarte, Felipe Crepaldi.

Staphylococcus aureus ISOLADOS DE PNEUMONIA E BACTEREMIA EM UM HOSPITAL TERCIÁRIO DO SUL DO BRASIL: RESISTÊNCIA AOS ANTIMICROBIANOS, FATORES DE VIRULÊNCIA E CLONALIDADE / Felipe Crepaldi Duarte. - Londrina, 2018.
97 f.

Orientador: Marcia Regina Eches Perugini.

Coorientador: Sueli Fumie Yamada- Ogatta.

Dissertação (Mestrado em Fisiopatologia Clínica e Laboratorial) - Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências da Saúde, , 2018.

Inclui bibliografia.

1. *Staphylococcus aureus* - Tese. 2. MRSA - Tese. 3. Genotipagem - Tese. 4. Resistência, Antibacterianos - Tese. I. Perugini, Marcia Regina Eches. II. Ogatta, Sueli Fumie Yamada-. III. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências da Saúde. . IV. Título.

FELIPE CREPALDI DUARTE

***Staphylococcus aureus* ISOLADOS DE PNEUMONIA E BACTEREMIA
EM UM HOSPITAL TERCIÁRIO DO SUL DO BRASIL:
RESISTÊNCIA AOS ANTIMICROBIANOS, FATORES DE VIRULÊNCIA E
CLONALIDADE**

Dissertação apresentada ao Programa de Mestrado
em Fisiopatologia Clínica e Laboratorial da
Universidade Estadual de Londrina.

BANCA EXAMINADORA

Orientadora: Profa. Dra. Marcia Regina Eches
Perugini
Universidade Estadual de Londrina – UEL

Profa. Dra. Eliana Carolina Vespero
Universidade Estadual de Londrina – UEL

Profa. Dra. Maria Cristina Bronharo Tognim
Universidade Estadual de Maringá – UEM

Londrina, 19 de março de 2018.

Deus

Dedico este trabalho de forma especial a Ele, que nos guia, protege e guardas em todas as etapas de nossas vidas. Obrigado Deus por mais essa conquista.

Aos meus pais

Cleunice e Nilton por todo carinho, amor, companheirismo, apoio e dedicação.

Profa. Dra. Márcia R. E. Perugini

Exemplo de ser humano e profissional. Obrigado pela honra de ser seu aluno.

AGRADECIMENTOS

Aos professores do Mestrado

Agradeço de forma especial a todos os professores do Programa de Mestrado em Fisiopatologia Clínica e Laboratorial pelos ensinamentos, apoio e carinho que nos prestaram ao longo do caminho.

Aos Professores do CCB-NIP5

Agradeço aos professores Dra. Sueli Fumie Yamada-Ogatta, Dra. Lucy Megumi Yamauchi Lioni e Dr. Eliandro Reis Tavares pelo auxílio, ensinamentos e partilha ao longo do mestrado.

Aos amigos e familiares

Agradeço a todos os amigos e familiares pelas palavras acalentadoras e auxílio.

Aos colegas do Mestrado

Agradeço aos colegas do mestrado em fisiopatologia clínica e laboratorial e NIP5 pela partilha de amizade e conhecimento ao longo desses anos.

Aos Servidores do HUL e CCB

Agradeço a todos os servidores do HUL e CCB pelo carinho, apoio e auxílio.

À Banca Examinadora.

Agradeço a Profa. Dra. Eliana Carolina Vespero, Profa. Dra. Maria Cristina Bronharo Tognim e ao Prof. Dr. Gerson Nakazato pela honra de aceitar o convite de compor à banca examinadora.

Aos Órgãos de Fomento.

Agradeço de forma especial a FUNDAÇÃO ARAUCÁRIA pelo incentivo a essa pesquisa.

“...Tenho-vos dito isto, para que em mim tenhais paz; no mundo tereis aflições, mas tende bom ânimo, eu venci o mundo.” **João 16:33**

DUARTE, Felipe Crepaldi; PERUGINI, Marcia Regina Eches. *Staphylococcus aureus* isolados de pneumonia e bacteremia em um hospital terciário do sul do Brasil: resistência aos antimicrobianos, fatores de virulência e clonalidade. 2018. 97 f. Dissertação (Mestrado em Fisiopatologia Clínica e Laboratorial) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina. 2018.

RESUMO

Staphylococcus aureus é um microrganismo versátil que causa grande diversidade de infecções, acometendo tecidos superficiais ou ocasionando síndromes invasivas, como pneumonias e bacteremias. Esse trabalho teve como objetivos analisar a resistência, virulência e as relações epidemiológicas e genéticas de *Staphylococcus aureus*, oriundos de sangue e secreção traqueal, em um hospital terciário do sul do Brasil. A identificação do microrganismo, bem como a determinação do perfil de resistência aos antimicrobianos, foi realizada por metodologia manual, de acordo com o CLSI, 2018, e automatizada utilizando os sistemas Vitek[®]2 (bioMérieux-USA), Phoenix[®] (Becton, Dickinson) e Microscan[®] (Siemens- Califórnia). A concentração inibitória mínima de vancomicina foi determinada por fitas de e-test[®] (bioMérieux-USA). O DNA total dos isolados, extraído por protocolo enzimático, foi utilizado para pesquisa dos genes *mecA*, *icaA*, *pvl* e *tsst*, além da análise dos Complexos Clonais e *Sequence Typing*. Foi realizado, para um isolado, sequenciamento genômico total utilizando a plataforma Miseq[®] (Illumina). Foram avaliados 720 isolados de *S. aureus* provenientes de bacteremia entre os anos de 2001-2015. Observou-se que, para os antimicrobianos ciprofloxacina, eritromicina, oxacilina e clindamicina houve aumento no percentual de isolados resistentes, com tendência de elevação. Enquanto para gentamicina, rifampicina, tetraciclina e sulfametoxazol-trimetoprima houve queda nos percentuais. O período de avaliação para vancomicina foi de cinco anos (2011-2015), mostrando elevação nas concentrações inibitórias mínimas. Para os anos de 2015-2016, 105 isolados de *S. aureus* oriundos de sangue e secreção traqueal foram avaliados. Verificou-se que 81,9 % dos isolados foram positivos para o gene *mecA*. Na amplificação dos tipos SCC*mec* o tipo II foi detectado como prevalente, sendo positivo em 61,67%, 23,33% pertenciam ao tipo IV, 13,33% foram do tipo I e apenas uma amostra, 1,67%, continha o tipo III. Verificou-se ainda, a presença de 30 *Sequence Type* e 18 Complexos Clonais, sendo que os mais frequentes foram ST63 (12,16%), ST6 (8,1%) e ST5, 306 e 835 (6,8%). Quanto aos CC os mais prevalentes foram os CC5 (50%), CC7 e CC445 (6,8%). Ao analisar os fatores de virulência percebeu-se que 87,8% das amostras continham o operon *icaA*, 16,2% apresentaram o operon *pvl* e 14,9 o *tsst*. Conclui-se que a maioria dos isolados apresentava, como fator de virulência, o operon *icaA*, eram portadores do gene *mecA* e pertenciam ao SCC*mec* tipo II, ST63 e CC5. Quanto ao perfil de sensibilidade aos antimicrobianos houve tendência de elevação no perfil de resistência para oxacilina, ciprofloxacina, clindamicina e eritromicina e tendência de queda para gentamicina, rifampicina e sulfametaxol-trimetoprima. Quanto a vancomicina houve tendência de elevação na concentração inibitória mínima. Avaliando o sequenciamento do genoma foi encontrada mutação no gene *mecA*, bem como o gene *femXAB*.

Palavras-chave: *Staphylococcus aureus*. MRSA. Genotipagem. Resistência. Antibacterianos.

DUARTE, Felipe Crepaldi; PERUGINI, Marcia Regina Eches. ***Staphylococcus aureus* from invasive infections in a tertiary hospital in the south of Brazil: resistance to antimicrobial agents, virulence factors and clonality.** 2018. 97 p. Dissertation (Master's Program in Clinical and Laboratory Physiopathology) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina. 2018.

ABSTRACT

Staphylococcus aureus is a versatile microorganism that causes a wide range of infections, involving superficial tissues or causing invasive syndromes, such as pneumonia and bacteremia. The objective of this study was to analyze the resistance, virulence and epidemiological and genetic relationships of *Staphylococcus aureus* isolated from blood and tracheal secretion in a tertiary hospital in southern Brazil. The identification of the microorganisms, as well as the determination of the antimicrobial resistance profile, was performed by manual methodology, according to the CLSI, 2018, and automated using Vitek®2 (bioMérieux-USA), Phoenix® (Becton, Dickinson) and Microscan® (Siemens-California). The minimum inhibitory concentration of vancomycin was determined by *e-test*® tapes (bioMérieux-USA). The total DNA of the isolates, extracted by enzymatic protocol, was used to investigate the *mecA*, *icaA*, *pvl* and *tsst* genes, in addition to the Clonal Complex and Sequence Typing analysis. We performed, for one isolate, total genomic sequencing using the Miseq® (Illumina) platform. A total of 720 isolates of *S. aureus* from bacteremia were evaluated between 2001-2015. It was observed that, for the antimicrobials ciprofloxacin, erythromycin, oxacillin and clindamycin, there was an increase in the percentage of resistant isolates with a tendency to increase. While for gentamicin, rifampicin, tetracycline and sulfamethoxazole-trimethoprim, there was a decrease in percentages. The vancomycin evaluation period was from five years (2011-2015), showing an increase in the minimum inhibitory concentrations. For the years 2015-2016, 105 *S. aureus* isolated from blood and tracheal secretion were evaluated. It was found that 81.9% of the isolates were positive for the *mecA* gene. In the amplification of SCCmec types, type II was detected as prevalent, 61.67% followed by type IV, 23.33% and type I, 13.33%. Only one isolate had type III, 1.67%. The presence of 30 Sequence Type and 18 Clonal Complexes was also observed, with ST63 (12.16%), ST6 (8.1%) and ST5, 306 and 835 (6.8%) being the most frequent. The most prevalent CCs were CC5 (50%), CC7 and CC445 (6.8%). When analyzing the virulence factors, it was observed that 87.8% of the samples contained the *icaA* operon, 16.2% had *pvl* operons and 14.9 *tsst*. It was concluded that most of the isolates presented, as a virulence factor, the *icaA* operon, were carriers of the *mecA* gene and belonged to SCCmec type II, ST63 and CC5. As for the antimicrobial susceptibility profile, there was a tendency to increase the resistance profile for oxacillin, ciprofloxacin, clindamycin and erythromycin and tendency and fall for gentamicin, rifampicin and sulfamethoxol-trimethoprim. As for vancomycin, there was a tendency to increase the minimum inhibitory concentration. Evaluating the genome sequencing was found mutation in the *mecA* gene as well as the *femXAB* genes.

Key words: *Staphylococcus aureus*. MRSA. Genotyping. Resistance. Antibacterial.

LISTA DE TABELAS, FIGURAS e FLUXOGRAMA

Figura 1 –	Estrutura dos diferentes elementos <i>SCCmec</i>	19
Tabela 1 –	Relação entre PCR para gene <i>mecA</i> e sensibilidade a oxacilina, por método fenotípico, para 105 isolados de <i>S.aureus</i>	29
Figura 1 –	Variação do percentual de resistência entre <i>S. aureus</i> (n=720) isolados de hemoculturas realizadas no Hospital Universitário de Londrina entre os anos 2001 e 2015	36
Figura 2 –	Curva de tendência para os antimicrobianos com maior índice de resistência bacteriana durante o período avaliado	36
Figura 3 –	Curva de tendência de resistência para os antimicrobianos com queda nos percentuais de resistência ao longo dos períodos analisados	37
Figura 4 –	Variação das Concentrações Inibitórias Mínimas (MIC) de vancomicina obtidas por microdiluição para 174 amostras de <i>S. aureus</i> , isolados de sangue, no período de 2010 a 2015	38
Tabela 1 –	Características moleculares e perfil de suscetibilidade aos antimicrobianos de 34 <i>Methicillin-resistant Staphylococcus aureus</i> <i>SCCmec</i> tipoII, isolados entre 2015-2016	49
Tabela 1 –	Características de isolados de <i>S. aureus mecA</i> -positivo oxacilina sensíveis descritos ao redor do mundo.....	59
Figura 1 –	Genoma Circular <i>S. aureus</i> 549	76
Figura 2 –	Alteração de nucleotídeos no gene <i>mec</i>	77
Figura 3 –	Alinhamento para o gene <i>femC</i> no isolado <i>S. aureus</i> 549	78
Tabela 1 –	Dados gerais 105 amostras de <i>S. aureus</i> coletados de pacientes internados no HUL entre os anos de 2015-2016 com diagnóstico de bacteremia e pneumonia	91
Tabela 1 –	Dados gerais de virulência e clonalidade de 74 amostras de <i>S. aureus</i> coletados de pacientes internados no HUL entre os anos de 2015-2016 com diagnóstico de bacteremia e pneumonia	94
Fluxograma –	Fluxograma com o número de amostras selecionadas para realização de cada um dos 4 estudos conduzidos nessa dissertação	97

LISTA DE ABREVIATURAS

MRSA	<i>Methicillin-resistant Staphylococcus aureus</i>
PBP	<i>Penicillin Biding Proteins</i>
ST	<i>Sequence Type</i>
CC	Complexo Clonal
SCC	<i>Staphylococcal Chromosome Cassette</i>
MLST	<i>Multi Locus Sequence Type</i>
NAG	<i>N-acetil-glicosamina</i>
NAM	<i>N-acetil-muramico</i>
<i>ccr</i>	Cassette chromosome recombinase
J1; J2 e J3	Regiões Internas dos Elementos SCCmec
SNP	<i>Single-Nucleotide Polymorphisms</i>
TSST	<i>Toxic Shock Syndrome Toxin</i>
PVL	<i>Panton-Valentine Leukocidin</i>
CLSI	<i>Clinical and Standards Laboratory Institute</i>
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
CDC	<i>Center of Diseases Control</i>
ECDC	<i>European Centre for Disease Prevention and Control</i>
CIM	Concentração Inibitória Mínima
HRM-PCR	<i>High Resolution Melting - Polimerase Chain Reaction</i>
RTq	PCR-Reação em Cadeia da Polimerase em Tempo Real.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	12
1.1	GÊNERO STAPHYLOCOCCUS	12
1.2	FATORES DE VIRULÊNCIA	13
1.3	INFECÇÕES ESTAFILOCÓCICAS	14
1.4	MECANISMOS DE RESISTÊNCIA	16
1.5	EPIDEMIOLOGIA	20
2	OBJETIVOS	25
2.1	OBJETIVO GERAL.....	25
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	26
3	MATERIAIS E MÉTODOS	26
3.1	AMOSTRAS	26
3.2	MÉTODOS FENOTÍPICOS	27
3.3	MÉTODOS GENOTÍPICOS	27
4	LOCAIS DE REALIZAÇÃO DO ESTUDO	28
5	ASPECTOS ÉTICOS	28
6	RESULTADOS	28
6.1	ARTIGO 1	31
6.2	ARTIGO 2	45
6.3	ARTIGO 3	54
6.4	ARTIGO 4	73
7	CONCLUSÃO	81
	REFERÊNCIAS	82
	APÊNDICES	91
	APÊNDICE A	91
	APÊNDICE B	94
	APÊNDICE C	97

1INTRODUÇÃO

1.1 GÊNERO STAPHYLOCOCCUS

Staphylococcus é um gênero de bactérias anaeróbias facultativas que se apresenta na forma de cocos Gram-positivos, com tamanho aproximado de 0,5 a 1,5 μm de diâmetro. Podem se agrupar na forma de cachos, aos pares, em tétrades ou em cadeias curtas (JORGENSEN, 2015). Esse gênero pertence à família *Staphylococcaceae*, que é composta por 51 espécies e 28 subespécies. Esses microrganismos se desenvolvem bem em condições adversas, como em ambientes com baixa umidade ou elevada pressão osmótica. Possuem elevada flexibilidade nutricional e apresentam capacidade de sobrevivência, e multiplicação, sob diferentes condições ambientais (DSMZ, 2015).

De acordo com a capacidade de coagular o plasma, as espécies do gênero são classificadas em coagulase-positiva e coagulase-negativa, sendo *S. aureus*, subespécie *aureus*, principal representante do grupo coagulase-positiva. Seu genoma pode variar de 2.000 a 3.000 Kb (KLUYTMANS, 2010; PINCHUK; BESWICK; REYES, 2010). Bactérias pertencentes a esse gênero estão presentes no ambiente desde os primórdios, tendo sido descritas até mesmo em fósseis. Entretanto, somente no século 19 o gênero foi reconhecido como um importante patógeno (MOELLERING, 2012).

S. aureus estão amplamente distribuídos na natureza, e se fazem presentes como colonizantes em mucosas, pele, glândulas, trato gastrintestinal, urinário e respiratório, tanto em seres humanos como em animais (KLUYTMANS, 2010). Além disso, é considerado um dos patógenos de maior prevalência nos processos infecciosos, sejam eles de origem hospitalar ou comunitário (AGABOU et al., 2017; SHAHINI et al., 2017).

Nos seres humanos a narina anterior funciona como reservatório primário de *S. aureus*. Com uma relação simbiótica, são encontrados colonizando cerca de 20 a 50% dos pacientes saudáveis (BESSESEN et al., 2015; KHANAL et al., 2015). Essa extensa taxa de colonização eleva a chance de portadores saudáveis, sob condições adversas, desenvolverem quadro infeccioso por *S. aureus*. Outro ponto importante é o fato de que indivíduos portadores podem contaminar profissionais de saúde e/ou outros pacientes, contribuindo, assim, para uma maior dispersão do microrganismo no ambiente (CHANG, SCHIBLER, 2016; KLUYTMANS, 2010; PEREIRA; CUNHA, 2009; WAN et al., 2017).

As infecções ocasionadas por *S. aureus* são iniciadas por sua inserção através da pele ou mucosas, podendo ficar localizadas ou se expandir para outros órgãos, ocasionando pneumonias, osteomielites, ou infecções sistêmicas, como bacteremias(WAN et al., 2017).

Seu sucesso como patógeno se deve, principalmente, à grande capacidade de adaptação ao meio, aquisição de elementos genéticos que auxiliam na capacidade de resistência antimicrobiana, virulência e evasão bacteriana(MONACO et al., 2016).

1.2 FATORES DE VIRULÊNCIA

Alguns isolados de *S. aureus* têm a capacidade de produzir uma série de fatores de virulência que auxiliam em seus mecanismos de defesa, entre eles: catalase, coagulase, DNase, produção de biofilme, leucocidinas, toxinas, hialuronidases, entre outros (OLUFUNMISO; TOLULOPE; ROGER, 2017).

Um mecanismo de virulência muito importante em *S. aureus* é a produção de biofilme. Os microrganismos, quando inseridos no biofilme, têm maior capacidade de fuga do sistema imune e resistência ao tratamento farmacológico, sendo menos susceptíveis aos agentes agressores. Além disso, no ambiente interno do biofilme os microrganismos tem maior facilidade para comunicação celular e transferência horizontal de genes. A formação do biofilme é facilitada nas superfícies de dispositivos médicos. Alguns isolados de *S. aureus* conseguem permanecer viáveis, sob a forma de biofilme, em superfícies inanimadas por longos períodos (JOSHI et al., 2018).

O biofilme é composto por uma matriz de polissacarídeos constituída por uma cadeia linear de β -1-6 glicosaminoglicano com resíduos de 2-deoxi-2-amino-D-glucopiranosil cujo é composto de 80-85% de poli- β (1,6)-N-acetil-d-glucosamina, um polissacarídeos de superfície com carga positiva denominada *polysaccharide intracellular adhesion* (PIA). A síntese dessa molécula acontece pela expressão dos genes *icaA*; *icaB*; *icaC*; ou *icaD*, localizados em um operon. Contudo, a formação dessa trama de polissacarídeos e proteínas se dá, principalmente, pela presença do operon *icaA*(HEILMANN et al., 1996;LEE et al., 2014;SHRESTHA et al., 2016).

Outro importante fator de virulência é a *Panton-Valentine Leukocidin* (PVL), uma citotoxina que tem como principal atividade a destruição tecidual, podendo, em casos mais graves,acarretar em necrose de tecido. Além disso, pode inibir a resposta imune do hospedeiro, intensificando o processo infeccioso. Isolados de *S. aureus*portadores do gene

pvl, normalmente, estão associados a infecções graves de pele e partes moles, pneumonia necrotizante e sepse (KULANGARA et al., 2017; MANAFI et al., 2017).

O alvo dessas leucocidinas são os leucócitos polimorfonucleares. Ao induzir a morte celular auxilia na evasão bacteriana dos mecanismos de defesa do hospedeiro e rompimento do tecido. Esse gene está inserido em um *operon* policistrônico composto por 2 segmentos: um S na porção superior, gene *luk_{PV}S*, e um F na porção inferior, gene *luk_{PV}F*, com um região simples intercistrônica (YAMAMOTO et al., 2010).

A Toxina da Síndrome do Choque Tóxico (*Toxic Shock Syndrome Toxin - TSST*) contribui para o potencial patogênico dos isolados de *S. aureus*. A produção dessa toxina dificulta o tratamento e ocasiona síndromes graves nos pacientes, impactando de forma negativa nos serviços de saúde (MERRIMAN et al., 2016). O gene *tsst-1* que codifica a TSST é controlado pelo *locus accessory gene regulator (agr)*, esse *locus* além de codificar a produção da toxina, é responsável pela codificação de outros genes de virulência em *S. aureus*. A TSST, produzida por alguns isolados de *S. aureus*, é responsável por ocasionar uma síndrome aguda, de início rápido e potencialmente fatal (JOMEHPOUR; ESLAMI; KHALILI, 2016).

Sua ação é similar a de um “superantígeno” que ativa a resposta imunológica de células T e ocasiona grande liberação de citotoxinas. Ao elevar, de forma exponencial a resposta imune, promove alterações fisiológicas importantes no hospedeiro, que evolui para o quadro de choque (KERR et al., 2017).

1.3 INFECÇÕES ESTAFILOCÓCICAS

S. aureus é, provavelmente, o microorganismo mais comum em infecções humanas, e pode acarretar uma gama de infecções, como as de pele e tecidos moles sendo as mais comuns, até moléstias invasivas como osteomielite, osteorrite, infecções associadas a cateteres ou próteses, endocardite, bacteremia e pneumonia (KHAN; WILSON; GOULD, 2018; TONG et al. 2015).

As pneumonias por *S. aureus* podem ter origem hospitalar ou comunitária, embora apresentem papel predominante em pacientes hospitalizados. Trata-se de uma patologia que acarreta aumento de admissão nos serviços de saúde, corrobora com a piora do prognóstico clínico e pode evoluir para óbito, principalmente em pacientes idosos, crianças e imunodeprimidos (UZOAMAKA et al., 2017). A pneumonia estafilocócica se inicia,

provavelmente, pela aspiração de microrganismos presentes na flora orofaríngea do paciente. Esse fato é facilitado pela presença do tubo, diretamente inserido na cavidade endotraqueal (CHANG; SCHIBLER, 2016).

Em um estudo de coorte retrospectivo, realizado nos EUA, cerca de 40% das culturas obtidas de pacientes com Pneumonias Adquiridas em Hospitais (HCAP) foram positivas para *S. aureus* (KOLLEF; MICEK, 2005). Posteriormente, o *National Healthcare Safety Network* (NHSN) relatou que *S. aureus* foi o agente etiológico mais frequente (24,7%) em Pneumonia Associada à Ventilação (PAV) entre os anos 2011 a 2015 (WEINER et al., 2016).

A prevalência de PAV, ocasionada por *S. aureus*, chega a até 33%. Pacientes com esse quadro, frequentemente, apresentam dificuldade respiratória e estão inseridos em um grupo de risco. Além disso, a PAV estende os dias de internação e está associada à elevada morbimortalidade (AYKAC; OZSUREKCI; BASARANOGLU, 2017).

A resistência aos antimicrobianos, apresentada por isolados de *S. aureus*, amplifica a gravidade dessas infecções e sua persistência, inserido no biofilme sob o tubo orotraqueal, constitui uma fonte potencial de pneumonia recorrente (SANCHEZ et al., 2013; WAN et al., 2017).

Nas últimas quatro décadas as infecções de corrente sanguínea ocasionadas por *Staphylococcus* spp. têm se elevado de forma exponencial em hospitais ao redor do mundo e, atualmente, estão entre as causas mais comuns de infecção bacteriana de origem hospitalar, sendo os *S. aureus* um dos principais isolados causadores de bacteremia (AMMERLAAN et al., 2013; ROSENTHAL, 2016; WEINER et al., 2016).

Bacteremias por *S. aureus* resistentes a meticilina (*Methicillin-Resistant S. aureus*-MRSA) estão associadas a mais desfechos clínicos desfavoráveis, em comparação com *S. aureus* sensível à meticilina (*Methicillin Susceptible S. aureus*-MSSA) (HASSOUN; LINDEN; FRIEDMAN, 2017; TÄRNBERG; NILSSON; DOWZICKY, 2016; WEINER et al., 2016).

Os focos de infecção podem ser intravasculares, quando o paciente possui dispositivos intravenosos, extravasculares, ou decorrentes de focos infecciosos primários, como pneumonia, nefrite e até infecções de pele e partes moles (DAYAN et al., 2016).

A bacteremia ocasionada por *S. aureus* é uma infecção sanguínea, de extrema gravidade, com uma incidência estimada de 80 a 190 casos/100.000 habitantes, por ano, em países desenvolvidos (LAUPLAND et al., 2013; LE MOING et al., 2015; WEINER et al., 2016). O *Centers for Disease Control and Prevention* (CDC) de Atlanta estima que 80.461

infecções invasivas, por MRSA, e 11.285 morte, relacionadas à bacteremia estafilocócica, ocorreram nos EUA em 2011(CDC, 2013).

Os casos de bacteremia por *S. aureus* são fortemente associadas a um pior prognóstico (GOTO et al., 2017). A mortalidade após bacteremia estafilocócica é alta, ocasionando óbito 30-dias-internação em 20% dos pacientes e uma taxa estimada de mortalidade relacionada à infecção de aproximadamente 13%(RECKER et al., 2017;VAN HAL et al., 2012). Taxas de mortalidade para o choque séptico por *S. aureus* são ainda maiores, variando entre 40-60%(CHUNG et al., 2016).

No Brasil, de acordo com Gales, et al. (2009) cepas de MRSA estão em primeiro lugar, como agente etiológico de bacteremias e segundo lugar quanto às pneumonias. No Hospital Universitário de Londrina (HUL), isolados de *S. aureus* ocupam o terceiro lugar como agentes causadores de bacteremia e o quarto lugar entre isolados relacionados às pneumonias.

1.4 MECANISMOS DE RESISTÊNCIA

Na era pré tratamento antimicrobiano, *S. aureus* era responsável por grande parte das taxas de mortalidade (82%), principalmente em infecções graves como a bacteremia (SMITH; JARVIS, 1999). Em 1928, com a descoberta da penicilina por Alexander Fleming, novas perspectivas para o tratamento das infecções ocasionadas pelo patógeno surgiram (MOELLERING; WEINBERG, 1971).

Após passados dois anos de sua efetiva utilização, em meados dos anos 40, alguns isolados de *S. aureus* já apresentavam resistência ao antimicrobiano. Essa resistência ocorria pela aquisição de um plasmídeo que conduz o gene *blaZ*(NOVICK, BOUANCHAUD, 1971).Esse gene, segundo Lobanovska, Pilla (2017); Olsen, Christensen, Aarestrup (2006) e Pereira et al. (2014), é responsável por codificar a produção de uma enzima denominada penicilinase, que tem como função clivar o grupo funcional do antimicrobiano, inativando-o e, promovendo falha terapêutica.

No final dos anos 50 foi desenvolvida uma penicilina semissintética, denominada, meticilina, pela adição de um radical no grupo funcional, carbono α , do anel β -lactâmico, local de ação da penicilinase. Acreditava-se que o tratamento para as infecções estafilocócicas havia se resolvido com o desenvolvimento desse novo fármaco. Contudo, em 1961, um ano após sua inserção no mercado foram descritos na Inglaterra e Dinamarca as primeiras cepas

de MRSA. Contudo seu mecanismo de resistência somente foi descoberto em 1980 (HARKINS et al., 2017; JEVONS, 1961; LOBANOVSKA; PILLA, 2017).

Diferente do primeiro mecanismo de resistência, que ocorre pela produção da enzima penicilinase, a resistência a meticilina se dá, segundo Hartman e Tomasz (1981), por uma mudança no sítio de inserção para o antimicrobiano em uma proteína, a *Penicillin-Binding Proteins* (PBP). Essa proteína modificada ficou conhecida como PBP2a ou PBP 2'. Ela é a responsável por fazer a ligação da ponte cruzada de pentaglicina entre o 3^o e o 4^o aminoácidos, *L-lisina* e *D-alanina*, respectivamente, das cadeias laterais de *N-acetil glicosamina* (NAG) e *ácido N-acetilmurâmico* (NAM) para formação da parede celular bacteriana (REICHMANN, PINHO, 2017; SASSINE et al., 2017).

A meticilina, fármaco β -lactâmico, se insere no sítio de ligação da proteína e impede que ela realize sua função na formação da ponte cruzada entre os aminoácidos, o que confere instabilidade à parede. Isso faz com que o microrganismo produza uma parede frouxa, que irá se romper e culminar com a morte da célula. Com a produção, pela célula bacteriana, de uma proteína modificada o antimicrobiano já não reconhece mais seu sítio alvo, deixando à nova PBP livre para desempenhar seu papel na síntese da parede celular (GARCÍA-FERNÁNDEZ et al., 2017).

O gene *mecA*, que está localizado em um elemento genético móvel, o cassete cromossômico estafilocócico (*SCCmec*), é responsável por codificar a proteína modificada, PBP2a, que ocasiona falha na terapia com agentes β -lactâmicos (AKANBI et al., 2017). O elemento *SCCmec* é composto pelo gene *mec*, principalmente o *mecA*, sequências regulatórias (*mecR1* e *mecI*) e o complexo *ccr*, região responsável por integrar ou eliminar sequências do cassete cromossômico. (HIRAMATSU et al., 2014; MONACO et al., 2016)

Existem, ainda, outras regiões que compõem o cassete, denominadas regiões J. Essas, que podem ser J1; J2 e J3 conduzem componentes não essenciais ao cassete, porém, em alguns casos, nelas existem genes ligados à resistência aos agentes antimicrobianos. A região J1 está localizada à esquerda do complexo *ccr*, na junção inicial do cassete, já a região J2 fica entre o complexo *ccr* e o gene *mec*, a região J3 está à direita do gene *mec*, na junção final do cassete (MILHEIRIÇO; OLIVEIRA; DE LENCASTRE, 2007).

As variações nas combinações entre as regiões J, complexo *ccr* e gene *mec* definem os diferentes tipos de *SCCmec*, dos quais 11 (I-XI) já foram descritos em literatura. (MOOSAVIAN et al. 2017). Entre os diferentes elementos *SCCmec*, nove carregam os

genes *ccrA* e *ccrB* e, somente dois deles, os tipos V e VIII, possuem o gene *ccrC* (WU et al. 2015).

Além do *mecA* a resistência ao fármacos β -lactâmicos pode ocorrer, ainda, pela codificação do *mecC*. De acordo com Shore et al. (2011) e García-Álvarez et al. (2011), que primeiro reportaram esse fenômeno, o novo gene apresenta 70% de homologia com o *mecA* produzindo uma PBP2a com 63% de similaridade aquela codificada pelo gene *mecA*. Quanto ao sistema de regulação do operon, dentro do cassete, o *mecC* depende dos genes *mecI-mecRI*, assim como acontece com *omecA* (BRADLEY, 2017).

Isolados de *S. aureus*, *mecA*-positivos, podem expressar resistência heterogênea a oxacilina (SAKOULAS et al., 2001), com Concentração Inibitória Mínima (CIM) variando da faixa sensível ($\leq 2 \mu\text{g/mL}$) a moderadamente alta (2 – 16 $\mu\text{g/mL}$), ou mesmo extremamente alta ($\geq 256 \mu\text{g/mL}$) (HRYNIEWICZ; GARBACZ, 2017; POURNARAS et al. 2015). Por esse motivo, o Instituto de Padronização Americano (*Clinical and Laboratory Standards Institute-CLSI*) definiu como MRSA aqueles isolados que apresentam o gene *mecA* ou CIM para oxacilina $\geq 4 \mu\text{g/mL}$ (CLSI, 2018).

Aliado aos isolados com perfil heterogêneo, o surgimento de cepas sensíveis a oxacilina, com presença do gene *mecA* (*Oxacillin-susceptible MRSA - OS-MRSA*), tem intensificado a dificuldade terapêutica das infecções estafilocócicas. Essas cepas, descritas primariamente por Kampf et al. (2003), com amostras isoladas de três hospitais germânicos entre anos de 1995 e 1996, embora amplifiquem o gene *mecA*, ao teste fenotípico se mostram sensíveis a oxacilina, como valores de CIM $\leq 2 \mu\text{g/mL}$ (CHUNG et al., 2016).

Essa queda para a CIM de oxacilina não está totalmente estabelecida, e pode ser explicada pela repressão ou baixa expressão do gene *mecA*, aquisição de elementos genéticos móveis como a *IS1272* ou mutação em proteínas envolvidas na síntese de parede, como o complexo *femXAB* e *murE*. Outro ponto abordado são as mutações no complexo *mecI-mecRI* envolvidos na regulação da transcrição do gene *mec* (KOBAYASHI, N. et al 1999; KAMBEROVIC, F. et al. 2015; POURNARAS, S. et al. 2015).

A prevalência desses isolados, bem como sua descrição, varia entre as regiões, com frequências de 1,2% em estudo conduzido no Reino Unido por Saeed et al. (2014) a 52% com *S. aureus* de amostras Brasileiras, como descrito por Andrade-Figueiredo; Leal-Balbino (2016).

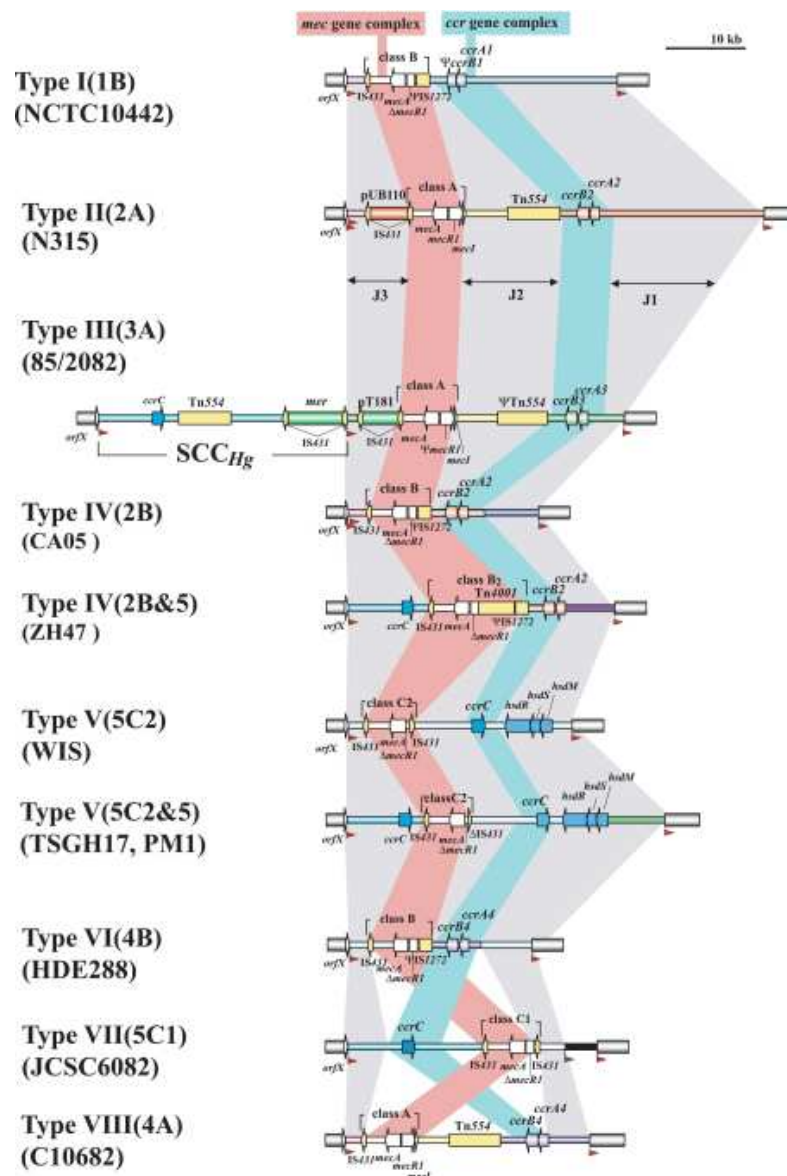


Figura 1. Estrutura dos diferentes elementos SCC_{mec}. Fonte: International Working Group on the Classification of Staphylococcal Cassette Chromosome Elements (IWG-SCC)]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2786320/figure/f1/>

Com a emergência de resistência aos agentes β -lactâmicos, a vancomicina passou a ser utilizada como fármaco de escolha para o tratamento de pacientes com infecção estafilocócica. No entanto, no ano 1997, no Japão, foi descrita a primeira cepa MRSA com sensibilidade reduzida à vancomicina (*Vancomycin Intermediate S. aureus* - VISA) (HIRAMATSU, 1997).

Por muito tempo havia o receio de que esse fenômeno ocorresse pela aquisição de um plasmídeo que contém o operon *van*, vindo do *Enterococcus* spp., contudo, um ano mais tarde,

verificou-se que a redução da susceptibilidade era devido a outro mecanismo. Os isolados VISA apresentavam hiperprodução de NAM, o que promove a elevação na concentração de mureína da parede celular. Isso faz com que o microrganismo produza uma parede mais espessa do que o normal, aumentando a concentração do *D-ala D-ala* na porção final da cadeia, alvo do antimicrobiano. (KEIICHI HIRAMATSU, 1998).

Há ainda o fenômeno conhecido como heterorresistência à vancomicina. De acordo com o CLSI (2018), *S. aureus* com CIM ≤ 2 $\mu\text{g/mL}$ são considerados sensíveis, CIM 4-8 $\mu\text{g/mL}$ são intermediários e CIM ≥ 16 $\mu\text{g/mL}$ são resistentes para o antimicrobiano. Isolados hVISA (*Heterogeneous Vancomycin-Intermediate S. aureus* - hVISA) são definidas como isolados resistentes inseridos em uma população majoritariamente sensível à vancomicina. Tem sido proposto que isolados hVISA seriam microrganismos precursores dos VISA. A prevalência de hVISA é variável ao redor do mundo podendo chegar a 50% dos isolados, o que gera importante impacto clínico (CHAUDHARI et al. 2015, WOOTTON et al, 2001).

1.5 EPIDEMIOLOGIA

Do ponto de vista epidemiológico, e de vigilância das infecções hospitalares, *S. aureus* é um patógeno de grande relevância clínica. Dentro da família *Staphylococcaceae*, MRSA são considerados os patógenos multirresistentes de maior importância médica, e um grande problema de saúde na atualidade (KONG et al., 2017). Tais fatos amplificam a gravidade das infecções por ele ocasionadas (WAN et al., 2017).

Embora MRSA seja um dos microrganismos de maior disseminação no ambiente hospitalar (SHANKAR et al., 2017), comparações internacionais indicam que há uma variação considerável na prevalência de infecções por MRSA ao redor do mundo (TÄRNBERG; NILSSON; DOWZICKY, 2016; YANG et al., 2017).

Numa revisão realizada em 2017, Calfee relatou que, embora isolados de *S. aureus* resistentes à meticilina tenham sido descritos pela primeira vez nos anos 60, sua disseminação não ocorreu na mesma proporção dos isolados resistentes à penicilina. Na década de 70, de acordo com O'Toole et al. (1970), apenas 2% das cepas de *S. aureus* hospitalares, isolados em diferentes países, eram de MRSA. O final dos anos 80 e o início dos anos 90, contudo, foi

marcado pela rápida disseminação de MRSA multirresistentes ao redor do mundo, tornando-se endêmicos desde então (FIGUEIREDO; FERREIRA, 2014).

A partir do final da década de 1990, ainda, relatos de infecções por MRSA, entre pessoas sem fatores de risco associados à saúde, começaram a surgir na comunidade. Já nos anos 2000, aproximadamente 60% dos isolados de *S. aureus* coletados de pacientes hospitalizados em serviços de saúde norte-americanos, e brasileiros, eram MRSA. Essa elevação no percentual de cepas resistentes, bem como sua maior participação nos processos infecciosos, parece ser consequência da pressão seletiva, exercida pelo grande uso de agentes antimicrobianos, fatores de virulência do patógeno, aquisição de elementos genéticos móveis e condições fisiológicas do hospedeiro (CDC, 1999).

Em estudo realizado por Sievert et al. (2013) em conjunto com o NHS e CDC, nos Estados Unidos, entre os anos de 2009 - 2010, *S. aureus* foi identificado como o segundo patógeno mais frequente nas infecções relacionadas à assistência à saúde (11,8%) ou seja, infecções da corrente sanguínea associada a cateter central, pneumonias associadas a ventilação mecânica e infecções associadas a procedimentos hospitalares, no período de 2011 a 2014. Taxas de resistência à metilina entre esses isolados variaram de 42 a 57%, de acordo com o local de infecção (WEINER et al., 2016).

Várias fontes de dados sugerem que a incidência global de MRSA está diminuindo em vários países do mundo. Nos EUA, entre 2005 e 2011, o NHSN verificou que a incidência global de infecções invasivas por MRSA diminuiu, de 37,5 para 25,8 por 100.000 pessoas (DANTES et al., 2013). Até 2015, a taxa global de infecção invasiva por MRSA diminuiu ainda mais, para 18,8 por 100.000 pessoas. Embora a epidemiologia de MRSA, hospitalares e comunitários, inicialmente fosse bastante distinta, nos últimos anos passaram a se sobrepor à medida que cepas comunitárias se espalharam em instituições de saúde (CDC, 2015).

Em 2016, o *European Centre for Diseases Prevention and Control* (ECDC) relatou diferenças significativas na proporção de MRSA em isolados de sangue entre países europeus. De maneira geral, a prevalência variou de, aproximadamente, 0%, na Islândia a 64%, na Romênia. Verificou-se ainda uma tendência decrescente da frequência de MRSA na Bélgica, França, Alemanha, Irlanda, Polônia, Portugal e Reino Unido. Estima-se que 171.200 Infecções relacionadas à assistência à saúde (IRAS), sejam atribuíveis a infecções invasivas por MRSA (ECDC, 2017).

Dados de vigilância de países da Ásia do Sul e do Leste e Pacífico Ocidental, publicados pela Organização Mundial da Saúde (*World Health Organization* – WHO),

apontam *S. aureus* como sendo um patógeno significativo em processos infecciosos, com incidência de MRSA variando de 1,0 a 84% (WHO, 2014).

Estudos multicêntricos realizados entre 2010 e 2014, indicam índices de MRSA de 26% a 30% na África, Europa e Oriente Médio, 50% na América do Norte e 55% na América Latina. Da mesma forma, nesses relatos, as taxas globais de MRSA diminuíram significativamente entre 2004 e 2014 (MENDES et al., 2016; TÄRNBERG; NILSSON; DOWZICKY, 2016; WEINER et al., 2016).

Na América Latina, Arias et al. (2017) reportaram as menores taxas de infecção por MRSA na Colômbia e Equador, 22% e 29%, respectivamente, e as maiores na Venezuela, México (57%) e Brasil (62%). No HUL a proporção de MRSA é semelhante à dos demais estudos brasileiros e da América Latina, mas difere significativamente daqueles realizados em outros continentes, especialmente na Ásia (HANAKI et al., 2014; HÖGBERG et al., 2015; YANG et al., 2017).

Até recentemente MRSA era identificado principalmente em serviços de saúde, no entanto na atualidade, isolados de *S. aureus* vêm sendo detectados, também, de infecções comunitárias. Estes novos clones denominados MRSA adquiridos na comunidade (*Community Acquired Methicillin-Resistant S. aureus* - CA-MRSA) têm emergido em vários países (TONG et al., 2015; TORRES et al., 2017).

Nos EUA, um estudo realizado por David e Daum (2010), relatou incidência de infecções por *Healthcare Acquired* - MRSA (HA-MRSA) em 30/100.000 habitantes, enquanto por CA-MRSA foi bem maior, aproximadamente 250 casos/100.000.

Inicialmente, as cepas classificadas como CA-MRSA permaneciam sensíveis à maioria dos antimicrobianos, exceto aos fármacos β -lactâmicos (NAIMI, 2003). Isolados de CA-MRSA eram associados, predominantemente, a infecções de pele e partes moles (*Skin and Soft Tissue Infections* - SSTIs), e ocasionalmente estavam presentes em infecções graves, como pneumonia necrotizante e bacteremia (DAYAN et al., 2016; TONG et al., 2015).

Nos últimos 20 anos, entretanto, ocorreram mudanças importantes na epidemiologia de infecções por MRSA com novos clones emergindo e se espalhando rapidamente entre pessoas, com e sem fatores de risco associados aos cuidados de saúde (CALFEE, 2017).

Apesar do aumento observado nas infecções por CA-MRSA, a exposição aos cuidados de saúde continua a ser um grande risco para o desenvolvimento de infecções invasivas por MRSA. Em 2015, 78% dos casos foram classificados como associados à saúde (incidência

14,8 por 100.000), enquanto 21% foram classificados como associado à comunidade (incidência 3,9 por 100.000)(CDC, 2015).

Isolados de MRSA, além de serem responsáveis por ocasionar ampla variedade de processos infecciosos, apresentam grande potencial de disseminação, seja em ambiente hospitalar ou comunitário. Esse fato faz com que as técnicas de biologia molecular sejam necessárias para o entendimento da diversidade e epidemiologia, local e global, dos isolados de *S. aureus*. Entre as técnicas mais aceitas encontram-se o *Pulsed-Field Gel Electrophoresis* (PFGE), *Multi Locus Sequence Typing* (MLST) e a Tipagem SCCmec Assim, linhagens de MRSA, idênticas ou similares, podem ser definidas de acordo com o resultado de ST associado ao SCCmec(MONACO et al. 2016).

O PFGE, devido ao seu elevado poder discriminatório, vem sendo aplicado para a investigação de surtos desde a década de 90 (WOODFORD, LIVERMORE, 2009). Utilizando-se esse método, os isolados eram nomeadas de acordo com a região geográfica onde o clone foi primariamente detectado, ou a localidade onde estava espalhado mais intensamente. Contudo, por se tratar de um método comparativo, não permite avaliar claramente a propagação internacional de linhagens de MRSA(MONECKE et al., 2011).

A utilização de métodos moleculares combinados torna possível identificar linhagens epidêmicas, bem como determinar a epidemiologia local e global dos MRSA. Assim, a tipagem MLST é um método aplicável universalmente a qualquer isolado, em qualquer laboratório com capacidade para realização de técnicas de biologia molecular. Essa técnica gera a amplificação de genes *housekeeping*. As diferentes sequências, denominadas alelos, inferem um perfil alélico não ambíguo para cada cepa. Modificações em apenas um dos nucleotídeos são suficientes para distinguir entre os perfis(ENRIGHT; SPRATT, 1999; MONACO et al., 2016). Esses números alélicos, denominados genótipos, são classificados como *Sequence Type* (ST), tendo cada clone um ST específico, contudo, trata-se de uma metodologia de difícil realização e custo elevado(FEIL et al., 2004).

Robertson et al.(2004) desenvolveu uma metodologia baseada em *Real-time Polymerase Chain Reaction* (RTq-PCR) que utiliza *Single-Nucleotide Polymorphisms* (SNP) para genotipar os isolados de *S. aureus*. Baseado nos genes *housekeeping* e em suas sequências, geradas pelo MLST (<http://saureus.mlst.net>), o autor, e seus colaboradores, produziram um algoritmo que consegue distinguir os SNP's de cada sequência. Posteriormente, Lilliebridge et al., (2011), descreveu um protocolo, de uma técnica denominada *High Resolution Melting - PCR* (HRM-PCR), para classificar geneticamente os isolados, baseado no princípio de

Robertson. Utilizando a metodologia RTq-PCR “*single-step, close tube*” o autor determina as pequenas variações de nucleotídeos nos genes *housekeeping*. Os resultados das corridas são confrontados com o banco de dados do MLST, gerando perfis de Complexo Clonal (CC) e ST para cada cepa de interesse. Ao utilizar essa técnica foi possível genotipar as amostras clínicas, e correlacionar os resultados obtidos com o banco de dados do MLST, de forma rápida e menos custosa.

Enright et al. (2002) propôs a combinação de dados do ST com o tipo de SCCmec para definir clones de MRSA; um clone sendo definido como um grupo de isolados que possuem o mesmo ST e o mesmo tipo SCCmec. Portanto, atualmente, as nomenclaturas mais aceitas incluem o ST e CC de cada isolado em conjunto com o elemento SCCmec correspondente, permitindo, assim, a avaliação de ancestralidade e comparações globais entre os isolados de *S. aureus* (MONECKE et al., 2011).

A epidemiologia dos isolados de *S. aureus* tem se mostrado diversa ao longo do tempo. Amostras coletadas durante os anos de 1960 a 2004 foram agrupadas em 11 CC's diferentes, sendo os mais prevalentes o CC5, CC8 e CC30 (CHAMBERS; DELEO, 2009). Isolados de *S. aureus* pertencentes ao CC30, segundo McAdam et al. (2012), tiveram grande impacto na saúde humana, nos últimos 60 anos, tendo sido responsável por três pandemias. Outro clone comumente disseminado ao redor do mundo é o CC5. Nesses grupos estão contidos isolados de MRSA com origem hospitalar ou comunitária. Além disso, fatores de virulência e resistência variados, bem como diversos SCCmec, foram associados a esses complexos. Assim como o complexo clonal 5 os isolados contidos no CC8 também são numerosos, e podem estar presentes em cepas CA ou HA-MRSA. O primeiro clone de MRSA descrito, a cepa ST250-MRSA-I “*archaic clone*”, pertence ao CC8, o que sugere ser esse o precursor dos isolados resistentes a meticilina (MONECKE et al., 2011).

O clone arcaico, gradativamente, foi substituído por outros isolados pandêmicos, entre eles o ST 239- SCCmec III, conhecido como clone epidêmico brasileiro (*Brazilian/Hungarian clone*), que se diferencia do CC8 por uma inserção de fragmento pertencente ao CC30, tornando-se, assim, um clone híbrido. Com a elevada diversidade de isolados, clones distintos são encontrados nas diferentes regiões do globo. Os clones mais prevalentes na América do Norte são: ST5-SCCmec II (USA100), ST8-SCCmec IV (USA500), ST36-SCCmec IV (USA200), e ST45-SCCmec IV. Ao analisar o continente Sul Americano, entretanto, os clones ST239 SCCmec III, ST5 e ST1 são prevalentes no Brasil, ST5 SCCmec I na Argentina e Chile além do ST8 SCCmec IV na Colômbia. Em todo o continente Europeu, os clones mais

prevalentes estão inseridos nos complexos ST5 (CC5), ST8 (CC8), e ST22 (CC22). Embora os dados do continente Africano ainda sejam limitados, sabe-se que o ST5, ST239, ST22, ST36, ST612, ST8 e ST1 foram relatados, como os mais frequentes, com diferentes elementos SCCmec. Para o continente Asiático 90% das infecções de origem hospitalar são atribuídas ao clone ST239 SCCmec III. A partir dos anos 90 no Japão, China Coréia e Taiwan o clone ST5 SCCmecII predomina. O clone ST239 SCCmec III também era o prevalente na Oceania, tendo sido substituído pelo ST22 SCCmec IV nos anos 90. Quanto à Nova Zelândia o clone prevalente pertence ao ST1, isolados pertencentes aos CC1, CC30, CC59, e CC101 também foram descritos em hospitais na região do Pacífico (MONACO et al., 2017).

O sequenciamento genômico, técnica *gold standard* para caracterização de cepas, tem sido cada vez mais utilizado nos estudos moleculares. Com ele é possível estudar exatamente a composição genética de um isolado, descobrindo seus fatores de resistência, virulência e pesquisando biomarcadores específicos. Atualmente duas gerações de sequenciadores coexistem, os de primeira geração, ou sequenciadores de Sanger, garantem bons resultados com baixo custo, porém os dados são gerados de forma lenta. Já os de segunda geração, além de gerar dados confiáveis e permitir a possibilidade de sequenciar múltiplos genomas ao mesmo tempo, o fazem em menor tempo do que os de primeira geração, contudo a nova técnica apresenta custo elevado (NURWIDYA, et al. 2018).

Muitos estudos têm evidenciado a crescente dificuldade para o tratamento de pacientes em processo infeccioso ocasionado por *S. aureus* (ABOUALIZADEH et al., 2017; BEAUDOIN et al., 2017; OLUFUNMISO; TOLULOPE; ROGER, 2017). Esse fato parece ser o responsável pelas extensas taxas de mortalidade entre os pacientes infectados por isolados de MRSA, principalmente nas infecções invasivas (ARSHAD et al., 2017; GALAL; YOUSSEF; IBRAHIEM., 2016; MEHL et al., 2017). De acordo com Khan, Wilson e Gould (2018), dados da Organização Mundial de Saúde (*World Health Organization - WHO*) apontam que pacientes com infecções por MRSA apresentam 64% mais chances de óbito do que aqueles com infecções por *S. aureus* não resistentes.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Caracterizar microbiológica e geneticamente isolados clínicos de *S.*

aureus provenientes de sangue e secreção traqueal oriundos de pacientes internados no HUL.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

2.2.1 Avaliar o perfil de sensibilidade aos antimicrobianos.

2.2.2 Identificar a tendência de resistência para os antimicrobianos entre os anos de 2001 à 2015.

2.2.3 Determinar a Concentração Inibitória Mínima (CIM) para vancomicina entre os isolados de *S. aureus* oriundos de cultura de sangue entre os anos de 2011-2015.

2.2.4 Identificar o gene de resistência aos fármacos β -lactâmicos, *mecA*, para isolados de *S. aureus* de sangue e secreção traqueal entre os anos de 2015-2016.

2.2.5 Detectar a presença dos genes de virulência *icaA*, *pvl* e *tsst* para isolados de *S. aureus* de sangue e secreção traqueal entre os anos de 2015-2016.

2.2.6 Determinar a diversidade clonal dos isolados de *S. aureus* em oriundos de sangue e secreção traqueal entre os anos de 2015-2016.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 AMOSTRAS

Trata-se de um estudo retrospectivo, observacional, transversal, que foi realizado em duas etapas. Na primeira foi avaliado o perfil de sensibilidade aos antimicrobianos de 720 amostras de *S. aureus*, provenientes de cultura de sangue, de pacientes do HUL, no período de janeiro de 2001 a dezembro de 2015. Na segunda etapa foram selecionados 105 isolados, vindos de pacientes, internados no HUL, com bacteremia e pneumonia, no período de 2015 a 2016. As amostras foram obtidas de pacientes com diagnóstico infeccioso segundo o manual de Critérios Diagnósticos de Infecções Relacionadas à Assistência à Saúde, disponibilizado pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA – 2017, CDC, 2013), identificadas, utilizando metodologia manual, de acordo com o CLSI 2018, e automatizada utilizando os sistemas Vitek[®]2 (bioMérieux-USA), Phoenix[®] (Becton, Dickinson) e Microscan[®] (Siemens-Califórnia), isoladas e estocadas no banco de bactérias do Laboratório de Microbiologia Clínica do HUL.

3.2 MÉTODOS FENOTÍPICOS

Amostras previamente estocadas foram selecionadas e reativadas em caldo soja tripticaseína (TSB) e isoladas em ágar manitol salgado. Após incubação, por 18 – 24 h em estufa 37°C, suspensões com densidade celular de 0,5 e 2,0 *McFarland* (aproximadamente $1,5 \times 10^8$ e $6,0 \times 10^8$ unidades formadoras de colônia por mL), mensurada com o auxílio de um turbidímetro, foram preparadas.

A determinação do perfil de sensibilidade aos antimicrobianos foi realizada para os seguintes fármacos: cefoxitina (30 µg); eritromicina (15 µg); clindamicina (2 µg); teicoplanina (30 µg); gentamicina (10 µg); amicacina (30 µg); tetraciclina (30 µg); linezolida (30 µg); ciprofloxacina (10 µg); rifampicina (5 µg) e sulfametoxazol + trimetoprima (25 µg). Foi utilizada metodologia de disco difusão e os resultados foram avaliados e interpretados de acordo com o descrito no CLSI, 2018.

A CIM de vancomicina foi determinada com a utilização de tiras *de-test*[®] (bioMérieux-USA). As fitas são impregnadas com vancomicina em concentrações que variam entre 0,16 µg/mL a 256 µg/mL. Após incubação por 18-24h a 37°C, o valor da CIM foi avaliado seguindo as recomendações do fabricante e CLSI, 2018.

3.3 MÉTODOS GENOTÍPICOS

A extração do DNA total foi realizada por técnica de lise enzimática conforme descrito por Sambrook, Fritsch e Maniatis (1990). A genotipagem das cepas, identificação dos CC e ST foi feita por RTq-PCR conforme descrito por Lilliebridge et al. (2011).

Os isolados pertencentes aos anos de 2015 -2016 foram submetidas a testes de RTq-PCR para amplificação de seis fragmentos internos, *housekeeping* (*arcC*, *aroE*, *gmK*, *pta294*, *tpi36*, and *tpi241*). Os ST e CC de cada amostra foram determinados de acordo com o banco de dados do MLST (<http://saureus.mlst.net>) e metodologia proposta por Lilliebridge et al. (2011).

A detecção dos genes de virulência: *lukS-PV*; *lukF-PV*; *tsst*; coagulase (*coa*) e biofilme (*icaA*) foi realizada como descrito por Campbell et al. (2008). A avaliação da resistência, para os fármacos β-lactâmicos, foi avaliada de acordo com a presença do gene *mecA*. Além da

presença do gene *mecA* Os elementos *SCCmec* foram tipados de acordo com metodologia proposta por Milheiriço, Oliveira e Lencastre(2007).

Uma amostra de OS-MRSA foi selecionada para sequenciamentogenômico total de segunda geração, utilizando a plataforma Miseq[®] (Illumina) conforme descrito por Deurenberget al. 2017.

4LOCAIS DE REALIZAÇÃO DO ESTUDO

Os testes descritos nesse trabalho foram realizados no setor de microbiologia do laboratório de análises clínicas do Hospital Universitário de Londrina e no laboratório de biologia molecular de microrganismos (NIP5) localizado na Universidade Estadual de Londrina (UEL), Centro de Ciências Biológicas (CCB). O HUL é um hospital escola terciário e um centro de referência para cuidados de saúde no norte do Paraná. Utilizando o Sistema Único de Saúde, trata-se de um hospital exclusivamente de atendimento público. Conta com 313 leitos que atende pacientes oriundos de todo o Paraná e região.

5ASPECTOS ÉTICOS

O estudo foi submetido ao comitê de ética em pesquisa envolvendo seres humanos da Universidade Estadual de Londrina. CEP/UEL - CAAE: 78657317.0.0000.5231.

6. RESULTADOS

Na primeira etapa o perfil de sensibilidade para 720 amostras de *S. aureus* oriundos de corrente sanguínea, de pacientes internados no HUL em um período de quinze anos, foi avaliado. Verificou-se que a frequência média de resistência para oxacilina (MRSA) foi de 43,74%. Os antimicrobianos que apresentaram os maiores índices de resistência foram penicilina, ciprofloxacina, eritromicina, oxacilina e clindamicina. Por outro lado a frequência de resistência foi menor para gentamicina, rifampicina, sulfametoxazol-trimetoprima e tetraciclina, com valores de sensibilidade acima dos 90%, ao final do período analisado. (Artigo 1).

Na segunda etapa foram caracterizados, fenotípica e genotipicamente, 105 isolados de *S. aureus* obtidos de hemocultura (50) e secreção traqueal (55) no período de 2015-2016

como mostrado no apêndice A. Destes 71/105 (67,6%) foram classificados como MRSA, pelo método fenotípico, e 34/105 (32,4%) como MSSA.

Após, foram selecionados 74 isolados para detecção dos genes de virulência *icaA*, *tsst* e *pvl*, apêndice B. Verificou-se uma elevada prevalência do operon (*icaA*)_{65/74} (87,8%), seguido pelo operon *pvl*, 12/74 (16,2%) e *tsst*, 11/74 (14,8%).

Das amostras submetidas à pesquisa do gene *mecA*, 86/105 (81,9%) foram positivas sendo que, 65/86 (75,58%) foram resistentes a oxacilina (cefotaxima), consideradas verdadeiramente MRSA. Contudo, 21/86 (25,30%) se mostraram sensíveis ao teste fenotípico, sendo classificadas como isolados OS-MRSA. Por outro lado, 5/19 (26,31%) amostras, resistentes para oxacilina (cefotaxima), não apresentaram o gene *mecA* (tabela 1).

Tabela 1 - Relação entre PCR para gene *mecA* e sensibilidade a oxacilina, por método fenotípico, para 105 isolados de *S. aureus*.

PCR	Oxacilina	Oxacilina	Total
	Resistente	Sensível	
<i>gene mecA</i> (+)	65	21	86
<i>gene mecA</i> (-)	5	14	19
Total	70	35	105

OXA R: oxacilina resistente; OXA S: oxacilina sensível; *mecA* (+); *mecA* positivo; *mecA* (-): *mecA* negativo.

Das amostras MRSA, 60/70 (85,71%) eram tipáveis para os elementos *SCCmec*, sendo que 37/60 (61,67%) pertenciam ao *SCCmec* tipo II, 14/60 (23,33%) ao tipo IV, 8/60 (13,33%) ao tipo I e 1/60 (1,67%) do tipo 3. Entre 21 OS-MRSA, no entanto, nenhuma foi tipável.

Verificou-se ainda, a presença de 30 *Sequence Type* (ST) e 18 Complexos Clonais (CC), sendo que os mais frequentes foram ST63 9/74 (12,16%), ST6 6/74 (8,1%) e ST5, ST306 e ST835, 5/73 (6,8%), cada um. Quanto aos CC, os mais prevalentes foram CC5 com 37/74 (50%), CC7 e CC445 com 5/74 (6,8%).

Os resultados obtidos neste trabalho foram apresentados e discutidos em quatro artigos científicos intitulados:

Artigo 1. Bacteremia causada por *Staphylococcus aureus*: Uma análise de quinze anos da sensibilidade aos antimicrobianos em um hospital terciário do Brasil, enviado para a Revista de Epidemiologia e Controle de Infecção, com qualificação Qualis B4 (Quadriênio 2013-2016 - Medicina II). Artigo aceito para publicação.

Artigo 2. *S. aureus* resistente e meticilina, SCC*mec* tipo II, disseminado em um hospital terciário do sul do Brasil, enviado para a Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo, com qualificação quails B2 (Quadriênio 2013-2016 - Medicina II). Artigo em avaliação.

Artigo 3. Sepsis fatal causada por *mecA*-positivo oxacilina sensível *Staphylococcus aureus*: primeiro relato em um hospital terciário do sul do Brasil. Artigo em edição. Será submetido para a revista Journal of Infection and Chemotherapy, com qualificação quails B2 (Quadriênio 2013-2016 - Medicina II).

Artigo 4. Genoma completo de *Staphylococcus aureus*, OS-MRSA, *Sequence Type* 1, Complexo Clonal 1, SCC*mec* IV, isolado de um paciente com choque séptico em um hospital terciário do sul do Brasil. Artigo em edição. Será submetido para a revista Genome Announcements, com qualificação quails B4 (Quadriênio 2013-2016 - Medicina II).

6.1 ARTIGO 1

Bacteremia causada por *Staphylococcus aureus*: Uma análise de quinze anos da sensibilidade aos antimicrobianos em um hospital terciário do Brasil.

Felipe Crepaldi Duarte¹, Tiago Danelli¹, Maria Alice Galvão Ribeiro², Luis Felipe Perugini³, Eliana Carolina Vespero⁴, Floristher Elaine Carrara-Marroni⁴, Marsileni Pelisson⁴, Lucy Megumi Yamauchi⁵, Sueli Fumie Yamada-Ogatta⁵, Marcia Regina Eches Perugini^{4*}

¹Programa de Mestrado em Fisiopatologia Clínica e Laboratorial. Departamento de Patologia, Análises Clínicas e Toxicológicas, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Estadual de Londrina.

²Programa de Mestrado em Microbiologia. Departamento de Microbiologia, Centro de Ciências Biológicas, Universidade Estadual de Londrina.

³Bolsista de Iniciação Científica da Fundação Araucária de Apoio ao Desenvolvimento Científico e Tecnológico. Curso de Farmácia. Centro de Ciências da Saúde. Universidade Estadual de Londrina.

⁴Laboratório de Microbiologia Clínica do Hospital Universitário de Londrina. Docente do Departamento de Patologia, Análises Clínicas e Toxicológicas, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Estadual de Londrina.

⁵Laboratório de Biologia Molecular de Microrganismos. Departamento de Microbiologia, Centro de Ciências Biológicas, Universidade Estadual de Londrina.

*Corresponding author: Marcia Regina Eches Perugini. Departamento de Patologia, Análises Clínicas e Toxicológicas. Avenida Robert Koch, 60. Vila Operária. CEP 86038-350. Londrina, Paraná, Brazil. Phone: +55 43 3371-2346. E-mail: marciaperugini@hotmail.com.

Bacteremia causada por *Staphylococcus aureus*: Uma análise de quinze anos da sensibilidade aos antimicrobianos em um hospital terciário do Brasil.

RESUMO

Justificativa e Objetivo: Infecções da corrente sanguínea por *Staphylococcus aureus* constituem uma das principais causas de morbidade e mortalidade em todo mundo. Devido à elevada prevalência de resistência aos antimicrobianos, o tratamento de infecções ocasionadas por *S. aureus* tornou-se complexo. Compreender a epidemiologia e os padrões de resistência deste microrganismo é um ponto crítico para a prescrição empírica adequada de antimicrobianos. Desta maneira, este estudo teve por objetivo avaliar a evolução de resistência antimicrobiana de *S. aureus* num período de quinze anos. **Metodologia:** Foram analisados os testes de sensibilidade aos antimicrobianos de 720 *S. aureus* isolados de hemoculturas de um hospital terciário do sul do Brasil. Os dados foram obtidos do Sistema de Informação AGTA *Healthcare*, módulo LABHOS[®]. **Resultados:** A frequência média de *S. aureus* resistentes a metilina foi de 43,74%. Com exceção de penicilina, ocorreu variação significativa da resistência para todos os antimicrobianos no período avaliado ($p < 0,001$). Ciprofloxacina, eritromicina e clindamicina apresentaram os maiores índices de resistência com tendência de aumento. Surpreendentemente, gentamicina e sulfametoxazol-trimetoprima apresentaram queda significativa nos percentuais de resistência. Analisando-se a vancomicina do ano 2011 a 2015 pode-se evidenciar um aumento das concentrações inibitórias mínimas. **Conclusão:** Embora a resistência aos antimicrobianos tenha aumentado nos quinze anos para a maioria dos fármacos, para sulfametoxazol-trimetoprima e gentamicina ocorreu redução significativa, indicando uma possível alteração clonal. Este estudo evidenciou, ainda, a emergência do fenótipo *S. aureus* intermediário a vancomicina.

Descritores: *Staphylococcus aureus*, Agentes Anti-infecciosos, Bacteremia

Bacteremia caused by *Staphylococcus aureus*: a fifteen year analysis of antimicrobial susceptibility at a tertiary-care hospital in Brazil.

ABSTRACT

Background and Objectives: Bloodstream infection caused by *Staphylococcus aureus* are one of the leading causes of morbidity and mortality worldwide. Due to the high prevalence of antimicrobial resistance, the treatment of infections caused by *S. aureus* has become complex. Understanding the epidemiology and resistance patterns of this microorganism is a critical point for an adequate empirical prescription of antimicrobials. Thus, this study aimed to evaluate the evolution of antimicrobial resistance of *S. aureus* over a period of fifteen years. **Methodology:** Antimicrobial sensitivity tests of 720 *S. aureus* isolated from blood cultures of a tertiary hospital in southern Brazil were analyzed. Data were obtained from the AGTA Healthcare information system, LABHOS® module. **Results:** The mean frequency of methicillin resistant *S. aureus* was 43.74%. Except for penicillin, statistical variation was seen for all evaluated antimicrobial ($p < 0.001$). Ciprofloxacin, erythromycin and clindamycin had the highest rates of resistance with a tendency to increase. Surprisingly, gentamicin and sulfamethoxazole-trimethoprim presented the minors percentages of resistance, with decrease tendency. The analysis of vancomycin in the year 2011 to 2015 may show an increase in the minimum inhibitory concentrations. **Conclusion:** Although antimicrobial resistance increased in the fifteen years for most antimicrobials, for sulfamethoxazole-trimethoprim and gentamicin there was a significant reduction, indicating a possible clonal change. This study also demonstrated an emergence of the intermediate phenotype of *S. aureus* to vancomycin.

Descriptors: *Staphylococcus aureus*, Anti-Infective Agents, Bacteremia

INTRODUÇÃO

Staphylococcus aureus é um patógeno eficiente, responsável por ocasionar ampla variedade e síndromes clínicas, incluindo desde infecções localizadas na pele e partes moles até doenças invasivas como bacteremia, endocardite, pneumonia e osteomielite (WEINER et al., 2016). Além da virulência, este patógeno é notório pela rápida evolução de resistência aos agentes antimicrobianos (HO et al., 2016).

S. aureus resistentes à meticilina (MRSA - *Methicillin Resistant S. aureus*) surgiram nos anos 60 e se disseminaram nos anos 80. Nos últimos quinze anos, MRSA tem se estabelecido como um dos patógenos mais frequentes em várias partes do mundo, além de ter se tornado um dos maiores problemas no ambiente hospitalar na atualidade. Bacteremias por estes microrganismos estão frequentemente associadas a um pior prognóstico, incluindo mortalidade em até 30 dias ao redor de 20 a 40% (HÖGBERG et al., 2014; WEINER et al., 2016).

O tratamento de paciente com infecções por MRSA constitui um problema devido ao número restrito de antimicrobianos disponíveis. Conhecer os padrões de resistência de *S. aureus* em bacteremias é fundamental para adequada prescrição empírica de antimicrobianos e na prevenção de eventos que possam culminar na resistência bacteriana (ZBOROMYRSKA et al., 2016).

As altas taxas de morbidade, mortalidade, custos e a elevada frequência de *S. aureus* multirresistentes associados a infecções evidenciam a necessidade de ênfase à vigilância local, regional e global dos padrões de sensibilidade aos antimicrobianos (SADER et al., 2015; WOODFORD; TURTON; LIVERMORE, 2011). Assim, considerando que *S. aureus* é um dos agentes etiológicos mais frequentemente identificados em infecções da corrente sanguínea, este estudo tem como objetivo avaliar a sensibilidade aos antimicrobianos e sua evolução em um período de quinze anos.

MATERIAIS E MÉTODOS

Trata-se de um estudo descritivo retrospectivo, no qual foi avaliada a frequência de resistência aos antimicrobianos, apresentada por *S. aureus*, isolados de hemoculturas realizadas em um hospital terciário da região sul do Brasil no período de 2001 a 2015. Para

tal, utilizou-se o banco de dados do Sistema de Informação AGTA *Healthcare*, módulo LABHOS[®].

Os isolados de *S. aureus* foram obtidos a partir de hemoculturas realizadas em Sistemas Automatizados BacT/ALERT[®] 3D (bioMérieux Durham, NC, USA) ou BD BACTEC[™] FX Blood Culture System (Becton-Dickinson, Sparks, MD, USA).

A identificação dos microrganismos e a determinação da sensibilidade aos antimicrobianos, *in vitro*, foi realizada utilizando-se os sistemas MicroScan[®] (Siemens Healthcare Diagnostic, Deerfield, IL.), Phoenix[®] (AB Biodisk, Solna, Sweden) ou VITEK2[®] (bioMérieux- Durham, NC, USA), conforme o período avaliado. Para vancomicina, entretanto, a concentração inibitória mínima (CIM) foi determinada por microdiluição, de acordo com padronização do *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI).

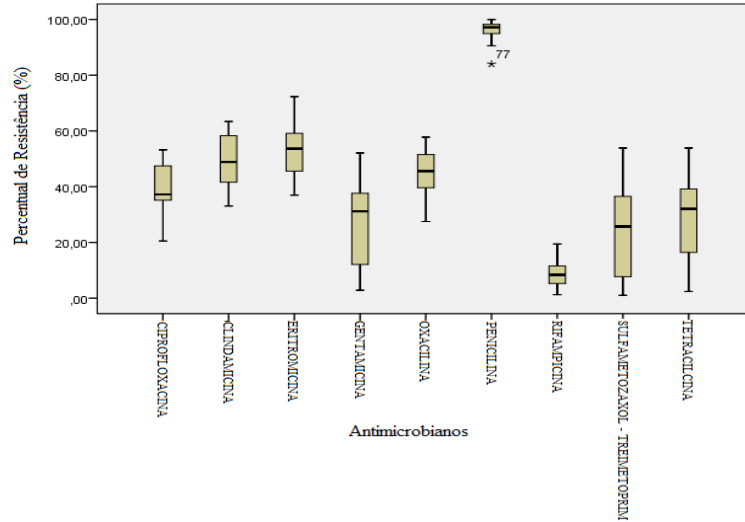
Foi feita análise estatística dos dados obtidos utilizando o programa IBM SPSS 20.0. (IBM Corp. Released 2011. IBM SPSS Statistics for Windows, Version 20.0. Armonk, NY: IBM Corp). Foram feitos testes t *Student* e *Mann Witney*, quando apropriado. Os resultados foram expressos como média e desvio padrão, ou mediana e intervalos interquartis. Curvas de tendência para os antimicrobianos analisados foram construídas. Foram tidos como resultados significativamente estatísticos aqueles que apresentaram valor de $p \leq 0,05$, com intervalo de confiança fixado em 95%.

Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa envolvendo Seres Humanos da Universidade Estadual de Londrina sob o CAAE número 0015.0.268.000-11.

RESULTADOS

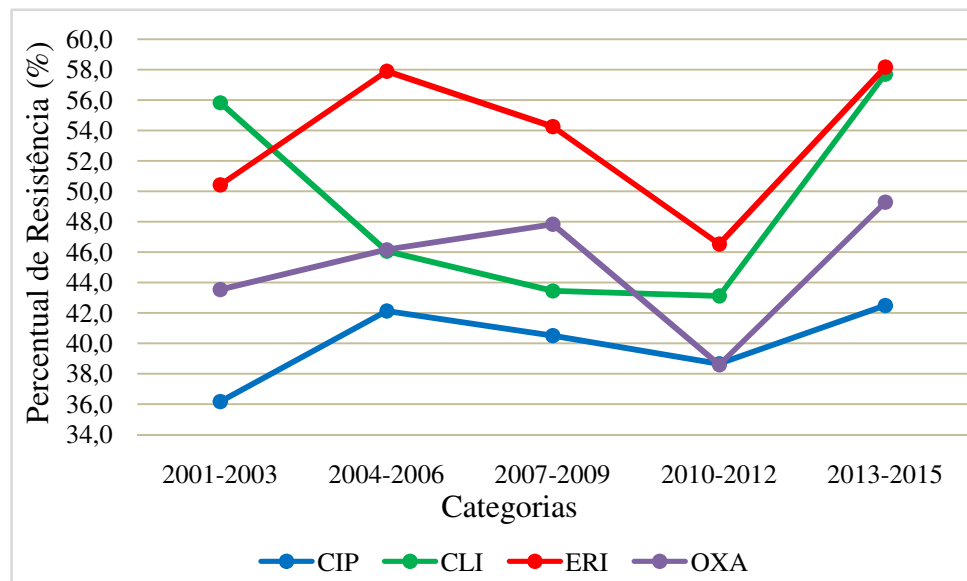
Foram avaliadas 720 amostras de *S. aureus* isolados da corrente sanguínea durante o período avaliado. Os percentuais médios de resistência e as variações durante o período são mostrados na figura 1. Maiores índices de resistência bacteriana foram apresentados detectados para os antimicrobianos: penicilina (96,48%), ciprofloxacina (51,14%), eritromicina (44,99%), oxacilina (43,74%) e clindamicina (39,85%).

Figura 1. Variação do percentual de resistência entre *S. aureus* (n=720) isolados de hemoculturas realizadas no Hospital Universitário de Londrina entre os anos 2001 e 2015.



Para os antimicrobianos ciprofloxacina, eritromicina, clindamicina e oxacilina observou-se tendência de elevação no perfil de resistência ao final do período analisado, como pode ser observado na figura 2. Com exceção de penicilina, ocorreu variação significativa da resistência para todos os antimicrobianos avaliados ($p < 0,001$).

Figura 2. Curva de tendência para os antimicrobianos com maior índice de resistência bacteriana durante o período avaliado.

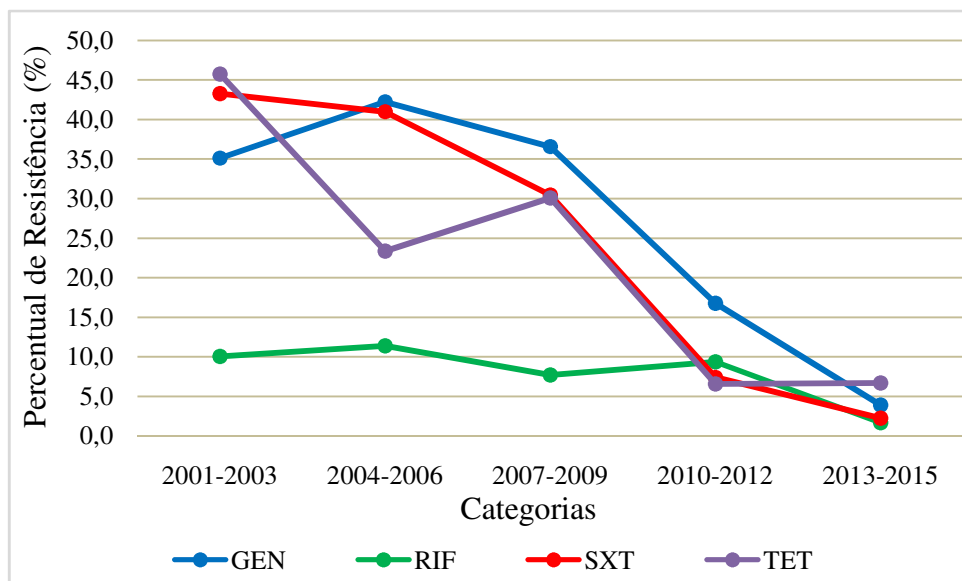


Legenda: CIP: ciprofloxacina, CLI: clindamicina, ERI: eritromicina, OXA: oxacilina. Os dados foram agrupados em 5 categorias: Cat1 compreendeu a média de resistência do período entre 2001 e 2003, Cat2, 2004 a 2006, Cat3, 2007 a 2009, Cat4, 2010 a 2012 e Cat5, 2013 a 2015

Ao contrário, para gentamicina, rifampicina, sulfametoxazol-trimetoprim e tetraciclina verificou-se tendência de queda, significativa, na resistência durante o período analisado ($p \leq 0,01$), como mostrado na figura 3.

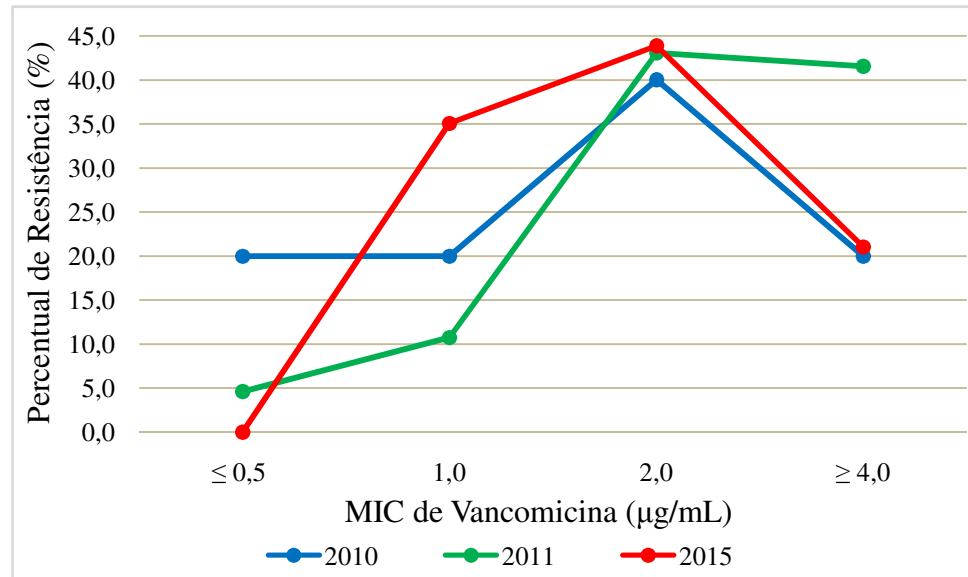
Para vancomicina foram avaliadas 174 amostras de *S. aureus* entre 2010 e 2015. Verificou-se que as Concentrações Inibitórias Mínimas (CIM) variaram de 0,5 a 8,0 $\mu\text{g/mL}$, sendo que 49 (29%) apresentaram $\text{CIM} \geq 4 \mu\text{g/mL}$ e foram categorizadas como intermediárias. Nenhum isolado apresentou resistência à vancomicina. Analisando-se ano a ano pode-se evidenciar um aumento das CIM para vancomicina ao longo do período, como pode ser observado na figura 4.

Figura 3. Curva de tendência de resistência para os antimicrobianos com queda nos percentuais de resistência ao longo dos períodos analisados.



Legenda: GEN: gentamicina, RIF: rifampicina, SXT: sulfametoxazol-trimetoprim, TET: tetraciclina.

Figura 4. Variação das Concentrações Inibitórias Mínimas (MIC) de vancomicina obtidas por microdiluição para 174 amostras de *S. aureus*, isolados de sangue, no período de 2010 a 2015.



DISCUSSÃO

No presente estudo evidenciamos taxas elevadas de resistência aos antimicrobianos, com tendência de aumento ao longo de quinze anos, para os fármacos betalactâmicos, fluoroquinolonas, macrolídeos, lincosaminas e glicopeptídeos. Por outro lado, índices baixos de resistência, com tendência de redução, foram observados para gentamicina, sulfametoxazol-trimetoprim, rifampicina e tetraciclina.

S. aureus representa um paradigma em termos de aquisição de mecanismos de resistência aos antimicrobianos. Atualmente, as cepas MRSA são um dos patógenos multirresistentes mais comuns em hospitais no mundo todo. Mostram-se como cepas de tratamento cada vez mais difícil, representando grande preocupação para os clínicos (HÖGBERG et al., 2014; WEINER et al., 2016).

Comparações entre estudos indicam que há uma variação considerável na prevalência de infecções por MRSA ao redor do mundo, especialmente para bacteremias (TÄRNBERG; NILSSON; DOWZICKY, 2016; YANG et al., 2017).

Em 2015, o Sistema Europeu de Vigilância de Resistência Antimicrobiana (ECDC) relatou diferenças significativas na proporção de MRSA em isolados de sangue entre países europeus. De maneira geral, a prevalência variou de 0%, na Islândia, a 57,2%, na Romênia.

Verificou-se ainda uma tendência decrescente da frequência de MRSA na Bélgica, França, Alemanha, Irlanda, Polônia, Portugal e Reino Unido (ECDC, 2017).

Publicações e dados de vigilância de países da Ásia do Sul, Leste e Pacífico Ocidental também apontam os *S. aureus* como um patógeno significativo, com incidência de MRSA variando de 1,0 a 84% (WHO, 2014).

Estudos multicêntricos realizados entre 2010 e 2014, sugerem índices de MRSA de 26% a 30% na África, Europa e Oriente Médio, 50% na América do Norte e 55% na América Latina. Da mesma forma, nestes relatos, as taxas globais de MRSA diminuíram significativamente entre os anos de 2004 e 2014 (MENDES et al., 2016; TÄRNBERG; NILSSON; DOWZICKY, 2016; WEINER et al., 2016)

No Brasil têm sido relatadas frequências de 34,1% a 46% (CABOCLO et al., 2013; FERREIRA et al., 2009; MARRA et al., 2011) Nossos dados (43,7%) são semelhantes aos dos demais estudos brasileiros e da América Latina, mas diferem significativamente daqueles realizados em outros continentes, especialmente na Ásia (HANAKI et al., 2014; HÖGBERG et al., 2014; YANG et al., 2017).

O aumento na frequência de MRSA, em hospitais, constitui um sério problema clínico, uma vez que, além da resistência aos β lactâmicos, são resistentes de forma variável a outros antimicrobianos, incluindo fluoroquinolonas, macrolídeos e lincosamidas.

Mendes e colaboradores (2016) avaliaram 3.560 isolados de *S. aureus* coletados em 66 centros médicos de 33 países, com exceção dos EUA, no ano 2014. Comparando-se os isolados de MRSA e MSSA verificou-se resistência de 64,2% e 11,7% para eritromicina, 37,5% e 2,1% para clindamicina, 71,4% a 4% para levofloxacina, 25,8% e 4% para gentamicina, respectivamente. Para sulfametoxazol-trimetoprim e tetraciclina, no entanto, os índices de resistência foram baixos, 4% e 0,3%, respectivamente (MENDES et al., 2016). Nossos dados apontam percentuais de resistência superiores aos verificados neste estudo.

Em um estudo global realizado por Hoban e colaboradores (2015) a resistência a levofloxacina aumentou de 32% em 2004 para 70% em 2012 na Ásia, assim como na Europa, de 28,6% em 2004 para 33,6% em 2013. Ao contrário, na América do Norte, verificou-se redução de 47,0% para 37,6% (HOBAN et al., 2015).

Em uma avaliação realizada anteriormente pelo nosso grupo com isolados de *S. aureus* oriundos de diversos materiais clínicos, verificou-se prevalência média de resistência para eritromicina, clindamicina e ciprofloxacina de 49,4%, 41,8% e de 36,5%, respectivamente, não tendo sido verificada tendência de aumento, em um período de dez anos (PERIGINI et al.,

2015). Ao contrário, no estudo atual, no qual foram avaliados apenas isolados de hemoculturas, os percentuais de resistência foram maiores para estes antimicrobianos e a tendência de aumento foi significativa.

Diversos autores têm relatados índices de resistência baixos para sulfametoxazol-trimetoprim e gentamicina (KEJELA; BACHA, 2013; MENDES et al., 2016). Da mesma forma, no nosso estudo, desde 2004 as taxas de resistência têm diminuído gradativamente. Esta mudança provavelmente reflete uma substituição clonal, como tem sido verificado em outros hospitais brasileiros (CABOCLO et al., 2013; CAIAFFA-FILHO et al., 2013; PEDINOTTI ZUMA et al., 2017).

Glicopeptídeos são, ainda, os agentes antimicrobianos considerados como a opção terapêutica parenteral para tratamento de infecções por MRSA. A intensa pressão seletiva resultou na emergência de *S. aureus* com sensibilidade reduzida à vancomicina (RVS - *Reduced Vancomycin Susceptibility*) (CHAMBERS; DELEO, 2009; HOWDEN et al., 2010). A elevada frequência de MRSA multirresistentes associado ao aumento de cepas com sensibilidade diminuída à vancomicina têm complicado ainda mais o manejo de infecções estafilocócicas graves (DE KRAKER; DAVEY; GRUNDMANN, 2011).

A prevalência deste fenótipo varia amplamente de acordo com hospitais, regiões geográficas e populações de pacientes avaliados. Índices de 0 a 65% têm sido reportados em vários estudos (HANAKI et al., 2014; HOWDEN et al., 2010). Entre as possíveis razões para esta divergência estão a baixa frequência de células com sensibilidade diminuída e a variedade de metodologias para detecção de cepas hVISA (*heterogeneous Vancomycin Intermediate S. aureus*). O fenômeno conhecido como “MIC Creep”, aumento gradativo da MIC, também foi observado no nosso estudo e constitui outra ameaça que pode levar à falha terapêutica (HOWDEN et al., 2010).

CONCLUSÕES

O presente estudo mostra que a frequência de MRSA é elevada em isolados da corrente sanguínea no nosso hospital. Mostra, também, que a resistência tem aumentado nos quinze anos para a maioria dos antimicrobianos utilizados, com exceção de sulfametoxazol-trimetoprim e gentamicina. Este estudo evidenciou, ainda, a emergência do fenótipo VISA, além de atestar que resistência para linezolida não emergiu nesse hospital.

Considerando que a vancomicina é o fármaco de escolha para terapia empírica de infecções graves por microrganismos gram-positivos, a detecção de subpopulações de *S. aureus* com resistência intermediária à vancomicina, bem como o perfil de sensibilidade aos antimicrobianos apresentado pela cepa, evidencia a necessidade de técnicas alternativas para detecção dos diferentes mecanismos de resistência com o intuito de adequar a terapia.

AGRADECIMENTOS

Agradecemos aos órgãos de fomento, Fundação Araucária, CAPES e CNPQ pelo auxílio financeiro a pesquisa. Agradecemos aos docentes e discentes envolvidos pela ajuda na coleta, análise dos dados e escrita do artigo.

CONFLITOS DE INTERESSE

Declaramos que não há conflitos de interesse em relação à publicação deste trabalho.

LIMITAÇÕES DO ESTUDO

Este estudo foi conduzido com isolados de corrente sanguínea. Para uma melhor visualização da mudança global no perfil de sensibilidade aos antimicrobianos seria preciso avaliar isolados oriundas de outros sítios, como infecções de pele e partes moles, pneumonia, líquidos estéreis entre outros.

REFERÊNCIAS

- CABOCCLO, R. M. F. et al. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in Rio de Janeiro hospitals: Dissemination of the USA400/ST1 and USA800/ST5 SCCmec type IV and USA100/ST5 SCCmec type II lineages in a public institution and polyclonal presence in a private one. **American Journal of Infection Control**, v. 41, n. 3, p. e21–e26, mar. 2013.
- CAIAFFA-FILHO, H. H. et al. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* carrying SCCmec type II was more frequent than the Brazilian endemic clone as a cause of nosocomial bacteremia. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v. 76, n. 4, p. 518–520, ago. 2013.
- CHAMBERS, H. F.; DELEO, F. R. Waves of resistance: *Staphylococcus aureus* in the antibiotic era. **Nature Reviews Microbiology**, v. 7, n. 9, p. 629–641, set. 2009.
- DE KRAKER, M. E. A.; DAVEY, P. G.; GRUNDMANN, H. Mortality and Hospital Stay Associated with Resistant *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* Bacteremia: Estimating the Burden of Antibiotic Resistance in Europe. **PLoS Medicine**, v. 8, n. 10, p. e1001104, 11 out. 2011.
- ECDC - European Centre for Disease Prevention and Control. Antimicrobial resistance surveillance in Europe 2015. Annual Report of the European Antimicrobial Resistance Surveillance Network (EARS-Net). Stockholm: ECDC; 2017 1-120 p. ISSN 2363-2666 ISBN 978-92-9498-029-8 doi:10.2900/6928 Catalogue number TQ-AM-17-001-EN-N
- FERREIRA, W. A. et al. Prevalência de *Staphylococcus aureus* Meticilina resistente (MRSA) em pacientes atendidos em ambulatório de dermatologia geral em Manaus- Amazonas. **Revista de Patologia Tropical**, v. 38, n. 2, p. 83–92, 2009.
- HANAKI, H. et al. Antibiotic susceptibility survey of blood-borne MRSA isolates in Japan from 2008 through 2011. **Journal of Infection and Chemotherapy**, v. 20, n. 9, p. 527–534, set. 2014.
- HO, C.-M. et al. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates with SCCmec type V and spa types t437 or t1081 associated to discordant susceptibility results between oxacillin and cefoxitin, Central Taiwan. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v. 86, n. 4, p. 405–411, dez. 2016.
- HOBAN, D. et al. Activity of ceftaroline and comparators against pathogens isolated from skin and soft tissue infections in Latin America – results of AWARE surveillance 2012. **The Brazilian Journal of Infectious Diseases**, v. 19, n. 6, p. 596–603, nov. 2015.
- HÖGBERG, L. D. et al. **Annual epidemiological report 2014. Antimicrobial resistance and healthcare-associated infections**. [s.l.: s.n.].
- HOWDEN, B. P. et al. Reduced Vancomycin Susceptibility in *Staphylococcus aureus*, Including Vancomycin-Intermediate and Heterogeneous Vancomycin-Intermediate Strains: Resistance Mechanisms, Laboratory Detection, and Clinical Implications. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 23, n. 1, p. 99–139, 1 jan. 2010.

- KEJELA, T.; BACHA, K. Prevalence and antibiotic susceptibility pattern of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) among primary school children and prisoners in Jimma Town, Southwest Ethiopia. **Annals of clinical microbiology and antimicrobials**, v. 12, n. 1, p. 11, 4 jun. 2013.
- MARRA, A. R. et al. Nosocomial Bloodstream Infections in Brazilian Hospitals: Analysis of 2,563 Cases from a Prospective Nationwide Surveillance Study. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 49, n. 5, p. 1866–1871, 1 maio 2011.
- MENDES, R. E. et al. Genotypic Characterization of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Recovered at Baseline from Phase 3 Pneumonia Clinical Trials for Ceftobiprole. **Microbial Drug Resistance**, v. 22, n. 1, p. 53–58, jan. 2016.
- PEDINOTTI ZUMA, A. V. et al. Molecular characterization of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolated from blood in Rio de Janeiro displaying susceptibility profiles to non-beta-lactam antibiotics. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 48, n. 2, p. 237–241, 2017.
- PERUGINI, M.R.E. et al. Tendência de resistência entre isolados clínicos de *Staphylococcus aureus* em um hospital universitário do norte do Paraná de 2002 a 2011 Trends in antimicrobial resistance among clinical isolates of *Staphylococcus aureus* in a university hospital of the no. p. 275–282, 2015.
- SADER, H. S. et al. Tigecycline activity tested against carbapenem-resistant Enterobacteriaceae from 18 European nations: results from the SENTRY surveillance program (2010–2013). **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v. 83, n. 2, p. 183–186, out. 2015.
- TÄRNBERG, M.; NILSSON, L. E.; DOWZICKY, M. J. Antimicrobial activity against a global collection of skin and skin structure pathogens: results from the Tigecycline Evaluation and Surveillance Trial (T.E.S.T.), 2010–2014. **International Journal of Infectious Diseases**, v. 49, p. 141–148, ago. 2016.
- WEINER, L. M. et al. Antimicrobial-Resistant Pathogens Associated With Healthcare-Associated Infections: Summary of Data Reported to the National Healthcare Safety Network at the Centers for Disease Control and Prevention, 2011–2014. **Infection Control & Hospital Epidemiology**, v. 37, n. 11, p. 1288–1301, 30 nov. 2016.
- WHO - World Health Organization. Antimicrobial resistance: global report on surveillance WHO Publ. 2014; All rights reserved. Publications of the World Health Organization are available on the WHO website (www.who.int) or can be purchased from WHO Press, World Health Organization, 20 Avenue Appia, 1211 Geneva 27, Switzerland (tel.: +41 22 791 3264; fax: +41 22 791 4857; e-mail: bookorders@who.int).
- WOODFORD, N.; TURTON, J. F.; LIVERMORE, D. M. Multiresistant Gram-negative bacteria: the role of high-risk clones in the dissemination of antibiotic resistance. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 35, n. 5, p. 736–755, set. 2011.

YANG, Q. et al. Antimicrobial activity among gram-positive and gram-negative organisms collected from the Asia-Pacific region as part of the Tigecycline Evaluation and Surveillance Trial: Comparison of 2015 results with previous years. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, ago. 2017.

ZBOROMYRSKA, Y. et al. Rapid Diagnosis of Staphylococcal Catheter-Related Bacteraemia in Direct Blood Samples by Real-Time PCR. **PLOS ONE**, v. 11, n. 8, p. e0161684, 29 ago. 2016.

6.2 ARTIGO 2

S. aureus resistente e meticilina, SCC*mect* tipo II, disseminado em um hospital terciário do sul do Brasil

Felipe Crepaldi Duarte¹, Eliandro Reis Tavares^{3,4}, Tiago Danelli¹, Maria Alice Galvão Ribeiro², Lucy Megumi Yamauchi^{2,4}, Sueli Fumie Yamada-Ogatta^{1,2,4,*}, Marcia Regina Eches Perugini^{1,5,*}

¹Programa de Mestrado em Fisiopatologia Clínica e Laboratorial. Departamento de Patologia, Análises Clínicas e Toxicológicas, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Estadual de Londrina.

²Programa de Pós-graduação em Microbiologia. Departamento de Microbiologia. Universidade Estadual de Londrina.

³Bolsista do Programa Nacional de Pós-Doutorado do Programa de Pós-graduação em Microbiologia. Departamento de Microbiologia, Centro de Ciências Biológicas, Universidade Estadual de Londrina.

⁴Laboratório de Biologia Molecular de Microrganismos. Departamento de Microbiologia, Centro de Ciências Biológicas, Universidade Estadual de Londrina.

⁵Laboratório de Microbiologia Clínica. Departamento de Patologia, Análises Clínicas e Toxicológicas, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Estadual de Londrina.

RESUMO

Staphylococcus aureus resistente a meticilina (Methicillin-resistant *S. aureus*- MRSA) é um dos principais agentes causadores de infecções humanas em todo o mundo, com linhagens dominantes específicas circulando nas diferentes regiões geográficas. O Clone epidêmico brasileiro (BEC, SCCmec III, ST239) tem sido predominante na maioria dos hospitais brasileiros. Aqui, relatamos a prevalência de MRSA SCCmec tipo II exibindo STs diferentes, a maioria deles pertencentes ao CC5 em um hospital terciário do sul do Brasil.

PALAVRAS-CHAVE: MRSA. Resistência a múltiplas drogas.PVL. Toxina da síndrome do choque tóxico.

ABSTRACT

Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) is one of the leading causes of human infections worldwide, with major dominant lineage circulating in particular geographical regions. The Brazilian Epidemic Clone (BEC, SCCmec III, ST 239) has been predominant in most of Brazilian hospitals. Here, we report the prevalence of MRSA SCCmec type II exhibiting different STs, most of them belonging to CC5 in a tertiary hospital in southern Brazil.

KEYWORDS: MRSA.Multi-drugresistance.PVL.Toxic shock syndrome toxin.

Staphylococcus aureus, assintomaticamente, podem colonizar vários locais do corpo humano. No entanto, também são importantes patógenos que ocasionam grande diversidade de infecções, variando de infecções de pele e tecidos moles até moléstias complicadas, com evolução para óbito. Crucialmente, esta bactéria tem desenvolvido numerosos mecanismos de resistência aos antimicrobianos, limitando as opções de tratamento para as infecções estafilocócicas (TONG et al., 2015). A aquisição do *mec* cassete cromossômico estafilocócico (SCCmec), condutor dos genes de *mec* (A ou C) e os genes de recombinase (*ccr*) (*ccrAB* ou *l* e *ccrC*), desempenham um papel central na resistência antimicrobiana em *S. aureus*. Os genes *mec* codificam uma proteína ligadora de penicilina específica (PBP2a ou PBP2') com afinidade significativamente mais baixa para os fármacos de β -lactâmicos. Além disso, vários outros genes de resistência aos antimicrobianos e resistência aos metais pesados podem ser inseridos no cassete por ação da recombinase (HIRAMATSU et al., 2014).

Atualmente MRSA é responsável por uma elevada proporção de infecções estafilocócicas, sejam em ambientes hospitalares ou comunitários (ARIAS et al., 2017; TONG et al., 2015; DUARTE, et al., 2018). Particularmente, na América Latina, MRSA é altamente prevalente em hospitais, com diferentes clones e circulando em cada uma das

regiões (ARIAS et al., 2017). Notavelmente, o clone epidêmico brasileiro (BEC, ST239, SCCmec III), detectado pela primeira vez no Brasil na década de 1990, tem sido predominante na maioria dos hospitais brasileiros (ANDRADE-FIGUEIREDO; LEAL-BALBINO, 2016; SADER et al., 1994). Contudo, mudanças na estrutura da população de MRSA também foram relatadas em alguns hospitais no país. Caiiffa-Filho et al., 2013, relataram a prevalência de MRSAs conduzindo SCCmec tipo II em um hospital de São Paulo. O USA800/Pediátrica (ST5, SCCmecIV) e USA400/MW2/WA-1 (ST1, SCCmecIV) foram as linhagens mais predominantes de MRSA em cinco hospitais do Rio de Janeiro (PEDINOTTI ZUMA et al., 2017). Por outro lado, o USA100 (anteriormente designado clone NY/Japão ST5/CC5/SCCmecII), associado com multirresistência, foi a linhagem predominante de MRSA em um hospital military (CHAMON et al., 2017). Arias et al. 2017, relataram prevalência superior a 80% de USA100 em três hospitais brasileiros, localizados em São Paulo e Porto Alegre.

O Hospital Universitário de Londrina (UHL) é um hospital-escola e um centro de referência importante no norte do estado do Paraná, Brasil para o sistema único de saúde (SUS). Este é um centro de cuidados terciários, com 313 leitos, que serve a cidade de Londrina, além de cerca de 250 localidades do estado do Paraná e mais de 100 cidades de outros estados, principalmente São Paulo, Mato Grosso, Mato Grosso do Sul e Rondônia. O número de isolados MRSA detectado neste hospital tem aumentado ao longo dos anos (DUARTE et al., 2018). Aqui, nós relatamos a prevalência de MRSA CC5/SCCmecII emergindo no HUL. Um total de 59 isolados de MRSAs, não-duplicados, provenientes de pacientes internados no HUL durante 2015-2016, aleatoriamente, foram selecionados da coleção bacteriana do laboratório de Microbiologia clínica de UHL. O estudo foi aprovado pelo comitê de ética envolvendo seres humanos da Universidade Estadual de Londrina (CAAE n° 78657317.0.0000.5231 CEP-UEL). Os isolados foram recuperados de aspirados traqueal (n = 45) e sangue (n = 14), oriundos de pacientes com diagnóstico infeccioso confirmado, pelos clínicos do HUL, seguindo os protocolos ANVISA, 2017 e CDC, 2013. A identificação das espécies foi baseada no perfil fenotípico gerado pelo VITEK[®] 2 Compact usando o cartão de identificação do VITEK[®] 2 GP (bioMérieux- Durham, NC, USA).

Ao mesmo tempo, coloração de Gram, catalase, DNase e fermentação de manitol também foram determinados. A sensibilidade aos antimicrobianos foi determinada para os seguintes fármacos: cefoxitina (30 µg), penicilina (10 U), eritromicina (15 µg), Clindamicina (2 µg), gentamicina (10 µg), ciprofloxacina (5 µg), sulfametoxazol-trimetoprima (23.75/1.25

µg), rifampicina (5 µg), linezolide (10 µg) e tetraciclina (30 µg). Foi realizado ensaio de disco-difusão de acordo com *clínica laboratório Standards Institute* (CLSI). A concentração inibitória mínima (CIM) de vancomicina foi determinada por *e-test*[®] (ABBiodysk, Solna, Suécia). A cefoxitina foi usada para definir os isolados MRSA fenotipicamente (CLSI, 2018).

Todos os isolados foram sensíveis à rifampicina, sulfametoxazol-trimetoprima, linezolida, tigeciclina e vancomicina. Além de oxacilina, todos os isolados exibiram resistência à penicilina, e somente um isolado, apresentou resistência à eritromicina, clindamicina, ciprofloxacina e gentamicina. O mecanismo de resistência à meticilina é mediado pelo gene *mecA*, para a maioria dos isolados (52/59, 88,1%), como julgado pelos resultados da multiplex-PCR (MILHEIRIÇO; OLIVEIRA; DE LENCASTRE, 2007). Sete (11,9%) isolados não continham o gene *mecA* e em seguida foram investigados para a presença do *mecC* (anteriormente *mecALGA251* gene) (STEGGER et al., 2012). Não foram obtidos sinais de amplificação entre esses isolados, indicando outros mecanismos de resistência para oxacilina. Isolados de MRSA, não condutores do gene *mecA*, mas fenotipicamente resistentes à oxacilina, penicilina e cefoxitina anteriormente foram relatadas por Ba et al., 2014. Os autores relataram mutações pontuais nos genes codificadores para PBP 1, 2 e 3, resultando em substituições de aminoácidos nos domínios das transpeptidases dessas proteínas, o que pode estar relacionado à resistência oxacilina/cefotina. Além disso, um gene codificador do plasmídeo *mecB* foi recentemente descrito em um isolado de MRSA recuperado de swab de vigilância nasal em um hospital alemão (BECKER et al., 2018).

Usando a multiplex-PCR descrita por Milheiriço et al. 2007, o gene *mecA* foi pesquisado nos isolados de MRSA (n = 52). Esses, foram distribuídos em quatro tipos de SCC*mec*. Notavelmente, a predominância de SCC*mec* tipo II (34/52, 65,4%) foi observada entre os MRSA. Oito isolados cada (15,4%) foram classificados como SCC*mec* tipo I e IV. Um isolado (1,9%) abrigou o SCC*mec* tipo III e um isolado (1,9%) foi não tipável. Usando a análise *High-Resolution Melting* (HRM) de polimorfismos de nucleotídeo único (SNPs), conforme descrito por Lilliebridge et al., 2011, foi investigado o parentesco clonal entre os SCC*mec* tipo II. Doze tipos diferentes de *Sequence Typing* (STs) foram detectados, incluindo os ST5 (n = 3), ST6 (n = 2), ST9 (n = 2), ST27 (n = 2), ST53 (n = 2), ST63 (n = 7), ST99 (n = 2), ST306 (n = 3), ST445 (n = 5), ST835 (n = 4), ST1307 (n = 1) e ST1502 (n = 1). Com base em semelhanças de STs, estes MRSA foram agrupadas em cinco Complexos Clonais (CC) (tabela 1). A maioria dos isolados de MRSA SCC*mec* II pertencia ao CC5 (n = 23, 67,6%), comumente associado com infecções humanas em todo o mundo (BAL et al., 2016).

Tabela 1 - características moleculares e perfil de suscetibilidade aos antimicrobianos de 34 Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* SCCmec tipo II, isolados entre 2015-2016.

CC (n)	ST	PVL (n)	TSST (n)	Resistance (n)
5 (23)	5	-	-	PN, OX, ERI, CLI, CIP (3)
	6	-	-	PN, OX, ERI, CLI, CIP (2)
	9	1	-	PN, OX, ERI, CLI, CIP (2)
	27	-	-	PN, OX, ERI, CLI, CIP (2)
	63	1	-	PN, OX, ERI, CLI, CIP (7)
	99	-	-	PN, OX, ERI, CLI, CIP (2)
	1307	-	-	PN, OX, ERI, CLI, CIP (1)
	835	3	-	PN, OX, ERI, CLI, CIP (3)
	835	1	-	PN, OX (1)
7 (3)	306	1	-	PN, OX, ERI, CLI, CIP (3)
80 (1)	1502	-	-	PN, OX, ERI, CLI, CIP (1)
445 (5)	445	-	-	PN, OX, ERI, CLI, CIP (5)
1290 (1)	53	-	-	PN, OX, ERI, CLI, CIP, GN (1)
1290 (1)	53	-	-	PN, OX, ERI, CLI, CIP (1)

CC: Complexo Clonal; n: total número de isolados; ST: *Sequence Typing*; PVL:*Panton-Valentine Leukocidin*; TSST: toxina da síndrome do choque tóxico; PN: Penicilina, OX: oxacilina, CLI: clindamicina, ERI: eritromicina, CIP: ciprofloxacina; GN: gentamicina.

Estudos recentes do nosso grupo de pesquisa relataram a predominância de MRSA abrigoando elementos SCCmec II isoladas de diferentes fontes clínicas no UHL durante os anos de 2010 a 2013, com prevalência de 53,7% (66 de 123 MRSA isolados) e de 43,6% (24 de 55 MRSA isolados) descritas por De Oliveira et al., 2015 e Bodnar et al., 2016, respectivamente. Em ambos os estudos a maioria dos isolados apresentou resistência para eritromicina, clindamicina e ciprofloxacina. Em contraste com os nossos resultados, ambos os estudos relataram isolados MRSA com resistência intermediária à vancomicina.

Também investigamos a presença dos genes *lukS-PV*, *lukF-PV* e *tst-1* em isolados com o SCCmec II, utilizando PCR como descrito por Campbell et al. 2008. Os genes *LukS-PV* e *lukF-PV* codificam a *Panton-Valentine leukocidin* (PVL), uma toxina que tem sido associada com *S. aureus* em infecções de pele e tecidos moles, pneumonia necrotizante e choque séptico (SPAAN; VAN STRIJP; TORRES, 2017). Sete isolados com o SCCmec II (20,6%) abrigoaram os genes codificadores de PVL, o que contrasta com os resultados de De Oliveira et al., 2015, que detectou esses genes em isolados de MRSA SCCmec tipo IV (3/123, 2,4%). O

gene *tst-1*, que está localizado em uma ilha de patogenicidade móvel, codifica a toxina da síndrome do choque tóxico (TSST-1), um membro da família dos superantígenos bacterianos, que induz a ativação de monócitos/macrófagos e linfócitos T, acarretando em uma Síndrome de choque tóxico potencialmente fatal (KRAKAUER, 2010). Nenhum tipo de MRSA SCCmec II abrigou o gene *tst-1* nesse estudo. Contudo, esse gene foi detectado em 5,7% (7 de 123) de MRSA, abrigando os mesmos elementos de SCCmec em estudo conduzido por De Oliveira et al., 2015.

Em conclusão, esse estudo relata a predominância de MRSA SCCmec tipo II exibindo STs diferentes, a maioria dos quais pertence ao CC5 no UHL. O SCCmec tipo II permaneceu relativamente estável ao longo do período de cinco anos estudado pelo nosso grupo de pesquisa; no entanto, um aumento na presença de PVL e ausência de genes codificadores para a TSST foram detectados entre as linhagens estudadas. Isolados com a presença de elementos genéticos móveis, conduzindo novos padrões de resistência aos antibióticos e virulência, podem emergir a qualquer momento. A vigilância contínua de *S. aureus* é crucial para o desenvolvimento de abordagens preventivas e terapêuticas para o tratamento de infecções causadas por essa bactéria. Corroborando com isso, um estudo recente de Wang et al. 2017 mostrou que isolados CC5, SCCmec tipo II, resistentes à eritromicina são fator de risco independente associado com 30 dias mortalidade de pacientes com infecções por MRSA. Além disso, maior risco de morte foi relatado em pacientes com pneumonia causada por isolados MRSA positivos para PVL, em comparação com isolados não produtores de PVL (GILLET et al., 2002).

AGRADECIMENTOS

A coordenação de aperfeiçoamento de pessoal de ensino superior (CAPES – PROAP). Duarte foi apoiado por uma bolsa de estudos da Fundação Araucária -PR. S.F.Yamada-Ogatta foi apoiado por bolsas de investigação do Conselho Nacional de desenvolvimento científico e tecnológico (CNPq). Tavares foi apoiado por *Postdoctoral fellowship* da CAPES.

CONFLITOS DE INTERESSE

Os autores não relatam nenhum conflito de interesses.

CONTRIBUIÇÃO DOS AUTORES

F.C.D. Contribuiu em todas as atividades metodológicas, análise e interpretação dos dados; E.R.T, T.D. e M.A.G.R.: realizaram os experimentos microbiológicos e analisaram os dados; L.M.Y.: Contribuiu na interpretação dos dados e revisão crítica do manuscrito. S.F.Y.-O. e M.R.E.P.: Auxiliaram na concepção, design, análise e interpretação dos dados. Todos os autores leram e aprovaram o manuscrito final.

* Autores correspondentes:

Marcia Regina Eches Perugini. Hospital Universitário de Londrina. Departamento de Patologia, Análises Clínicas e Toxicológicas. Avenida Robert Koch, 60. Vila Operária. CEP 86038-350. Londrina, Paraná, Brazil. Phone: +55 43 3371 - 2346. E-mail: marciaperugini@hotmail.com

Sueli Fumie Yamada-Ogatta. Departamento de Microbiologia, Centro de Ciências Biológicas, Universidade Estadual de Londrina. Rodovia Celso Garcia Cid, PR445, km380, Campus Universitário. CEP 86057-970. Londrina, Paraná, Brazil. Phone: +55 43 3371 - 5503. E-mail: ogatta@uel.br

REFERÊNCIAS

- ANDRADE-FIGUEIREDO, M.; LEAL-BALBINO, T. C. Clonal diversity and epidemiological characteristics of *Staphylococcus aureus*: high prevalence of oxacillin-susceptible *mecA*-positive *Staphylococcus aureus* (OS-MRSA) associated with clinical isolates in Brazil. **BMC Microbiology**, v. 16, n. 1, p. 115, 21 dez. 2016.
- ARIAS, C. A. et al. A Prospective Cohort Multicenter Study of Molecular Epidemiology and Phylogenomics of *Staphylococcus aureus* Bacteremia in Nine Latin American Countries. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 61, n. 10, p. e00816-17, out. 2017.
- BA, X. et al. Novel mutations in penicillin-binding protein genes in clinical *Staphylococcus aureus* isolates that are methicillin resistant on susceptibility testing, but lack the *mec* gene. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 69, n. 3, p. 594–597, 2014.
- BAL, A. M. et al. Genomic insights into the emergence and spread of international clones of healthcare-, community- and livestock-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: Blurring of the traditional definitions. **Journal of Global Antimicrobial Resistance**, v. 6, n. 2010, p. 95–101, set. 2016.
- BECKER, K. et al. Plasmid-Encoded Transferable *mecB* -Mediated Methicillin Resistance in *Staphylococcus aureus*. **Emerging Infectious Diseases**, v. 24, n. 2, p. 242–248, fev. 2018.
- BODNAR, G. C. et al. Comparison of HRM analysis and three REP-PCR genomic fingerprint methods for rapid typing of MRSA at a Brazilian hospital. **Journal of Infection in Developing Countries**, v. 10, n. 12, p. 1306–1317, 2016.
- CAIAFFA-FILHO, H. H. et al. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* carrying SCCmec type II was more frequent than the Brazilian endemic clone as a cause of nosocomial bacteremia. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v. 76, n. 4, p. 518–520, ago. 2013.
- CHAMON, R. C. et al. Complete substitution of the Brazilian endemic clone by other methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* lineages in two public hospitals in Rio de Janeiro, Brazil. **The Brazilian Journal of Infectious Diseases**, v. 21, n. 2, p. 185–189, mar. 2017.
- CLSI. **Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing CLSI supplement M100S**. 26. ed. Wayne: Clinical and Laboratory Standards Institute, 2016.
- Duarte FC, Danelli T, Ribeiro MA, Perugini LF, Vespero EC, Carrara-Marroni FE, et al. Bacteremia causada por *Staphylococcus aureus*: uma análise de quinze anos da sensibilidade a antimicrobianos em um hospital terciário do Brasil. **Rev Epidemiol Control Infec**. 2018; *in press*.
- GILLET, Y. et al. Association between *Staphylococcus aureus* strains carrying gene for Panton-Valentine leukocidin and highly lethal necrotising pneumonia in young immunocompetent patients. **The Lancet**, v. 359, n. 9308, p. 753–759, mar. 2002.

- HIRAMATSU, K. et al. Multi-drug-resistant *Staphylococcus aureus* and future chemotherapy. **Journal of Infection and Chemotherapy**, v. 20, n. 10, p. 593–601, out. 2014.
- KRAKAUER, T. Therapeutic Down-Modulators of Staphylococcal Superantigen-Induced Inflammation and Toxic Shock. **Toxins**, v. 2, n. 8, p. 1963–1983, 29 jul. 2010.
- LILLIEBRIDGE, R. A. et al. The utility of high-resolution melting analysis of SNP nucleated PCR Amplicons-an MLST based *Staphylococcus Aureus* typing scheme. **PLoS ONE**, v. 6, n. 6, 2011.
- MILHEIRIÇO, C.; OLIVEIRA, D. C.; DE LENCASTRE, H. Update to the multiplex PCR strategy for assignment of *mec* element types in *Staphylococcus aureus*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 51, n. 9, p. 3374–3377, 2007.
- OLIVEIRA, C. F. DE et al. Molecular and phenotypic characteristics of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolated from hospitalized patients. **The Journal of Infection in Developing Countries**, v. 9, n. 7, p. 743, 30 jul. 2015.
- PEDINOTTI ZUMA, A. V. et al. Molecular characterization of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolated from blood in Rio de Janeiro displaying susceptibility profiles to non-beta-lactam antibiotics. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 48, n. 2, p. 237–241, 2017.
- SADER, H. S. et al. Evaluation of Interhospital Spread of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* in Sao Paulo, Brazil, Using Pulsed-Field Gel Electrophoresis of Chromosomal DNA. **Infection Control and Hospital Epidemiology**, v. 15, n. 5, p. 320–323, maio 1994.
- SPAAN, A. N.; VAN STRIJP, J. A. G.; TORRES, V. J. Leukocidins: staphylococcal bi-component pore-forming toxins find their receptors. **Nature Reviews Microbiology**, v. 15, n. 7, p. 435–447, 19 abr. 2017.
- STEGGER, M. et al. Rapid detection, differentiation and typing of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* harbouring either *mecA* or the new *mecA* homologue *mecA* LGA251. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 18, n. 4, p. 395–400, 2012.
- TONG, S. Y. C. et al. *Staphylococcus aureus* Infections: Epidemiology, Pathophysiology, Clinical Manifestations, and Management. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 28, n. 3, p. 603–661, 27 jul. 2015.
- WANG, M. et al. Hospital Dissemination of *tst-1*-Positive Clonal Complex 5 (CC5) Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 7, n. March, p. 1–8, 31 mar. 2017.

6.3 ARTIGO 3

Sepse fatal causada por *mecA*-positivo oxacilina sensível *Staphylococcus aureus*: primeiro relato em um hospital terciário do sul do Brasil.

Felipe Crepaldi Duarte¹, Tiago Danelli¹, Eliandro Reis Tavares^{2,3}, Ana Elisa Belotto Morguette³, Gilselena Kerbauy⁴, Cintia Magalhães Carvalho Grion⁵, Lucy Megumi Yamauchi^{3,6}, Sueli Fumie Yamada-Ogatta^{1,3,6,*}, Marcia Regina Eches Perugini^{1,7,*}

¹Programa de Mestrado em Fisiopatologia Clínica e Laboratorial. Departamento de Patologia, Análises Clínicas e Toxicológicas, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Estadual de Londrina.²Bolsista do Programa Nacional de Pós-Doutorado do Programa de Pós-graduação em Microbiologia. Departamento de Microbiologia, Centro de Ciências Biológicas, Universidade Estadual de Londrina.³Laboratório de Biologia Molecular de Microrganismos. Departamento de Microbiologia, Centro de Ciências Biológicas, Universidade Estadual de Londrina.⁴Departamento de Enfermagem, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Estadual de Londrina.

⁵Departamento de Clínica Médica, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Estadual de Londrina.⁶Programa de Pós-graduação em Microbiologia. Departamento de Microbiologia. Centro de Ciências Biológicas. Universidade Estadual de Londrina.

⁷Laboratório de Microbiologia Clínica. Departamento de Patologia, Análises Clínicas e Toxicológicas, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Estadual de Londrina.

*Corresponding authors:

Marcia Regina Eches Perugini. Hospital Universitário de Londrina. Departamento de Patologia, Análises Clínicas e Toxicológicas. Avenida Robert Koch, 60. Vila Operária. CEP 86038-350. Londrina, Paraná, Brazil. Phone: +55 43 3371 - 2346. E-mail: marciaperugini@hotmail.com

Sueli Fumie Yamada-Ogatta. Departamento de Microbiologia, Centro de Ciências Biológicas, Universidade Estadual de Londrina. Rodovia Celso Garcia Cid, PR445, km380, Campus Universitário. CEP 86057-970. Londrina, Paraná, Brazil. Phone: +55 43 3371 - 5503. E-mail: ogatta@uel.br

RESUMO

Staphylococcus aureus mecA-positivo oxacilina, fenotipicamente, sensível (OS-MRSA) esta sendo cada vez mais relatados em todo o mundo. Esses isolados ameaçam o bom andamento da terapia, pois são erroneamente identificados como isolados sensíveis a oxacilina por métodos fenotípicos, que são rotineiramente usados na maioria dos laboratórios de microbiologia clínica. Neste trabalho, relatamos o primeiro caso de sepse fatal em uma paciente do sexo feminino, 43 anos, causada por um isolado OS-MRSA, SCC*mec* IV, ST1/CC1, em um hospital terciário do sul do Brasil, que destaca as dificuldades em diagnosticar esta bactéria. Culturas de sangue e testes de sensibilidade fenotípica aos antimicrobianos renderam, na admissão, um *S. aureus* resistente somente a penicilina. Embora a terapia com vancomicina tenha sido iniciada, esse agente antibacteriano foi substituído por oxacilina, com base no resultado dos testes de sensibilidade. No entanto, as condições clínicas da paciente se deterioraram rapidamente, evoluindo para choque séptico com desfecho fatal. Laboratórios de microbiologia clínica devem considerar o uso de testes adicionais para distinguir com precisão entre os diversos fenótipos antimicrobianos de *S. aureus*.

Palavras-chave: Sistema operacional-MRSA, bacteremia, relato de caso.

ABSTRACT

mecA-positive oxacillin phenotypically susceptible *Staphylococcus aureus* (OS-MRSA) is increasingly reported worldwide. This bacterium poses a therapeutic threat, as it can be misidentified as an oxacillin-susceptible organism by phenotypic methods that are routinely used in the majority of clinical microbiology laboratories. Herein, we report the first case of fatal sepsis in a 43-year-old female patient caused by an OS-MRSA SCC*mec* type IV ST1/CC1 in a tertiary hospital in southern Brazil, which highlights the difficulties involved in diagnosing this bacterium. Blood cultures and phenotypic susceptibility tests on admission yielded a penicillin-resistant *S. aureus*. Although vancomycin therapy was initiated, this antibacterial was replaced by oxacillin, based on the susceptibility result. However, the clinical conditions of the patient deteriorated rapidly evolving to fatal septic shock. Clinical microbiology laboratories should consider the use of additional tests to accurately distinguish between various antimicrobial phenotypes of *S. aureus*.

Keywords: OS-MRSA, bacteremia, case report.

INTRODUÇÃO

Staphylococcus aureus, de forma assintomática, podem colonizar as fossas nasais anteriores e áreas úmidas da pele em até 30% dos seres humanos (WERTHEIM et al., 2005). Em indivíduos imunodeprimidos, e hospitalizados, esta colonização representa um risco importante para o desenvolvimento de infecções de corrente sanguínea em comparação com os não-colonizados (VON EIFF, et al., 2001; WERTHEIM et al., 2005). Na verdade, *S. aureus* é a principal causa de bacteremia em todo o mundo, muitas vezes associado com prognósticos desfavoráveis. Além do curso clínico, que pode levar a complicações, como endocardite infecciosa, sepse e choque séptico, a resistência aos antimicrobianos impõe desafios importantes no tratamento desta infecção (HASSOUN, LINDEN, FRIEDMAN, 2017; SEAS et al., 2018). Na verdade, uma alta proporção de bacteremias são ocasionadas por *S. aureus* resistente à meticilina (MRSA), que, além da resistência aos medicamentos β -lactâmicos, tornou-se resistente a quase todos agentes antibacterianos usados para tratá-lo, limitando as opções terapêuticas (DUARTE et al., 2018; HASSOUN, LINDEN, FRIEDMAN, 2017).

O mecanismo mais comum de resistência à meticilina é mediado pela aquisição do gene *mecA*, que codifica a proteína ligadora de penicilina 2a (PBP2a) com baixa afinidade para antibacterianos β -lactâmicos (BECKER, et al., 2018; HIRAMATSU et al., 2014).

O teste de resistência para o disco de cefoxitina, in vitro, ou oxacilina, com concentração inibitória mínima (CIM) $\geq 4 \mu\text{g/mL}$, são rotineiramente usados para identificação fenotípica de MRSA nos laboratórios clínicos (CLSI, 2018). Além disso, a presença do gene *mec*, geralmente detectada por testes de amplificação de ácidos nucleicos, tem sido usado como marcador genético de MRSA (HIRAMATSU et al., 2014). No entanto, isolados que conduzem o gene *mecA*, mas são fenotipicamente sensíveis à cefoxitina/oxacilina, referida como oxacilina-sensíveis MRSA (OS-MRSA), têm sido relatados em todo o mundo (SAKOULAS et al., 2001; SONG et al., 2017). Esses isolados são propensos a serem incorrectamente identificados como *S. aureus* meticilina-sensíveis (MSSA), levando à falha terapêutica, quando iniciado tratamento com fármacos β -lactâmicos. Neste trabalho, apresentamos um caso fatal de infecção causada por um isolado OS-MRSA em um hospital terciário do sul do Brasil.

RELATO DE CASO

Uma mulher caucasiana, 43 anos, foi transferida de um hospital secundário para a sala de emergência de nosso hospital, com um histórico de sete dias de edema e dor em membros inferiores. Na admissão, ela apresentou-se com um baixo nível de consciência e dor abdominal, com uso de ceftriaxone intravenosa (2 g a cada 12 h). Ao exame de seus sinais vitais revelou estar em síndrome da resposta inflamatória sistêmica (SIRS) (BONE et al., 1992), batimentos cardíacos de 95 bpm, temperatura de 37,5 °C, frequência respiratória de 22 respirações/min e contagem de células brancas do sangue de 24.800/mm³, com avaliação de marcador sequencial rápido de falência de órgãos (qSOFA) = 3 (SINGER et al., 2016), atividade mental alterada e pressão sanguínea sistólica de 72 mmHg. Com a detecção de falha respiratória a paciente foi entubada, passando a realizar as trocas gasosas com o auxílio de um ventilador mecânico. O diagnóstico de sepse foi confirmado. Histórico médico significativo, incluído diabetes mellitus tipo II, com uso irregular de metformina, e infecções recorrentes do trato urinário, além de furunculose. Exame laboratorial inicial mostrou moderada anemia com hematócrito de 28,4 g/dL, hemoglobina de 11,0 g/dL e contagem de plaquetas de 153 x 10⁹/L. Níveis elevados de proteína C - reativa (CRP, 502,7 mg/L; referência valor < 9 mg / L) e lactato (7,3 mmol/L) também foram detectados. Além disso a paciente apresentou quadro hipotenso, requerindo terapia com droga vasopressora, apesar da adequada suplementação de fluidos. Diagnóstico de choque séptico foi confirmada (SINGER et al., 2017). No dia seguinte a sua admissão apresentou febre (39.2°C) e sua condição clínica deteriorou-se rapidamente, apresentando instabilidade hemodinâmica e taquicardia, mesmo estando sob sedação. Amostras de sangue para culturas foram coletadas e a ceftriaxona foi substituída, empiricamente, por piperacilin-tazobactama (2,25 g cada 6 h). As culturas de sangue foram realizadas usando o sistema automatizado BD™ *Automated Blood Culture System* BACTEC (Becton-Dickinson Microbiology Systems, Sparks, MD, EUA), que após apresentar resultado e feita coloração de gram, constatou-se ser um coco Gram-positivo. Assim, por via venosa vancomicina (1 g – dose de ataque- 500mg 8/8) foi adicionada ao regime de terapia antimicrobiano. No 3º dia, a identificação do isolado, bem como o perfil de sensibilidade aos agentes antimicrobianos, foi gerado pelo cartão Vitek2® sistema ATS-P585 (bioMérieux, Durham, NC, EUA) mostrando-se ser um *S. aureus* sensível a meticilina (MSSA) e resistente somente a penicilina (CLSI, 2018). Tendo em conta esses resultados a terapia com vancomicina foi descontinuada e oxacilina endovenosa (2 g, a cada 4 h) foi iniciada. Cinco dias após o tratamento inicial com oxacilina a paciente não apresentava qualquer melhoria em

sua condição clínica. Culturas de sangue seriadas e testes de susceptibilidade antimicrobiana, novamente, identificaram o isolado MSSA, resistente apenas à penicilina. No 6º dia de terapia com oxacilina a paciente entrou em choque séptico. Nesse momento a oxacilina foi descontinuada e foi introduzida terapia com daptomicina (500 mg cada 24 h); no entanto, a paciente veio a óbito no dia seguinte.

Novas análises laboratoriais confirmaram a identificação de *S. aureus* por multiplex-PCR, tendo como alvo o gene *nuc* (HIROTAKI et al., 2011). Além disso, a CIM para oxacilina foi de 0,75 µg/mL, conforme determinado pelo *e-test*[®] (AB Biodisk, Solna, Suécia). O gene *mecA* foi detectado e, de acordo com a multiplex-PCR descrita por Milheiriço, de Oliveira e Lencastre, 2007, esse gene foi inserido no cassete cromossômico estafilocócico (SCC*mec*) IV. Utilizando técnica de RTq-PCR, com metodologia de *High Resolution Melting* (HRM), como descrito por Lilliebridge, et al., 2011, com a análise de *single nucleotide polymorphism* (SNPs), revelou que o isolado estava inserido no *Sequence type* (ST) 1 e Complexo Clonal (CC) 1. O isolado não conduzia os genes *lukS-PV* e *lukF-PV* (codificadores para a Pantón-Valentine leukocidina) e *tst-1* (toxina da síndrome do choque tóxico), que foram analisados por PCR, como descrito anteriormente por de Oliveira et al., 2015. O estudo foi aprovado pelo comitê de ética em pesquisa envolvendo seres humanos da Universidade Estadual de Londrina (CEP-UEL CAAE n° 78657317.0.0000.5231).

DISCUSSÃO

No presente estudo descrevemos um caso de sepse fatal causada por um isolado OS-MRSA, SCC*mec* IV/ST1/CC1, em paciente do sexo feminino, internada em um hospital de ensino do Sul do Brasil, que foi confundido com um isolado MSSA por métodos fenotípicos. De acordo com as diretrizes do CLSI os seguintes métodos fenotípicos são recomendados para a detecção de resistência à meticilina, entre espécies de *Staphylococcus* spp.: 1) CIM de oxacilina para *S. aureus* e estafilococos coagulase-negativa (incluindo *Staphylococcus lugdunense*); 2) CIM de cefoxitina para *S. aureus* e *S. lugdunense*; 3) teste de disco de difusão de cefoxitina de 30 µg para *S. aureus* e estafilococos coagulase-negativa (incluindo *S. lugdunense*); e 4) triagem por ágar diluição com oxacilina 6µg/mL e 4% NaCl para *S. aureus*. Além disso, se o isolado for positivo para o gene *mecA*, este deve ser relatado como oxacilina-resistente. No entanto, resultados discrepantes entre os métodos fenotípicos e pesquisa do

gene *mecA*, ou detecção de proteína PBP2a para identificação de MRSA, foram relatados em outros estudos (tabela 1).

Tabela1. Características de isolados de *S. aureus mecA*-positivo oxacilina sensíveis descritos ao redor do mundo.

Região Geográfica	Prevalência % (n/N)	Material (n)	CIM para oxacilina $\mu\text{g/mL}$	Características Genotípicas	Comentários	Referências
USA	0.62 (2/324)	Blood (1), leg wound (1)	0.25 – 2 VITEK-1 GPS-106 card, VITEK-2 AST-GP 55 card and agar dilution assays	Not performed	The MRSA-Screen latex agglutination for the detection of PBP2a showed similar accuracy of PCR based assay for the detection of <i>mecA</i> gene. VITEK-2 showed higher sensibility and lower specificity than VITEK-1 for MRSA detection.	Sakoulas et al., 2001
Germany	4.6 (7/151)	Nasal and oropharyngeal carriage surveillance swabs	Not determined	Six distinct clones were observed by PFGE	Oxacillin-resistance was detected by oxacillin disk diffusion and broth screening assays. The authors called <i>mecA</i> -positive oxacillin susceptible <i>S. aureus</i> as “dormant MRSA”. None isolates were capable to grow in tryptic soy agar containing 0.3 $\mu\text{g/mL}$	Kampf et al., 2003
Japan	1.25 (6/480)	Not identified	0.5 – 2 Agar dilution assay	SCC <i>mec</i> type III (n=4); SCC <i>mec</i> type I (n=1); SCC <i>mec</i> type IV	The term OS-MRSA was used for the first time. Positive for β -lactamase production by nitrocefin disk	Hososaka et al., 2007

				(n=1)	method; positive for <i>blaZ</i> gene by PCR. All isolates were negative for PVL and TSST-1 coding genes.	
Germany	NA	Not identified	0.5 – 2.0 Broth microdilution assay	Isolates with MIC=1.0 µg/mL were analyzed: ST80 (n=33), ST45 (n=28), ST22 (n=8)	The study compared different phenotypic methods for determination of oxacillin susceptibility profile. One µg oxacillin disk and 30 µg cefoxitin disk accurately detect low-level oxacillin resistance (MIC=1 µg/mL). Beside MIC determination, the authors suggested performing an additional test to detect MRSA.	Witte et al., 2007
Greece	NA	Sputum (1), pus (2), urine (1)	0.25 – 1.0 Agar dilution assay	SCC <i>mec</i> type IV/ST728	Two isolates were initially classified as oxacillin resistant by VITEK-2 GPS-105 card, and were categorized as oxacillin heterogeneous by the population analysis assay. In a mouse thigh model of infection, the OR-MRSA isolates yielded similar bacterial load after dicloxacillin treatment	Ikonomidis et al., 2008

					compared to MSSA infection.	
USA	3.0 (25/832)	Various	≤ 2.0 VITEK-1 GPS 103 card	All isolates harbored the SCC <i>mec</i> type II Most isolates belonged to <i>spa</i> clonal complex t2 (n=13). Other five <i>spa</i> types were detected.	MRSA isolates were detected by using growth on oxacillin screen agar plate at 48 h. 1 μ g oxacillin disk diffusion and VITEK-1 assigned these isolates as MSSA. 30 μ g cefoxitin disk diffusion detected oxacillin resistance in 22 isolates. PBP2a was detected in all isolates after exposure to oxacillin.	Forbes et al., 2008
USA	Case report	Blood (2)	0.5 VITEK-2	SCC <i>mec</i> type IV/CC5/ Pediatric clone, <i>pvl</i> SCC <i>mec</i> type IV /CC8/ USA300 clone, <i>pvl</i> ⁺	<i>E</i> -test showed MIC of 1 μ g/mL for both isolates. 1 μ g oxacillin disk reported both isolates as susceptible. 30 μ g cefoxitin disk reported one isolate as susceptible and the other as resistant.	Sharff et al., 2012
Taiwan	21.4 (58/271)	Blood and other sterile body sites	1.0 - 2.0 Broth microdilution using custom-designed Sensititre panels	SCC <i>mec</i> type V (n=56), SCC <i>mec</i> type IV (n=2). Most OS-MRSA belonged to <i>spa</i> clonal complex t437 (n=43)	Inclusion criterion was oxacillin MICs of 1 and 2 μ g/mL, as determined by broth microdilution assay. <i>mecA</i> -positive tests were detected in 6 and 52 isolates presented MIC values of 1.0 and 2.0 μ g/mL, respectively. Retesting	Chen et al., 2012

					the oxacillin MICs of OS-MRSA with Sensititre broth microdilution GPALL1F panel and VITEK-2 AST-P583 card yielded MIC > 4 $\mu\text{g}/\text{mL}$ for 28 and 16 isolates, respectively. Oxacillin and cefoxitin disk-diffusion were the best assays to detect MRSA.	
China	3.9 (60/1558)	Various	0.25 – 2 Agar dilution assay	OS-MRSA belonged to 21 <i>spa</i> types and 5 SCCmec types. Most of the isolates belonged to the following clonal types: <i>spa</i> t437 SCCmec type IV ($n=15$), <i>spa</i> t437 SCCmec type V ($n=8$).	Cefoxitin MIC range of 8.0 – 32.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ determined by agar dilution assay.	He et al., 2013
Iran	4.9 (2/41)	Nasal carriage surveillance swabs	1.0 Agar dilution assay	Not determined	30 μg cefoxitin disk diffusion and PCR for <i>mecA</i> detection were used to determine oxacillin-resistance.	Jannati et al., 2013
Espanha	0.78 (2/255)	Abscess secretion (1), wound secretion (1)	0.5 – 1.0 VITEK-2 AST-P626 card	Not determined	Oxacillin MIC range of 0.5 – 1.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ was detected by <i>E</i> -test. Both, cefoxitin disk-difusion and <i>E</i> -test reported susceptible	Aleixandre-Górriz et al., 2014

					results.	
United Kingdom	1.2 (6/500)	Skin and soft tissue infections	0.25 – 1.5 Oxoid M.I.C. Evaluator™	OS-MRSA belonged to distinct clones, as determined by PFGE, and none harbored the PVL encoding genes.	All isolates included in this study were initially classified as MSSA. None OS-MRSA harbored the <i>mecC</i> gene.	Saeed et al., 2014
São Tomé and Príncipe/ Angola	8.33 (29/348; <i>n</i> =20 in São Tomé and Príncipe; <i>n</i> =9 in Angola))	Nasal carriage surveillance swabs	0.5 – 3.0 <i>E</i> -test	Most of the isolates belonged to the following clonal types: PFGE type B, <i>spa</i> types t186/t325/t786/t1814/t1951, ST88 and SCC <i>mec</i> type IVa (<i>n</i> =15), PFGE type C-t451/t648-ST8-SCC <i>mec</i> V (<i>n</i> =9)	Detection of MRSA in both countries is based only on the oxacillin disk-diffusion method. One isolate of the PFGE type H1, <i>spa</i> type t590, ST1 and SCC <i>mec</i> type V harbored the <i>lukS</i> -PV and <i>lukF</i> -PV genes.	Conceição et al., 2015
Brazil	33.7 (30/89)	Various	Not determined	OS-MRSA belonged to 15 <i>spa</i> types and 12 STs; Two and three isolates were nontypeable by <i>spa</i> typing and MLST, respectively.	MSSA isolates presented 30 µg cefoxitin disk diffusion range of 25 – 30 mm of diameter, and MIC ≤ 4 µg/mL, as determined by agar dilution assay.	Andrade-Figueiredo and Leal-Balbino, 2016

Democratic Republic of the Congo	9.0 (9/100)	Nasal carriage surveillance swabs	2.0 VITEK-2 AST632 card	The <i>spa</i> types and STs were extracted from whole genome sequencing data and all belonged to t1476 <i>spa</i> type and ST8	Results of VITEK-2 and <i>E</i> -test were concordant for oxacillin. For cefoxitin, VITEK-2 screen test was negative, whereas <i>E</i> -test showed a MIC range of 16 – 24 $\mu\text{g/mL}$.	Phaku et al., 2016
Taiwan	1.1 (40/3717)	Various	0.5 – 2 BD Phoenix™ Automated System	All were <i>mecA</i> ⁺ and harbored the SCC <i>mec</i> type IV (<i>n</i> =2) or SCC <i>mec</i> type V (<i>n</i> =38). The most prevalent <i>spa</i> types were t437 (<i>n</i> =19) and t1081 (<i>n</i> =14). Sixteen isolates were positive for <i>lukS</i> -PV and <i>lukF</i> -PV genes	Isolates with discrepant results between oxacillin and cefoxitin by the BD Phoenix™ Automated System were included in this study. Cefoxitin MIC range: 8 – 16 $\mu\text{g/mL}$	Ho et al., 2016
USA	Case report	Blood (2)	0.5 VITEK-2 AST- GP67 card	For one isolate, PFGE analysis showed 83% similarity with USA100 clone, and was <i>pvl</i> . The other isolate was not characterized.	The study reported the reversion from methicillin susceptibility to methicillin resistance among <i>mecA</i> -positive MSSA within a patient during antibiotic therapy. The mechanisms of reversion were also described.	Proulx et al., 2016

China	1.64 (34/2068)	Various	0.5 – 2 agar dilution assay	Most prevalent clones were: ST338-t437- SCC <i>mecV</i> (<i>n</i> =11), ST59- t437- SCC <i>mecIV/V</i> (<i>n</i> =7), ST120- t8660- SCC <i>mecV</i> (<i>n</i> =3). <i>pvl</i> ⁺ (<i>n</i> =17)	Cefoxitin MIC range: 8 – 16 µg/mL as determined by agar dilution assay.	Song et al., 2017
-------	-------------------	---------	---------------------------------------	--	--	----------------------

n=número de isolados apresentando o gene *mecA* com oxacilina fenotipicamente sensível; *N*=número total de *S. aureus* analisados; MIC=concentração inibitória mínima; PBP= *penicillin-binding protein*; MRSA=*methicillin-resistant Staphylococcus aureus*; PFGE=*Pulsed Field Gel Electrophoresis*; SCC=cassete cromossômico estafilocócico; MLST=*multilocus sequence typing*; ST=*sequence type*; PVL=*Panton-Valentine Leukocidin*; MSSA=*methicillin-susceptible Staphylococcus aureus*.

O termo OS-MRSA, para a descrição de *S. aureus* abrigando o gene *mecA* mas sensíveis à oxacilina, foi primariamente usado no Japão por Hososaka et al., 2007. No entanto, isolados com estas características tinham sido relatados anteriormente nos EUA, por Sakoulas et al., 2001 e na Alemanha, por Kampf et al., 2003. Nos últimos anos a ocorrência de isolados OS-MRSA tem sido relatada em diferentes países do mundo, mostrando uma taxa de prevalência que varia de 0,62 a 51,7% (POURNARAS et al., 2015). No Brasil, Andrade-Figueiredo e Leal-Balbino, 2016, relataram a maior prevalência de OS-MRSA (51,7%, 30 de 58 isolados) entre isolados anteriormente identificado como MSSA em hospitais em Recife, no nordeste do Brasil.

Uma limitação do nosso estudo é não termos executado uma análise sistemática de todas as infecções de corrente sanguínea ao longo do período deste estudo. Essa busca forneceria uma melhor visualização sobre a real frequência de isolados OS-MRSA em nosso hospital. Apesar desta limitação, o achado de isolados OS-MRSA representa uma ameaça adicional para a terapia antimicrobiana das infecções estafilocócicas. O uso de agentes de β-lactâmicos poderia selecionar células bacterianas altamente resistentes, dentro da população,

levando à insuficiência do tratamento. Dessa forma, Jones et al., 2017, mostrou que a falha na terapia antimicrobiana foi significativamente maior em pacientes com infecções de corrente sanguínea causadas por OS-MRSA em comparação com aquelas causadas por isolados MRSA.

Além do erro na identificação do fenótipo para oxacilina, a maioria dos, acima mencionados, fatores de risco foram detectados na paciente, que poderia ter contribuído para sua morte, após dez dias de internação em nossa instituição. O grau de colonização de *S. aureus* da paciente era desconhecido e o foco da bacteriemia não pode ser identificado, embora algumas evidências mostram que poderia ser devido a uma infecção de pele e tecidos moles. Assim, à admissão da paciente em um hospital local foi devido ao edema e dor em membros inferiores, e os registros médicos anteriores descreviam a presença de furunculose recorrente; no entanto, o agente causador não foi relatado.

O perfil de susceptibilidade aos antimicrobianos do isolado (resistência apenas à penicilina) parecia estar condizente com uma infecção adquirida na comunidade CA-MRSA, que em geral apresentam susceptibilidade a vários antimicrobianos não- β -lactâmicos (FIGUEIREDO, 2017). Além disso, o isolado abrigou o SCCmec tipo IV, que tem sido relacionado aos clones de CA-MRSA. No entanto a codificação do gene PVL, marcador genético que têm sido relacionados aos CA-MRSA, não foi detectado em nosso estudo. Da mesma forma, o clone predominante de CA-MRSA nos hospitais brasileiros, multi-resistente ST1-SCCmec tipo IV, relacionados ao clone USA400 CA-MRSA, não abriga os genes codificadores da PVL (FIGUEIREDO, 2017).

A escolha, e o tempo de terapia antimicrobiana, afetam amplamente o curso de uma bacteremia grave (HASSOUN, LINDEN, FRIEDMAN, 2017; GUILLAMET, et al., 2018). A primeira cultura de sangue, realizada em nossa instituição, detectou a presença de cocos Gram-positivos nas primeiras 18 horas de incubação, após a qual a terapia com vancomicina foi iniciada, de acordo com as orientações do hospital. Uma vez que todas as culturas de sangue, subsequentes, foram positivas para isolados MSSA, a terapia empírica com vancomicina foi descalorada para oxacilina.

Estudos in vitro mostraram que OS-MRSA podem consistir de uma população heteroresistente, onde a maioria das células é suscetível a baixas concentrações de oxacilina/meticilina, mas uma pequena proporção dessas são capazes de crescer em altas concentrações do antimicrobiano (CHUNG et al., 2016; KAMPF et al., 2003; IKONOMIDIS et al., 2008; PHAKU et al., 2016; PROUXL et al., 2016; SAKOULAS et al.,

2001;; WITTE, PASEMANN, CUNY, 2007). Além disso, a subpopulação resistente tem, muitas vezes, elevado nível de resistência, apresentando altos valores CIM na exposição a oxacilina (CHUNG et al., 2016; PROULX et al., 2016). Em estudo conduzido por Prouxl et al., 2016, é notável como os autores relataram a reversão, in vivo, de susceptibilidade à meticilina, para resistência, em isolados de *S. aureus* *mecA*-positivo, meticilina sensíveis, durante a terapia antimicrobiana. Eles também mostraram que a reversão pode ocorrer in vitro em uma frequência de aproximadamente 10^{-7} , e a exposição a oxacilina aumentou significativamente as taxas deste evento.

O mecanismo pelo qual alguns isolados OS-MRSA exibem susceptibilidade a oxacilina é ainda obscura, porém algumas evidências tem contribuído para uma melhor compreensão da natureza deste fenótipo: 1) o elemento transposável, *IS1181*, inserido no gene *mecA* evita a expressão do PBP2a, sendo retirado do gene na presença de oxacilina, restaurando o fenótipo resistente (PROUXL et al., 2016). 2) A deleção de um único nucleotídeo na região codificadora terminal N- da PBP2a, região com função ainda desconhecida, produz um códon precoce de parada no gene *mecA*, para isolados sensíveis, e a inserção de um nucleotídeo na mesma região reverte para o fenótipo resistente (PROUXL et al., 2016). 3) Mutações em genes que codificam proteínas envolvidas na biossíntese da ponte de pentaglicina, *femXAB* podem afetar a formação da parede celular, mas não a susceptibilidade a oxacilina (GIANNOULI et al., 2010; PHAKU et al., 2016) 4) Um plasmídeo-codificado não-funcional truncado na região terminal N- do gene *blaR1* leva à repressão do gene *mecA*, mesmo na presença de β -lactâmicos (SABAT et al., 2015). Em conjunto, esses dados indicam que a detecção do gene *mecA*, em *S. aureus*, não é suficiente para prever os fenótipos de resistência.

No presente estudo a identificação de *S. aureus*, fenotipicamente sensíveis à oxacilina, pode ter favorecido o desfecho clínico desfavorável da paciente. Embora ainda não hajam dados definitivos sobre a prevalência do fenótipo OS-MRSA em nossa instituição, nossas descobertas destacam a necessidade de testes adicionais para distinguir, com precisão, entre os diversos fenótipos antimicrobianos apresentados por *S. aureus*, que não são realizadas rotineiramente pelos laboratórios de microbiologia clínica no Brasil. Os dados, a partir desses ensaios, ajudaria os clínicos na escolha da terapia antimicrobiana mais adequada para cada paciente.

AGRADECIMENTOS

Duarte, F.C. foi apoiado por uma bolsa de estudos da Fundação Araucária-PR. Yamada-Ogatta, S.F. foi apoiada por uma bolsa de pesquisa do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq). Tavares, E.R. foi apoiado por uma bolsa de pós-doutoramento da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES). Agradecemos a Camargo, R. pela edição inglesa do manuscrito.

CONTRIBUIÇÃO DOS AUTORES

F.C.D.: Contribuiu para todas as atividades metodológicas, análise e interpretação dos dados; T.D., E.R.T e A.E.B.M.: auxiliaram na realização dos experimentos microbiológicos e análise dos dados; L.M.Y. e C.M.C.G.: auxiliaram na interpretação dos dados e revisão crítica do manuscrito. G.K, S.F.Y.-O.e M.R.E.P.: contribuíram na concepção, design, análise e interpretação dos dados. Todos os autores leram e aprovaram o manuscrito final.

REFERÊNCIAS

- ALEIXANDRE-GÓRRIZ, I. et al. Prevalence of *Staphylococcus aureus* carriers of *mecA* gene susceptible to cefoxitine: OS-MRSA. **Rev Esp Quimioter** 2014;27:215-6.
- ANDRADE-FIGUEIREDO, M., LEAL-BALBINO, T.C. Clonal diversity and epidemiological characteristics of *Staphylococcus aureus*: high prevalence of oxacillin-susceptible *mecA*-positive *Staphylococcus aureus* (OS-MRSA) associated with clinical isolates in Brazil. **BMC Microbiol** 2016;16:115.
- BECKER, et al. Plasmid-encoded transferable *mecB*-mediated methicillin resistance in *Staphylococcus aureus*. **Emerg Infect Dis** 2018;24:242-8.
- BONE, R.C. et al. Definitions for sepsis and organ failure and guidelines for the use of innovative therapies in sepsis. The ACCP/SCCM Consensus Conference Committee. American College of Chest Physicians/Society of Critical Care Medicine. **Chest** 1992;101:1644-55.
- CHEN, F.J. et al. *mecA*-positive *Staphylococcus aureus* with low-level oxacillin MIC in Taiwan. **J Clin Microbiol** 2012;50:1679-83.
- CHUNG, M. et al. Heterogeneous oxacillin-resistant phenotypes and production of PBP2a by oxacillin-susceptible/*mecA*-positive MRSA strains from Africa. **J Antimicrob Chemother** 2016;71:2804-9.
- CONCEIÇÃO, T. et al. Frequent occurrence of oxacillin-susceptible *mecA*-positive *Staphylococcus aureus* (OS-MRSA) strains in two African countries. **J Antimicrob Chemother** 2015;70:3200-4.
- CLSI - Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing. 27th ed. CLSI supplement M100 (ISBN 1-56238-804-5 [Print]; ISBN 1-56238-805-3 [Electronic]). Clinical and Laboratory Standards Institute, 950 West Valley Road, Suite 2500, Wayne, Pennsylvania 19087 USA, 2018.
- DE OLIVEIRA, C.F. et al. Molecular and phenotypic characteristics of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolated from hospitalized patients. **J Infect Dev Ctries** 2015;9:743-51.
- DUARTE, F.C. et al. Bacteremia causada por *Staphylococcus aureus*: uma análise de quinze anos da sensibilidade a antimicrobianos em um hospital terciário do Brasil. **Rev Epidemiol Control Infect** 2018; in press.
- FIGUEIREDO, A.M.S. What is behind the epidemiological difference between community-acquired and health-care associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. **Virulence** 2017;8:640-2.
- FORBES, et al. Unusual form of oxacillin resistance in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clinical strains. **Diagn Microbiol Infect Dis** 2008;61:387-95.

GIANNOULI, S. et al. Detection of mutations in the FemXAB protein family in oxacillin-susceptible *mecA*-positive *Staphylococcus aureus* clinical samples. **J Antimicrob Chemother** 2010;65:626-33.

GUILLAMET, M.C.V. et al. Host-pathogen-treatment triad: host factors matter most in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* bacteremia outcomes. **Antimicrob Agents Chemother** 2018;62:pil:e01902-17.

HASSOUN, A., LINDEN, P.K., FRIEDMAN, B. Incidence, prevalence, and management of MRSA bacteremia across patient populations-a review of recent developments in MRSA management and treatment. **Crit Care** 2017;21:211.

HE, W. et al. Prevalence and molecular typing of oxacillin-susceptible *mecA*-positive *Staphylococcus aureus* from multiple hospitals in China. **Diagn Microbiol Infect Dis** 2013;77:267-9.

HIRAMATSU, K. et al. Multi-drug-resistant *Staphylococcus aureus* and future chemotherapy. **J Infect Chemother** 2014;20:593-601.

HIROTAKI, S. et al. Rapid and accurate identification of human-associated *staphylococci* by use of multiplex PCR. **J Clin Microbiol** 2011;49:3627-31.

HOSOSAKA, et al. Characterization of oxacillin-susceptible *mecA*-positive *Staphylococcus aureus*: a new type of MRSA. **J Infect Chemother** 2007;13:79-86.

HO, C.M. et al. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates with SCC*mec* type V and *spat* types t437 or t1081 associated to discordant susceptibility results between oxacillin and cefoxitin, Central Taiwan. **Diagn Microbiol Infect Dis** 2016;86:405-11.

IKONOMIDIS, et al. *In vitro* and *in vivo* evaluations of oxacillin efficiency against *mecA*-positive oxacillin-susceptible *Staphylococcus aureus*. **Antimicrob Agents Chemother** 2008;52:3905-8.

JANNATI, E. et al. Nasal colonization of *mecA*-positive, oxacillin-susceptible, methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates among nursing staff in an Iranian teaching hospital. **Am J Infect Control** 2013;41:1122-4.

JONES, D. et al. A retrospective analysis of treatment and clinical outcomes among patients with methicillin-susceptible *Staphylococcus aureus* bloodstream isolates possessing detectable *mecA* by a commercial PCR assay compared to patients with methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* bloodstream isolates. **Antimicrob Agents Chemother** 2017;62:pil:e01396-17.

KAMPF, et al. Inducibility and potential role of *mecA*-gene-positive oxacillin-susceptible *Staphylococcus aureus* from colonized healthcare workers as a source for nosocomial infections. **J Hosp Infect** 2003;54:124-9.

- LILLIEBRIDGE, R.A. et al. The utility of high-resolution melting analysis of SNP nucleated PCR amplicons-an MLST based *Staphylococcus aureus* typing scheme. **PLoS One** 2011;6:e19749.
- MILHEIRIÇO, C., OLIVEIRA, D.C., de LENCASTRE, H. Update to the multiplex PCR strategy for assignment of *mec* element types in *Staphylococcus aureus*. **Antimicrob Agents Chemother** 2007;51:3374-7.
- PHAKU, P. et al. Unveiling the molecular basis of antimicrobial resistance in *Staphylococcus aureus* from the Democratic Republic of the Congo using whole genome sequencing. **Clin Microbiol Infect** 2016;22:644.
- PROUXL, M.K. et al. Reversion from methicillin susceptibility to methicillin resistance in *Staphylococcus aureus* during treatment of bacteremia. **J Infect Dis** 2016;213:1041-8.
- POURNARAS, S. et al. Driving Forces of Mechanisms Regulating Oxacillin-Resistance Phenotypes of MRSA: Truly Oxacillin-Susceptible *mecA*-Positive *Staphylococcus aureus* Clinical Isolates also Exist. **Curr Pharm Des** [Internet]. 2015 Apr 27;21(16):2048–53. Available from: <http://www.eurekaselect.com/openurl/content.php?genre=article&issn=1381-6128&volume=21&issue=16&spage=2048>
- SABAT, A.J. et al. Whole-genome analysis of an oxacillin-susceptible CC80 *mecA*-positive *Staphylococcus aureus* clinical isolate: insights into the mechanisms of cryptic methicillin resistance. **J Antimicrob Chemother** 2015;70:2956-64.
- SAEED, K. et al. Oxacillin-susceptible methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (OS-MRSA), a hidden resistant mechanism among clinically significant isolates in the Wessex region/UK. **Infection** 2014;42:843-7.
- SAKOULAS, G. et al. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: comparison of susceptibility testing methods and analysis of *mecA*-positive susceptible strains. **J Clin Microbiol** 2001;39:3946-51.
- SEAS, C. et al. Latin America Working Group on Bacterial Resistance. *Staphylococcus aureus* bloodstream infections in Latin America: results of a multinational prospective cohort study. **J Antimicrob Chemother** 2018;73:212-22.
- SINGER, M. et al. The Third International Consensus Definition for Sepsis and Septic Shock (Sepsis-3). **JAMA** 2016;315:801-10.
- SHARFF, K.A. et al. Genotypic resistance testing creates new treatment challenges: two cases of oxacillin-susceptible methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. **J Clin Microbiol** 2012;50:4151-3.
- SONG, Y. et al. Characterization of clinical isolates of oxacillin-susceptible *mecA*-positive *Staphylococcus aureus* in China from 2009 to 2014. **J Glob Antimicrob Resist** 2017;11:1-3.
- VON EIFF, C. et al. Nasal carriage as a source of *Staphylococcus aureus* bacteremia. Study Group. **N Engl J Med** 2001;344:11-6.

WERTHEIM, H.F. et al. The role of nasal carriage in *Staphylococcus aureus* infections. **Lancet Infect Dis.** 2005;5:751-62.

WITTE, W., PASEMANN, B., CUNY, C. Detection of low-level oxacillin resistance in *mecA*-positive *Staphylococcus aureus*. **Clin Microbiol Infect** 2007;13:408-12.

6.4 ARTIGO 4

Genoma completo de *Staphylococcus aureus*, OS-MRSA, Sequence Type 1, Complexo Clonal 1, SCCmec IV, isolado de um paciente com choque séptico em um hospital terciário do sul do Brasil.

Duarte, Felipe Crepaldi ^a, Tavares, Eliandro Reis ^{b,c}, Danelli, Tiago ^a, Yamauchi, Lucy Megumi ^b, Yamada-Ogatta, Sueli Fumie ^{b*} and Perugini, Marcia Regina Eches ^a.

Programa de Mestrado em Fisiopatologia Clínica e Laboratorial. Departamento de Patologia, Análises Clínicas e Toxicológicas, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Estadual de Londrina, Londrina, Paraná, Brasil^a.

Laboratório de Biologia Molecular de Microrganismos. Departamento de Microbiologia, Centro de Ciências Biológicas, Universidade Estadual de Londrina, Londrina, Paraná, Brasil^b.

Bolsista do Programa Nacional de Pós-Doutorado (PNPD / CAPES) do Programa de Pós-Graduação em Microbiologia. Departamento de Microbiologia, Centro de Ciências Biológicas, Universidade Estadual de Londrina, Londrina, Paraná, Brasil^c.

[*]. Sueli Fumie Yamada-Ogatta. Departamento de Microbiologia, Centro de Ciências Biológicas, Universidade Estadual de Londrina. Rodovia Celso Garcia Cid, PR445, km380, Campus Universitário. CEP 86057-970. Londrina, Paraná, Brazil. Phone: +55 43 3371 - 5503. E-mail: ogatta@uel.br

RESUMO

Staphylococcus aureus 549, oriundo de uma infecção da corrente sanguínea, de um paciente com choque séptico, foi classificado com o ST1 e CC1. Com a análise do genoma completo foi observado que esse isolado, embora tenha sido classificado, fenotipicamente, como sensível à meticilina, conduz o gene *mecA*, responsável pela resistência aos agentes de β -lactâmicos.

ABSTRACT

Staphylococcus aureus 549 from a blood stream infection of a septic shock patient, classified with ST1 and CC1. With the whole genome analysis we could see that this strain, although it has been shown to be sensitive to methicillin, phenotypically carries the *mecA* gene, been resistant to beta β -agents.

Staphylococcus aureus resistente à meticilina (MRSA) é um microorganismo geneticamente diverso. Isolados pertencentes à essa espécie apresentam grande variabilidade genética e estão espalhados por todo o mundo (HISATSUNE et al., 2017). *S. aureus* foi primeiramente descrito em pacientes hospitalizados, no entanto, atualmente são classificados, também, como agente causador de infecções comunitárias (HAU et al., 2017). Esses isolados, muitas vezes relacionados a processos infecciosos, têm um alto potencial para se tornar resistente aos antimicrobianos (LINDSAY; HOLDEN, 2004; LIN, KOSKELLA, LIN, 2017). Ao redor do mundo é possível notar um aumento de microorganismos multi-droga resistentes (MDR), o que para o paciente, dificulta o tratamento e piora o prognóstico (ODUOR et al., 2016). De acordo com Boucher et al. 2009, na América do Norte, mais mortes, no ambiente hospitalar, foram ocasionadas por isolados MRSA do que aquelas causadas pelo vírus do HIV e *Mycobacterium tuberculosis* combinados. Neste trabalho, mostramos o sequenciamento genômico completo de um isolado de *S. aureus* que causou choque séptico em uma paciente de 43 anos em um hospital terciário do sul do Brasil. Esse isolado pertence ao Complexo Clonal (CC) 1 e *Sequence Typing* (ST) 1. Os isolados bacterianos agrupados nesse CC e ST são frequentemente associados com infecções adquiridas na comunidade. Esses microorganismos, prioritariamente, são encontrados em países europeus e em animais de convívio rural. Esses isolados parecem ser bactérias muito adaptáveis, ajustando-se às condições de seu hospedeiro, seja ele animal ou humano (LOZANO et al., 2011). Após a

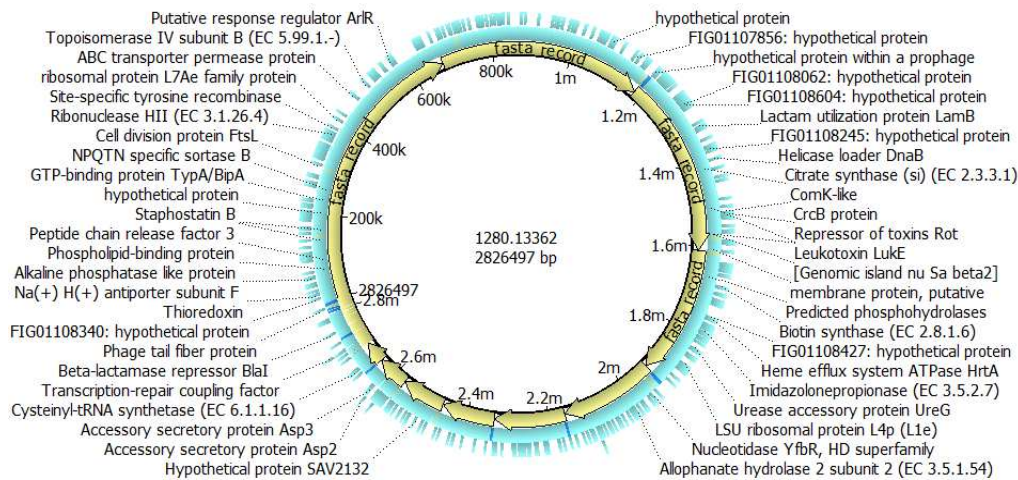
análise genômica, observou-se que, além de outros genes, esse isolado, que era sensível à meticilina in-vitro, transportava o gene *mecA*, responsável por codificar uma proteína que gera falha terapêutica para agentes β -lactâmicos. Assim, esse microrganismo é classificado como oxacilina-sensível MRSA (OS- MRSA) (CHUNG et al., 2016).

S. aureus, resgatado de uma amostra clínica de cultura sanguínea e estocado no banco de bactérias do laboratório de microbiologia do Hospital Universitário de Londrina (HUL), foi cultivado em ágar *Brain Heart Infusion* (BHI), à 37°C, por 24 horas. Após incubação, três a cinco colônias foram transferidas para caldo BHI e incubado em estufa 37°C durante 24 horas, sob agitação de 200 rpm. Essa cultura foi utilizada para obtenção do DNA total. Seguindo o crescimento bacteriano, como descrito acima, o DNA total foi recuperado utilizando o kit comercial *Sigma Aldrich GenElute™ 2010*, seguindo as recomendações do fabricante.

Uma vez que o DNA total foi obtido e avaliado, o material genético foi submetido ao sequenciamento total na empresa brasileira de pesquisa agropecuária - Embrapa-Soja, unidade de Londrina utilizando a plataforma MiSeq® (Illumina) com o reagent MiSeq v3 (600 ciclos) na estratégia de parada de 2 x 300. Após obtenção da sequência de leitura, a qualidade foi avaliada usando a ferramenta *Fast Quality Control* (FastQC) para determinar o índice de qualidade Phred (Q). Todos os contigs construídos seguiram os parâmetros padrões da plataforma de computação *Genomics Workbench CLC* versão 10 (bio CLC, Dinamarca - bioinformática QIAGEN). A anotação *denovo* foi feita usando o algoritmo de Bruijn, gráficos disponível na plataforma CLC bio. O arquivo com as sequências construídas foi submetido ao alinhamento de sequências e pesquisa de proteínas codificadoras utilizando a plataforma BLASTx. Os dados foram gerados e analisados através do aplicativo Blast2GO.

O mapeamento de sequências com alinhamento significativo foi obtido usando o banco de dados *Gene Ontology*. Para determinar a anotação funcional, os dados sequenciados foram enviados para os bancos de dados KEGG para determinar as possíveis vias metabólicas associadas aos códigos enzimáticos. Após toda a montagem e anotação funcional de genes, foi realizada uma verificação para identificar o gene *mecA* e outros possíveis componentes genéticos associados a falha na terapia com agentes β -lactâmicos, fatores de resistência e virulência.

Por último, depois de todas as análises realizadas, foi obtido um total de 2.8260,497 pb inseridas em 36 contigs com N50 de 430,944. Foram observadas 2,663 sequências de codificação e 84 RNAs (figura 1).

Figura 1. Genoma Circular *S. aureus* 549

Embora o isolado estudado tenha apresentado, *in vitro*, sensibilidade a oxacilina (cefotaxima), houve amplificação do gene *mecA* na análise por PCR. Após o sequenciamento, foi realizado alinhamento do gene *mecA* com um isolado de referência (*S. aureus* NCTC 8325), obtendo 98% de similaridade entre os genes. Através do software *BioEdit 7.2.5* e *Clustal Ω*, foi observado a existência de duas modificações nos nucleotídeos 435 e 552, que alteram a codificação do aminoácido tirosina para histidina (figura 2).

Além de ser um OS-MRSA, que apresenta falha terapêutica quando o paciente é tratado com agentes β -lactâmicos, este isolado tem uma grande variedade de genes de virulência e resistência (CHUNG et al., 2016). Analisando o genoma observou-se a presença de genes codificadores de adesinas, como proteínas de adesão extracelular de ampla especificidade Eap/mapa; Proteínas ancoradoras como *SasA*; *SasC*; *SasD*; *SasF*; *SasH*. Capacidade para formação de biofilme, (família *AraC/XylS*) e operon *icaA*. Resistência à bacitracina mediada por genes *YvcR*; *BceA*; *BceB*; *BceR*; *BceS*; *Yvcp*. Produção da enzima β -lactamase, genes de resistência para teicoplanina mediada: *TcaA*; *TcaB* e *TcaR*, além do regulador de resistente a múltiplas drogas. Foi observada resistência para as fluoroquinolonas, mediada por *gyrA* e *ParC* e resistência a múltiplas drogas mediada por bomba de efluxo da família MATE. Além de resistência a múltiplas drogas, o isolado também apresentava genes de resistência para metais pesados, como cádmio, cobalto, arsênio, mercúrio e outros. Ainda foram encontradas as sequências de inserção *IS1541*, relacionadas com algumas espécies de *Yersinia spp.* e *IS1272*, descrita em alguns isolados de *S. aureus* com deleção no fragmento *mecRI* (DEVALCKENAERE et al., 1999; KOBAYASHI et al., 1999).

Ainda, as ligases do tipo *fem* (*glycyl-tRNA-dependent ligase*), em *S. aureus*, são importantes para formação e maturação do peptidoglicano. Isolados que contenham mutações nos genes do complexo *fem*, e conduzam o gene *mecA*, apresentam sensibilidade fenotípica a oxacilina (OS-MRSA), exibem baixa concentração inibitória mínima para o fármaco e alterações na síntese de parede celular bacteriana. (POURNARAS et al.,2015). O isolado de *S. aureus* sequenciado apresentou, em seu genoma, presença do gene *femC* com mutação em um de seus nucleotídeos. Esta mudança de base muda o aminoácido a ser codificado pelo isolado, que originalmente seria uma valina, para isoleucina (figura 3).

Número de Acesso:

O genôma completo do isolado *S. aureus* 549 foi depositado no DDBJ / ENA / GenBank sob o número de acesso PGGL00000000. A versão descrita nesse artigo é: PGGL01000000. *BioProject* ID PRJNA416852 e *BioSample* SAMN07967050.

Figura 2. Alteração de nucleotídeos no gene *mec*.

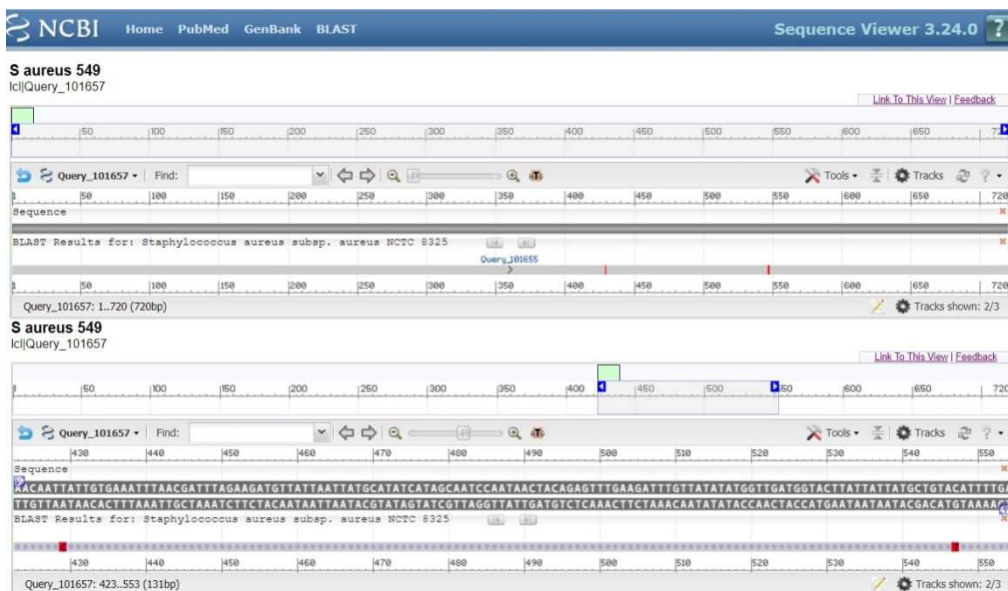
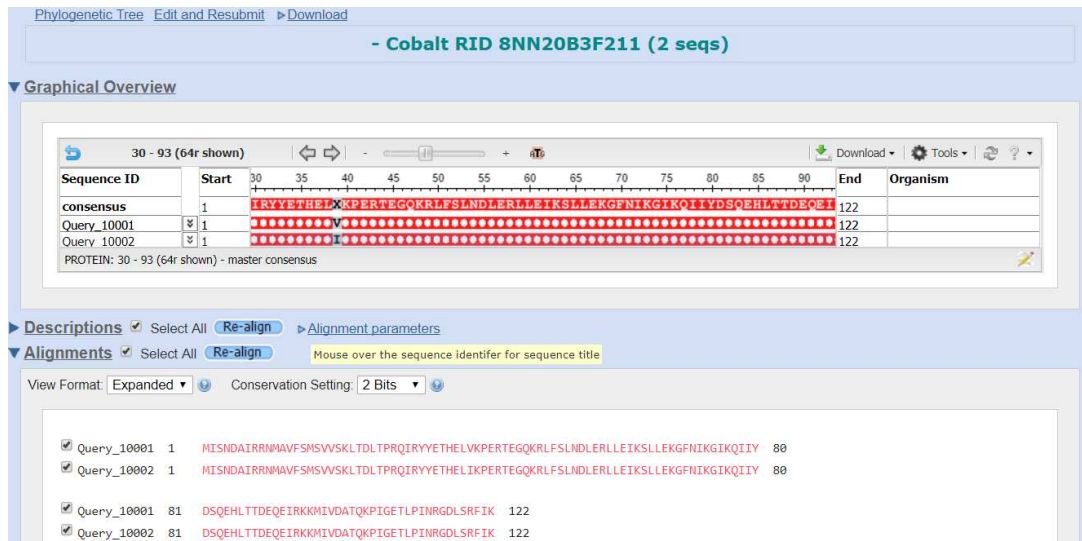


Figura 3. Alinhamento para o gene *femCno* isolado *S. aureus* 549.



Query_10001: Standard Fem gene in *S. aureus*; Query_10002: FemC gene on *S. aureus* 549.

AGRADECIMENTOS

Agradecemos a todos os envolvidos nessa pesquisa. Agradecemos ao laboratório da Professora Dra. Mariangela Hungria da Cunha (EMPBRAPA soja - PR) onde foi realizado o sequenciamento genômico total do isolado descrito. Agradecemos ao laboratório de Biologia Molecular de microorganismos da Universidade Estadual de Londrina que realizou a montagem e análise de todos os fragmentos sequenciados. Agradecemos o apoio financeiro da CAPES e Fundação Araucária - PR.

REFERÊNCIAS

BOUCHER, Helen W. et al. Bad Bugs, No Drugs: No ESKAPE! An Update from the Infectious Diseases Society of America. *Clinical Infectious Diseases*, Volume 48, Issue 1, 1 January 2009, Pages 1–12. <http://doi.org/10.1086/595011>

CHUNG, M. et al. Heterogeneous oxacillin-resistant phenotypes and production of PBP2A by oxacillin-susceptible/ *mecA* -positive MRSA strains from Africa. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, v. 71, n. 10, p. 2804–2809, out. 2016. <http://doi:10.1093/jac/dkw209>

DEVALCKENAERE, A. et al. Characterization of IS1541-like elements in *Yersinia enterocolitica* and *Yersinia pseudotuberculosis*. *FEMS Microbiol Lett* [Internet]. 1999 Jul 1;176(1):229–33. Available from: [http://doi.wiley.com/10.1016/S0378-1097\(99\)00240-2](http://doi.wiley.com/10.1016/S0378-1097(99)00240-2)

HAU, S.J. et al. Genome Sequence of a Livestock-Associated Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Sequence Type 5 Isolate from the United States. *Genome Announc*. 2017 Aug; 5(32): e00791-17. Published online 2017 Aug 10. <http://doi.org/10.1128/genomeA.00791-17>

HISATSUNE, Junzo. et al. Complete Genome Sequence of Systemically Disseminated Sequence Type 8 Staphylococcal Cassette Chromosome *mec* Type IV1 Community-Acquired Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*. *Genome Announc*. 2017 Aug 31;5(35). pii: e00852-17. <http://doi.org/10.1128/genomeA.00852-17>.

KOBAYASHI, N. et al. Distribution of insertion sequence-like element IS1272 and its position relative to methicillin resistance genes in clinically important *Staphylococci*. *Antimicrob Agents Chemother* [Internet]. 1999 Nov;43(11):2780–2. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10543763>

LIN, Derek M.; KOSKELLA, Britt and LIN, Henry C. Phage therapy: An alternative to antibiotics in the age of multi-drug resistance. *World J Gastrointest Pharmacol Ther*. 2017 Aug 6; 8(3): 162–173. Published online 2017 Aug 6. <http://doi.org/10.4292/wjgpt.v8.i3.162>

LINDSAY, Jodi A.; and HOLDEN, Matthew T.G. *Staphylococcus aureus*: superbug, super genome? *TRENDS in Microbiology*. Vol.12 No.8 August 2004. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.tim.2004.06.004>

LOZANO, Carmen. et al. Dynamic of nasal colonization by methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* ST398 and ST1 after mupirocin treatment in a family in close contact with pigs. *Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases*. Volume 34, Issue 1, January 2011, Pages e1-e7 <http://doi.org/10.1016/j.cimid.2010.06.006>

ODUOR, Joseph M. et al. Ochieng' Experimental phage therapy against haematogenous multi-drug resistant *Staphylococcus aureus* pneumonia in mice. *Afr J Lab Med*. 2016; 5(1): 435. Published online 2016 Sep 30. <http://doi.org/10.4102/ajlm.v5i1.435>

POURNARAS, S. et al. Driving Forces of Mechanisms Regulating Oxacillin-Resistance Phenotypes of MRSA: Truly Oxacillin-Susceptible *mecA*-Positive *Staphylococcus aureus* Clinical Isolates also Exist. **Curr Pharm Des** [Internet]. 2015 Apr 27;21(16):2048–53. Available from: <http://www.eurekaselect.com/openurl/content.php?genre=article&issn=1381-6128&volume=21&issue=16&spage=2048>

7 CONCLUSÃO

Analisando 720 amostras de *S. aureus*, coletados de pacientes internados no HUL com bacteremia em um período de quinze anos, foi observado que a resistência bacteriana para os antimicrobianos penicilina, oxacilina, ciprofloxacina, eritromicina e clindamicina apresentou elevados índices de resistência, com tendência de aumento durante o período avaliado. Entretanto, para os fármacos gentamicina, rifampicina, tetraciclina e sulfametoxazol-trimetoprima ocorreu o contrário, apresentando os menores índices de resistência. Ao analisar a vancomicina, entre os anos de 2011 a 2015, evidenciou-se um aumento das concentrações inibitórias mínimas. Esses dados mostram que, no HUL, durante o período analisado, uma mudança clonal parece ter ocorrido. Com as análises moleculares de 105 amostras de *S. aureus* isolados de sangue e secreção traqueal, essa inferência ganhou poder, pois foram encontrados quatro tipos de elementos SCCmec presentes no hospital, sendo o tipo II o mais frequente, seguido pelos tipos I; IV e III, esse último, outrora tido como sendo o clone epidêmico brasileiro, conforme dados da literatura, não está presente no hospital de forma significativa. Quanto aos CC e ST's, ampla diversidade genética foi relatada no HUL, sendo o ST63 e o CC5 os mais prevalentes no hospital. Ainda, foi constatado que, no HUL, existem cepas OS-MRSA como agente causador de infecções graves. Diante do exposto, ressaltamos a importância da vigilância contínua e conhecimento da epidemiologia local de isolados de *S. aureus*.

REFERÊNCIAS

- ABOUALIZADEH, E. et al. Understanding the antimicrobial activity of selected disinfectants against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). **PLOS ONE**, v. 12, n. 10, p. e0186375, 16 out. 2017.
- AGABOU, A. et al. Emergence of Nasal Carriage of ST80 and ST152 PVL+ *Staphylococcus aureus* Isolates from Livestock in Algeria. **Toxins**, v. 9, n. 10, p. 303, 25 set. 2017.
- ANVISA - AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. Critérios Diagnósticos de Infecção Relacionada à Assistência à Saúde 2. 2017. Disponível em: <http://portal.anvisa.gov.br/documents/33852/3507912/Caderno+2+-+Crit%C3%A9rios+Diagn%C3%B3sticos+de+Infec%C3%A7%C3%A3o+Relacionada+%C3%A0+Assist%C3%A2ncia+%C3%A0+Sa%C3%BAde/7485b45a-074f-4b34-8868-61f1e5724501>. Acessado em: 08/03/2018
- ARIAS, Cesar A. et al. A Prospective Cohort Multicenter Study of Molecular Epidemiology and Phylogenomics of *Staphylococcus aureus* Bacteremia in Nine Latin American Countries. **Antimicrob Agents Chemother**. 22;61(10). Set. 2017.
- AKANBI, O. E. et al. Antimicrobial Susceptibility of *Staphylococcus aureus* Isolated from Recreational Waters and Beach Sand in Eastern Cape Province of South Africa. **International Journal of Environmental Research and Public Health**, v. 14, n. 9, p. 1001, 1 set. 2017.
- AMMERLAAN, H. S. M. et al. Secular Trends in Nosocomial Bloodstream Infections: Antibiotic-Resistant Bacteria Increase the Total Burden of Infection. **Clinical Infectious Diseases**, v. 56, n. 6, p. 798–805, 15 mar. 2013.
- ANDRADE-FIGUEIREDO, M.; LEAL-BALBINO, T. C. Clonal diversity and epidemiological characteristics of *Staphylococcus aureus*: high prevalence of oxacillin-susceptible mecA-positive *Staphylococcus aureus* (OS-MRSA) associated with clinical isolates in Brazil. **BMC Microbiology**, v. 16, n. 1, p. 115, 21 dez. 2016.
- ARSHAD, S. et al. Ceftaroline fosamil monotherapy for methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* bacteremia: a comparative clinical outcomes study. **International Journal of Infectious Diseases**, v. 57, p. 27–31, abr. 2017.
- AYKAC, K.; OZSUREKCI, Y.; BASARANOGLU, S. T. Future Directions and Molecular Basis of Ventilator Associated Pneumonia. **Can Respir J**. v. 2017, n. i, 2017.
- BEAUDOIN, T. et al. *Staphylococcus aureus* interaction with *Pseudomonas aeruginosa* biofilm enhances tobramycin resistance. **npj Biofilms and Microbiomes**, v. 3, n. 1, p. 25, 19 dez. 2017.
- BESSESEN, M. T. et al. MRSA colonization and the nasal microbiome in adults at high risk of colonization and infection. **Journal of Infection**, v. 71, n. 6, p. 649–657, dez. 2015.
- BRADLEY, A. Ford. mecC-Harboring Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*: Hiding in Plain Sight. **Journal of Clinical Microbiology**. 2017 Dec 26;56(1). pii: e01549-17. doi: 10.1128/JCM.01549-17. Print 2018 Jan.
- CALFEE, David P. Trends in Community Versus Health Care-Acquired Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Infections. **Curr Infect Dis Rep**. 19:48. 03 Nov 2017.

CAMPBELL, S. J. et al. Genotypic characteristics of *Staphylococcus aureus* isolates from a multinational trial of complicated skin and skin structure infections. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 46, n. 2, p. 678–684, 2008.

CDC – Centers for Diseases Control and Prevention. **Antibiotic Resistance Threats in United States, 2013**. Disponível em: <https://www.cdc.gov/drugresistance/threat-report-2013/pdf/ar-threats-2013-508.pdf#page=5>. Acesso em 07 mar 18.

CDC – Centers for Diseases Control and Prevention. **Health Status of and Intervention for US-Bound Kosovar Refugees—Fort Dix, New Jersey, May–July 1999**. Morbidity and Mortality Weekly Report. v.48, p.729-739. 1999.

CDC – Centers for Diseases Control and Prevention. National Center for Health Statistics. **Health, United States, 2015: With Special Feature on Racial and Ethnic Health Disparities**. Hyattsville, MD. 2016. Disponível em: [https://www.cdc.gov/nchs/data/15.pdf](https://www.cdc.gov/nchs/data/hus/15.pdf). Acessado em: 08/03/2018.

Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing. 28th ed. **CLSI supplement M100** (ISBN 1-56238-838-X [Print]; ISBN 1-56238-839-8 [Electronic]). Clinical and Laboratory Standards Institute, 950 West Valley Road, Suite 2500, Wayne, Pennsylvania 19087 USA, 2018.

CHANG, I.; SCHIBLER, A. Ventilator Associated Pneumonia in Children. **Paediatric Respiratory Reviews**, v. 20, p. 10–16, 2016.

CHAUDHARI, Surg Cdr C.N. et al. Heterogeneous vancomycin-intermediate among methicillin resistant *Staphylococcus aureus*. **Medical Journal Armed Forces India**. v. 71. pag 15-18. 2015

CHAMBERS Henry F.; DELEO, Frank R. Waves of resistance: *Staphylococcus aureus* in the antibiotic era. **NATURE REVIEWS**. v.7, p.629-641. Set 2009.

CHUNG, M. et al. Heterogeneous oxacillin-resistant phenotypes and production of PBP2A by oxacillin-susceptible/ *mecA* -positive MRSA strains from Africa. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 71, n. 10, p. 2804–2809, out. 2016.

DAVID, M. Z.; DAUM, R. S. Community-Associated Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*: Epidemiology and Clinical Consequences of an Emerging Epidemic. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 23, n. 3, p. 616–687, 1 jul. 2010.

DANTES, Raymund et al. National Burden of Invasive Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Infections, United States, 2011. **JAMA**. 173(21):1970-1978. 2013.

DAYAN, G. H. et al. *Staphylococcus aureus* : the current state of disease, pathophysiology and strategies for prevention. **Expert Review of Vaccines**, v. 15, n. 11, p. 1373–1392, 9 nov. 2016.

DEURENBERG, Ruud H. et al. Application of next generation sequencing in clinical microbiology and infection prevention. **Journal of Biotechnology**. v:243. p:16–24. 2017. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jbiotec.2016.12.022>

DSMZ - Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen. **Prokaryotic Nomenclature Up-to-Date**. 2015. Disponível em: <https://www.dsmz.de/bacterialdiversity/prokaryotic-nomenclature-up-to-date/prokaryotic-nomenclature-up-to-date.html>. Acesso em: 07 mar 18.

ECDC - European Centre for Disease Prevention and Control. **Antimicrobial resistance surveillance in Europe 2015**. Annual Report of the European Antimicrobial Resistance Surveillance Network (EARS-Net). Stockholm: ECDC; 2017. Disponível em: <https://ecdc.europa.eu/sites/portal/files/media/en/publications/Publications/antimicrobial-resistance-europe-2015.pdf>. Acessado dia 07 mar 18.

ENRIGHT, M. C.; SPRATT, B. G. Multilocus sequence typing. **Trends in Microbiology**, v. 7, n. 12, p. 482–487, 1999.

ENRIGHT, Mark C. et al. The evolutionary history of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). **PNAS** v. 99, n. 11, p. 7687–7692. 28 Maio 2002.

FEIL, E. J. et al. eBURST: Inferring Patterns of Evolutionary Descent among Clusters of Related Bacterial Genotypes from Multilocus Sequence Typing Data. **Journal of Bacteriology**, v. 186, n. 5, p. 1518–1530, 1 mar. 2004.

FIGUEIREDO, Agnes Marie Sá; FERREIRA, Fabienne Antunes. The multifaceted resources and microevolution of the successful human and animal pathogen methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. **Mem Inst Oswaldo Cruz**. 109(3): 265–278. Jun. 2014.

GALAL, Y. S.; YOUSSEF, M. R. L.; IBRAHIEM., S. K. Ventilator-Associated Pneumonia: Incidence, Risk Factors and Outcome in Paediatric Intensive Care Units at Cairo University Hospital. **JOURNAL OF CLINICAL AND DIAGNOSTIC RESEARCH**, v. 10, n. September 2014, p. 6–11, 2016.

GARCÍA-FERNÁNDEZ, E. et al. Membrane Microdomain Disassembly Inhibits MRSA Antibiotic Resistance. **Cell**, p. 1–14, nov. 2017.

GOTO, M. et al. Association of evidence-based care processes with mortality in staphylococcus aureus bacteremia at veterans health administration hospitals, 2003-2014. **JAMA Intern Med**. v. 52246, n. 10, p. 1489–1497, 2017.

GALES, Ana C. et al. Antimicrobial susceptibility of gram-positive bacteria isolated in brazilian hospitals participating in the SENTRY Program (2005-2008). **Brazilian Journal of Infectious Diseases**. v.13, n.2, Apr. 2009

GARCÍA-ÁLVAREZ, Laura et al. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* with a novel *mecA* homologue in human and bovine populations in the UK and Denmark: a descriptive study. **Lancet Infect Dis**. 2011 Aug; 11(8): 595–603. doi: 10.1016/S1473-3099(11)70126-8

HANAKI, Hideaki et al. Antibiotic susceptibility survey of blood-borne MRSA isolates in Japan from 2008 through 2011. **Journal of Infection and Chemotherapy**. v.20, p.527-534. 2014

HÖGBERG, Liselotte Diaz et al. ECDC - European Centre for Disease Prevention and Control. Annual epidemiological report 2014. Antimicrobial resistance and healthcare-associated infections. Stockholm: ECDC; 2015. Stockholm, April 2015.

HARKINS, C. P. et al. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* emerged long before the introduction of methicillin into clinical practice. **Genome Biology**, v. 18, n. 1, p. 130, 20 dez. 2017.

- HARTMAN, B.; TOMASZ, A. Altered penicillin-binding proteins in methicillin-resistant strains of *Staphylococcus aureus*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 19, n. 5, p. 726–735, 1 maio 1981.
- HASSOUN, Ali; LINDEN, Peter K. and FRIEDMAN, Bruce. Incidence, prevalence, and management of MRSA bacteremia across patient populations—a review of recent developments in MRSA management and treatment. **Critical Care**. 2017; v. 21: 211. Published online 2017 Aug 14. doi: 10.1186/s13054-017-1801-3
- HEILMANN, Christine et al. Molecular basis of intercellular adhesion in the biofilm-forming *Staphylococcus epidermidis*. **Molecular Microbiology**. 20(5), p.1083-1091. 1996
- HIRAMATSU, K. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clinical strain with reduced vancomycin susceptibility. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 40, n. 1, p. 135–136, 1 jul. 1997.
- HIRAMATSU, K. et al. Multi-drug-resistant *Staphylococcus aureus* and future chemotherapy. **Journal of Infection and Chemotherapy**, v. 20, n. 10, p. 593–601, out. 2014.
- HRYNIEWICZ, Maria M. e GARBACZ, Katarzyna. Borderline oxacillin-resistant *Staphylococcus aureus* (BORSA) – a more common problem than expected? **Journal of Medical Microbiology**. 2017. v. 66. pag. 1367– 1373. DOI 10.1099/jmm.0.000585.
- SAMBROOK, Joseph.; FRITSCH, E. F.; MANIATIS, T. Molecular cloning: A laboratory manual. Second edition. Volumes 1, 2, and 3. Current protocols in molecular biology. Volumes 1 and 2. **Cell**, v. 61, n. 1, p. 17–18, abr. 1990.
- JEVONS, M. “Celbenin” - resistant *Staphylococci*. **Br Med J**. 1:124. 1961
- JOMEHPOUR, N.; ESLAMI, G.; KHALILI, M. B. The Effect of *Ferula assa-foetida* L and *Carum copticum* Hydroalcoholic Extract on the Expression Levels of *Staphylococcus aureus* Genes Involved in Quorum Sensing. **Jundishapur Journal of Microbiology**, v. 9, n. 10, p. 1–5, 14 set. 2016.
- JORGENSEN, James H.; PFALLER, Michael A.; CARROLL, Karen C.; FUNKE, Guido; LANDRY Marie Louise; RICHTER, Sandra S.; WARNOCK, David W. **Manual of Clinical Microbiology**. Eleventh Edition. Washington DC: ASM Press, 2015. 2730 p.
- JOSHI, S. et al. Novel Miniature Membrane Active Lipopeptidomimetics against Planktonic and Biofilm Embedded Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*. **Scientific Reports**, v. 8, n. 1, p. 1021, 18 dez. 2018.
- KAMBEROVIC, F. et al. mecA-positive methicillin-sensitive *Staphylococcus aureus* clinical isolates in Zenica-Doboj Canton, Bosnia and Herzegovina. **Journal of Chemother**. 2015; v. 27(6):330-6. doi: 10.1179/1973947814Y.0000000207.
- KAMPF, G. et al. Inducibility and potential role of MecA-gene-positive oxacillin-susceptible *Staphylococcus aureus* from colonized healthcare workers as a source for nosocomial infections. **Journal of Hospital Infection**, v. 54, n. 2, p. 124–129, jun. 2003.
- KEIICHI HIRAMATSU. Emergence of *Staphylococcus aureus* with Reduced Susceptibility to Vancomycin in Japan. In: **Emerging Infections in Asia**. Boston, MA: Springer US, 1998. v. 9343p. 233–242.

- KERR, D. L. et al. Toxic shock in children with bone and joint infections: a review of seven years of patients admitted to one intensive care unit. **Journal of Children's Orthopaedics**, v. 11, n. 5, p. 387–392, out. 2017.
- KHAN, A.; WILSON, B. and GOULD, I. M. Current and future treatment options for community-associated MRSA infection. **Expert Opinion on Pharmacotherapy**, ISSN: 1465-6566 (Print) 1744-7666 (Online). 26 Feb 2018. DOI: 10.1080/14656566.2018.1442826.
- KHANAL, R. et al. Nasal carriage of methicillin resistant Staphylococcus aureus among health care workers at a tertiary care hospital in Western Nepal. **Antimicrobial Resistance and Infection Control**, v. 4, n. 1, p. 39, 9 dez. 2015.
- KLUYTMANS, J. A. J. W. Methicillin-resistant Staphylococcus aureus in food products: cause for concern or case for complacency? **Clinical Microbiology and Infection**, v. 16, n. 1, p. 11–15, jan. 2010.
- KOLLEF, M. H.; MICEK, S. T. Staphylococcus Aureus Pneumonia. **Chest**, v. 128, n. 3, p. 1093–1097, set. 2005.
- KOBAYASHI, N. et al. Distribution of insertion sequence- like element IS1272 and its position relative to methicillin resistance genes in clinically important Staphylococci. **Antimicrob Agents Chemother** [Internet]. 1999 Nov;43(11):2780–2. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10543763>
- KONG, H. et al. Molecular Epidemiology and Antibiotic Resistance Profiles of Methicillin-Resistant Staphylococcus aureus Strains in a Tertiary Hospital in China. **Frontiers in Microbiology**, v. 8, n. MAY, p. 838, 12 maio 2017.
- KULANGARA, V. et al. Genotypic and phenotypic β -lactam resistance and presence of PVL gene in Staphylococci from dry bovine udder. **PLOS ONE**, v. 12, n. 11, p. e0187277, 1 nov. 2017.
- LAUPLAND, K. B. et al. The changing epidemiology of Staphylococcus aureus bloodstream infection: a multinational population-based surveillance study. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 19, n. 5, p. 465–471, maio 2013.
- LE MOING, V. et al. Staphylococcus aureus Bloodstream Infection and Endocarditis - A Prospective Cohort Study. **PLOS ONE**, v. 10, n. 5, p. e0127385, 28 maio 2015.
- LEE, K. et al. Stilbenes Reduce Staphylococcus aureus Hemolysis, Biofilm Formation, and Virulence. **Foodborne Pathogens and Disease**, v. 11, n. 9, p. 710–717, set. 2014.
- LILLIEBRIDGE, R. A. et al. The utility of high-resolution melting analysis of SNP nucleated PCR Amplicons-an MLST based Staphylococcus Aureus typing scheme. **PLoS ONE**, v. 6, n. 6, 2011.
- LOBANOVSKA, M.; PILLA, G. Penicillin's Discovery and Antibiotic Resistance: Lessons for the Future? **The Yale journal of biology and medicine**, v. 90, n. 1, p. 135–145, mar. 2017.
- MANAFI, A. et al. Molecular Epidemiology Survey of Staphylococcus aureus Pantón–Valentine Leukocidin-positive Isolated from Sanandaj, Iran. **Advanced Biomedical Research**, v. 6, n. 1, p. 87, 2017.

MCADAM, P. R. et al. Molecular tracing of the emergence, adaptation, and transmission of hospital-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 109, n. 23, p. 9107–9112, 5 jun. 2012.

MEHL, A. et al. Burden of bloodstream infection in an area of Mid-Norway 2002-2013: a prospective population-based observational study. **BMC Infectious Diseases**, v. 17, n. 1, p. 205, 11 dez. 2017.

MERRIMAN, J. A. et al. Temporal and Racial Differences Associated with Atopic Dermatitis *Staphylococcus aureus* and Encoded Virulence Factors. **mSphere**, v. 1, n. 6, p. e00295-16, 28 dez. 2016.

MENDES, Rodrigo E. et al. Surveillance for linezolid resistance via the Zyvox® Annual Appraisal of Potency and Spectrum (ZAAPS) programme (2014): evolving resistance mechanisms with stable susceptibility rates. **J Antimicrob Chemother**. 71(7):1860-5. Jul. 2016.

MILHEIRIÇO, C.; OLIVEIRA, D. C.; DE LENCASTRE, H. Update to the multiplex PCR strategy for assignment of *mec* element types in *Staphylococcus aureus*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 51, n. 9, p. 3374–3377, 2007.

MOELLERING, R. C. MRSA: the first half century. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 67, n. 1, p. 4–11, 1 jan. 2012.

MOELLERING, Robert C.Jr.; WEINBERG Arnold N. Studies on antibiotic synergism against enterococci. **J Clin Invest.**; 50(12): 2580–2584. Dec 1971.

MONACO, Monica et al. Worldwide Epidemiology and Antibiotic Resistance of *Staphylococcus aureus*. **Curr Top Microbiol Immunol**. v.409, p.21-56. 2016. doi: 10.1007/82_2016_3.

MONECKE, S. et al. A Field Guide to Pandemic, Epidemic and Sporadic Clones of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*. **PLoS ONE**, v. 6, n. 4, p. e17936, 6 abr. 2011.

MOOSAVIAN, M. et al. Typing of staphylococcal cassette chromosome *mec* encoding methicillin resistance in *Staphylococcus aureus* isolates in Ahvaz, Iran. **New Microbes New Infect**. v.21, p. 90–94. 2017.

NAIMI, T. S. Comparison of Community- and Health Care–Associated Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Infection. **JAMA**, v. 290, n. 22, p. 2976, 10 dez. 2003.

NURWIDYA, Fariz et al. Molecular Diagnosis of Tuberculosis. **Chonnam Med J.**; 54(1): 1–9. 2018. doi: 10.4068/cmj.2018.54.1.1

NOVICK, Richard P.; BOUANCHAUD, Daniel. EXTRACHROMOSOMAL NATURE OF DRUG RESISTANCE IN *STAPHYLOCOCCUS AUREUS*. **ANNALS of the New York Academy of Sciences**. Jun. 1971

OLSEN, J. E.; CHRISTENSEN, H.; AARESTRUP, F. M. Diversity and evolution of *bla_Z* from *Staphylococcus aureus* and coagulase-negative staphylococci. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 57, n. 3, p. 450–460, 1 mar. 2006.

OLUFUNMISO, O.; TOLULOPE, I.; ROGER, C. Multidrug and vancomycin resistance among clinical isolates of *Staphylococcus aureus* from different teaching hospitals in Nigeria. **African Health Sciences**, v. 17, n. 3, p. 797, 18 set. 2017.

- O'TOOLE, Richard D. et al. An Outbreak of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Infection. **JAMA**. v.213, n. 2, 13 Jul 1970.
- PEREIRA, Eliane Patricia Lino; CUNHA, Maria de Lourdes Ribeiro de Souza da. Avaliação da colonização nasal por *Staphylococcus* spp. resistente à oxacilina em alunos de enfermagem. **J Bras Patol Med Lab**. v. 45, n. 5, p. 361-369. Out. 2009.
- PEREIRA, L. A. et al. Real-time PCR assay for detection of blaZ genes in *Staphylococcus aureus* clinical isolates. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 52, n. 4, p. 1259–1261, 2014.
- PINCHUK, I. V.; BESWICK, E. J.; REYES, V. E. *Staphylococcal* Enterotoxins. **Toxins**, v. 2, n. 8, p. 2177–2197, 18 ago. 2010.
- POURNARAS, S. et al. Driving Forces of Mechanisms Regulating Oxacillin-Resistance Phenotypes of MRSA: Truly Oxacillin-Susceptible mecA-Positive *Staphylococcus aureus* Clinical Isolates also Exist. **Current Pharmaceutical Design**, 2015, v. 21, p. 2048-2053
- RECKER, M. et al. Clonal differences in *Staphylococcus aureus* bacteraemia-associated mortality. **Nature Microbiology**, v. 2, n. 10, p. 1381–1388, 7 out. 2017.
- REICHMANN, Nathalie T.; PINHO, Mariana G. Role of SCCmec type in resistance to the synergistic activity of oxacillin and cefoxitin in MRSA. **SCIENTIFIC REPORTS**. 7: 6154. Jul. 2017.
- ROBERTSON, G. A. et al. Identification and interrogation of highly informative single nucleotide polymorphism sets defined by bacterial multilocus sequence typing databases. **Journal of Medical Microbiology**, v. 53, n. 1, p. 35–45, 1 jan. 2004.
- ROSENTHAL, V. D. International Nosocomial Infection Control Consortium (INICC) resources: INICC multidimensional approach and INICC surveillance online system. **American Journal of Infection Control**, v. 44, n. 6, p. e81–e90, jun. 2016.
- SASSINE, Jad et al. Functional redundancy of division specific penicillin-binding proteins in *Bacillus subtilis*. **Molecular Microbiology**. Aug. 2017.
- SAEED, K. et al. Oxacillin-susceptible methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (OS-MRSA), a hidden resistant mechanism among clinically significant isolates in the Wessex region/UK. **Infection**, v. 42, n. 5, p. 843–847, 12 out. 2014.
- SANCHEZ, C. J. et al. Biofilm formation by clinical isolates and the implications in chronic infections. **BMC Infectious Diseases**, v. 13, n. 1, p. 47, 29 dez. 2013.
- SAKOULAS, George et al. Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*: Comparison of Susceptibility Testing Methods and Analysis of mecA-Positive Susceptible Strains. **Journal of clinical microbiology**. v.39, n.11, Nov. 2011.
- SHAHINI, M. et al. Epidemiology of Panton-Valentine Leukocidin harbouring *Staphylococcus aureus* in cutaneous infections from Iran : a systematic review and meta-analysis. **Le Infezione in Medicina**. p. 217–223, 2017.
- SHANKAR, N. et al. The epidemiology and transmission of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in the community in Singapore: study protocol for a longitudinal household study. **BMC Infectious Diseases**, v. 17, n. 1, p. 678, 11 dez. 2017.

- SHORE, Anna C. et al. Detection of Staphylococcal Cassette Chromosome mec Type XI Carrying Highly Divergent *mecA*, *mecI*, *mecR1*, *blaZ*, and *ccr* Genes in Human Clinical Isolates of Clonal Complex 130 Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, Aug. 2011, p. 3765–3773 Vol. 55, No. 8 0066-4804/11/\$12.00 doi:10.1128/AAC.00187-11
- SHRESTHA, L. et al. Inhibitory effects of antibiofilm compound 1 against *Staphylococcus aureus* biofilms. **Microbiology and Immunology**, v. 60, n. 3, p. 148–159, mar. 2016.
- SIEVERT, Dawn M. et al. Antimicrobial-Resistant Pathogens Associated with Healthcare-Associated Infections: Summary of Data Reported to the National Healthcare Safety Network at the Centers for Disease Control and Prevention, 2009–2010. **Infection Control and Hospital Epidemiology**. v. 34, n 1. Jan. 2013.
- SMITH, T. L.; JARVIS, W. R. Antimicrobial resistance in *Staphylococcus aureus*. **Microbes and Infection**, v. 1, n. 10, p. 795–805, ago. 1999.
- TÄRNBERG, M.; NILSSON, L. E.; DOWZICKY, M. J. Antimicrobial activity against a global collection of skin and skin structure pathogens: results from the Tigecycline Evaluation and Surveillance Trial (T.E.S.T.), 2010–2014. **International Journal of Infectious Diseases**, v. 49, p. 141–148, ago. 2016.
- TONG, S. Y. C. et al. *Staphylococcus aureus* Infections: Epidemiology, Pathophysiology, Clinical Manifestations, and Management. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 28, n. 3, p. 603–661, 27 jul. 2015.
- TORRES, A. et al. International ERS/ESICM/ESCMID/ALAT guidelines for the management of hospital-acquired pneumonia and ventilator-associated pneumonia. **European Respiratory Journal**, v. 50, n. 3, p. 1700582, 10 set. 2017.
- UZOAMAKA, M. et al. Bacterial Etiology of Lower Respiratory Tract Infections and Their Antimicrobial Susceptibility. **The American Journal of the Medical Sciences**, v. 354, n. 5, p. 471–475, nov. 2017.
- VAN HAL, S. J. et al. Predictors of Mortality in *Staphylococcus aureus* Bacteremia. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 25, n. 2, p. 362–386, 1 abr. 2012.
- WAN, Tsai-Wen et al. Genomic comparison between *Staphylococcus aureus* GN strains clinically isolated from a familial infection case: IS1272 transposition through a novel inverted repeat-replacing mechanism. **PLOSone**. p. 1–29, 2017.
- WEINER, L. M. et al. Antimicrobial-Resistant Pathogens Associated With Healthcare-Associated Infections: Summary of Data Reported to the National Healthcare Safety Network at the Centers for Disease Control and Prevention, 2011–2014. **Infection Control & Hospital Epidemiology**, v. 37, n. 11, p. 1288–1301, 30 nov. 2016.
- WOOTTON, M. et al. A modified population analysis profile (PAP) method to detect hetero-resistance to vancomycin in *Staphylococcus aureus* in a UK hospital. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**. v.47, p.399–403. 2001
- WOODFORD, Neil; LIVERMORE, David M. Infections caused by Gram-positive bacteria: a review of the global challenge. **Journal of Infection**. v59, p.4-16. 2009

WHO (2014) **Antimicrobial resistance: global report on surveillance 2014**. World Health Organization, Geneva. Disponível em:

http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/112642/1/9789241564748_eng.pdf?ua=1. Acessado em 08 mar 2018.

WU, Zhaowei et al. Novel Type XII Staphylococcal Cassette Chromosome *mec* Harboring a New Cassette Chromosome Recombinase, CcrC2. **Antimicrob Agents Chemother.** 59(12): 7597–7601. Nov. 2015.

YAMAMOTO, T. et al. Community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: community transmission, pathogenesis, and drug resistance. **Journal of Infection and Chemotherapy**, v. 16, n. 4, p. 225–254, 2010.

YANG, Qiwen et al. Antimicrobial activity among gram-positive and gram-negative organisms collected from the Asia-Pacific region as part of the Tigecycline Evaluation and Surveillance Trial: Comparison of 2015 results with previous years. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease.** 2017

APÊNDICES

APÊNDICE A

Dados gerais 105 amostras de *S. aureus* isolados de pacientes com diagnóstico de bacteremia e pneumonia internados no HUL durante o período de 2014-2016. Dados de resistência aos antimicrobianos, pesquisa do gene *mecA* e tipagem *SCCmec*.

Tabela 1. Dados gerais 105 amostras de *S. aureus* coletados de pacientes internados no HUL entre os anos de 2015-2016 com diagnóstico de bacteremia e pneumonia.

PSAM	Amostras Clínica	Resistência aos Antimicrobianos	<i>genemecA</i>	MRSA	<i>SCCmec</i>
5	SANGUE	PN	POS	OS-MRSA	Não Tipável
12	SANGUE	PN OX ER CLI CIP	POS	MRSA	IV
13	SECREÇÃO TRAQUEAL	PN	POS	OS-MRSA	Não Tipável
14	SANGUE	PN OX ER CLI CIP GN	POS	MRSA	IV
17	SECREÇÃO TRAQUEAL	PN OX ER CLI CIP	POS	MRSA	IV
22	SANGUE	NENHUM	NEG	MSSA	Não Tipável
31	SANGUE	PN OX ER CLI CIP GN	POS	MRSA	Não Tipável
37	SECREÇÃO TRAQUEAL	PN	POS	OS-MRSA	Não Tipável
47	SANGUE	PN OX ER CLI CIP	POS	MRSA	Não Tipável
50	SANGUE	PN	NEG	MSSA	Não Tipável
52	SANGUE	PN ER CLI	POS	OS-MRSA	Não Tipável
53	SANGUE	PN ER CLI	NEG	MSSA	Não Tipável
55	SECREÇÃO TRAQUEAL	PN OX	POS	MRSA	IV
64	SANGUE	PN OX ER CLI CIP	NEG	MRSA	Não Tipável
67	SECREÇÃO TRAQUEAL	PN	POS	OS-MRSA	Não Tipável
68	SECREÇÃO TRAQUEAL	PN OX ER CLI CIP	POS	MRSA	IV
70	SANGUE	PN OX	NEG	MRSA	Não Tipável
76	SECREÇÃO TRAQUEAL	PN ER CLI	POS	OS-MRSA	Não Tipável
77	SECREÇÃO TRAQUEAL	PN	POS	OS-MRSA	Não Tipável
78	SANGUE	PN	POS	OS-MRSA	Não Tipável
80	SECREÇÃO TRAQUEAL	PN OX ER CLI CIP GN	POS	MRSA	I
83	SECREÇÃO TRAQUEAL	PN OX ER CLI CIP	POS	MRSA	Não Tipável
87	SECREÇÃO TRAQUEAL	ER CLI	POS	OS-MRSA	Não Tipável
88	SECREÇÃO TRAQUEAL	Nenhum	NEG	PSSA	Não Tipável
95	SANGUE	PN OX ER CLI CIP	POS	MRSA	IV
93	SECREÇÃO TRAQUEAL	ER GN	POS	OS-MRSA	Não Tipável
98	SANGUE	PN	NEG	MSSA	Não Tipável
104	SECREÇÃO TRAQUEAL	PN OX ER CLI CIP	NEG	MRSA	Não Tipável
108	SANGUE	ER CLI	POS	OS-MRSA	Não Tipável

110	SECREÇÃO TRAQUEAL	PN OX ER CLI CIP	POS	MRSA	II
112	SECREÇÃO TRAQUEAL	PN	POS	OS-MRSA	Não Tipável
117	SECREÇÃO TRAQUEAL	PN OX ER CLI	POS	MRSA	IV
136	SANGUE	PN OX ER CLI CIP	POS	MRSA	IV
138	SECREÇÃO TRAQUEAL	PN OX ER CLI CIP	POS	MRSA	II
148	SECREÇÃO TRAQUEAL	PN OX ER CLI CIP	POS	MRSA	I
157	SECREÇÃO TRAQUEAL	PN OX ER CLI CIP	POS	MRSA	I
160	SECREÇÃO TRAQUEAL	PN OX ER CLI CIP	POS	MRSA	II
163	SECREÇÃO TRAQUEAL	PN OX ER	POS	MRSA	IV
165	SECREÇÃO TRAQUEAL	PN OX ER CLI CIP	POS	MRSA	II
166	SECREÇÃO TRAQUEAL	PN OX ER CLI CIP GN	NEG	MRSA	Não Tipável
175	SECREÇÃO TRAQUEAL	PN OX ER CLI CIP	POS	MRSA	II
176	SECREÇÃO TRAQUEAL	PN OX ER CLI CIP	POS	MRSA	II
177	SECREÇÃO TRAQUEAL	PN OX ER CLI CIP	POS	MRSA	II
180	SANGUE	PN ER CLI	POS	OS-MRSA	Não Tipável
184	SECREÇÃO TRAQUEAL	PN OX ER CLI CIP	POS	MRSA	III
185	SECREÇÃO TRAQUEAL	PN OX ER CLI CIP	POS	MRSA	II
193	SECREÇÃO TRAQUEAL	PN OX ER CLI CIP	POS	MRSA	II
198	SANGUE	PN OX ER CLI CIP	POS	MRSA	II
208	SECREÇÃO TRAQUEAL	PN OX ER CLI CIP	POS	MRSA	I
209	SECREÇÃO TRAQUEAL	PN OX ER CLI CIP	POS	MRSA	II
211	SECREÇÃO TRAQUEAL	PN OX ER CLI CIP	POS	MRSA	II
215	SANGUE	PN OX ER CLI CIP	POS	MRSA	II
219	SECREÇÃO TRAQUEAL	PN OX ER CLI CIP	POS	MRSA	II
253	SANGUE	PN	NEG	MSSA	Não Tipável
265	SECREÇÃO TRAQUEAL	PN OX ER CLI CIP	POS	MRSA	II
271	SANGUE	PN OX ER CLI CIP	POS	MRSA	Não Tipável
282	SANGUE	PN OX ER CLI CIP	POS	MRSA	II
291	SANGUE	ER CLI	NEG	MSSA	Não Tipável
298	SANGUE	PN ER CLI	NEG	MSSA	Não Tipável
299	SANGUE	PN	POS	OS-MRSA	Não Tipável
302	SANGUE	PN OX ER CLI CIP	POS	MRSA	Não Tipável
311	SANGUE	PN OX ER CLI CIP	POS	MRSA	II
312	SANGUE	PN ER CLI CIP	NEG	MSSA	Não Tipável
313	SANGUE	PN OX ER CLI	POS	MRSA	IV
324	SANGUE	PN CIP	NEG	MSSA	Não Tipável
332	SANGUE	PN OX ER CLI CIP	POS	MRSA	II
346	SANGUE	PN OX	POS	MRSA	IV
352	SECREÇÃO TRAQUEAL	PN OX ER CLI CIP	POS	MRSA	II
353	SECREÇÃO TRAQUEAL	PN OX ER CLI CIP	POS	MRSA	II
355	SANGUE	PN OX ER CLI CIP	POS	MRSA	IV
356	SECREÇÃO TRAQUEAL	PN OX ER CLI CIP	POS	MRSA	II
360	SANGUE	PN OX ER CLI CIP	NEG	MRSA	Não Tipável

362	SANGUE	Nenhum	NEG	PSSA	Não Tipável
369	SECREÇÃO TRAQUEAL	PN OX ER CLI CIP	POS	MRSA	II
374	SANGUE	PN OX ER CLI CIP	POS	MRSA	II
382	SANGUE	PN OX ER CLI CIP	POS	MRSA	IV
392	SANGUE	PN OX	POS	MRSA	IV
400	SECREÇÃO TRAQUEAL	PN OX ER CLI CIP	POS	MRSA	I
411	SECREÇÃO TRAQUEAL	PN OX ER CLI CIP	POS	MRSA	II
412	SECREÇÃO TRAQUEAL	PN OX ER CLI CIP	POS	MRSA	I
413	SECREÇÃO TRAQUEAL	PN OX ER CLI CIP	POS	MRSA	II
415	SANGUE	PN OX ER CLI CIP	POS	MRSA	II
416	SECREÇÃO TRAQUEAL	PN OX ER CLI CIP	POS	MRSA	I
419	SECREÇÃO TRAQUEAL	PN OX ER CLI CIP	POS	MRSA	II
437	SECREÇÃO TRAQUEAL	PN OX ER CLI CIP	POS	MRSA	II
453	SECREÇÃO TRAQUEAL	PN OX ER CLI CIP	POS	MRSA	II
457	SECREÇÃO TRAQUEAL	PN OX ER CLI CIP	POS	MRSA	I
465	SECREÇÃO TRAQUEAL	PN OX ER CLI CIP GN	POS	MRSA	II
469	SANGUE	PN ER CLI	NEG	MSSA	Não Tipável
483	SECREÇÃO TRAQUEAL	PN OX ER CLI CIP	POS	MRSA	II
484	SANGUE	PN OX ER CLI CIP	POS	MRSA	II
492	SECREÇÃO TRAQUEAL	PN OX ER CLI CIP	POS	MRSA	II
523	SANGUE	PN OX CLI	POS	MRSA	Não Tipável
530	SECREÇÃO TRAQUEAL	PN	POS	OS-MRSA	Não Tipável
533	SANGUE	PN ER CLI	POS	OS-MRSA	Não Tipável
549	SANGUE	PN	POS	OS-MRSA	Não Tipável
577	SECREÇÃO TRAQUEAL	PN OX ER CLI CIP	POS	MRSA	II
578	SECREÇÃO TRAQUEAL	PN OX ER CLI CIP	POS	MRSA	II
596	SANGUE	PN	NEG	MSSA	Não Tipável
624	SANGUE	PN	POS	OS-MRSA	Não Tipável
630	SANGUE	PN	NEG	MSSA	Não Tipável
631	SANGUE	PN OX ER CLI CIP	POS	MRSA	II
645	SANGUE	ER CLI	POS	OS-MRSA	Não Tipável
646	SANGUE	PN	POS	OS-MRSA	Não Tipável
657	SECREÇÃO TRAQUEAL	PN OX ER CLI CIP	POS	MRSA	II

POS: positivo; NEG: negativo; PSSA: *S. aureus* sensível à penicilina; MRSA: *S. aureus* resistente à metilicina; OS-MRSA: *S. aureus* oxacilina sensível metilicina resistente; PN: penicilina; OX: oxacilina; ER: eritromicina; CLI: clindamicina; CIP: ciprofloxacina; GN: gentamicina.

APÊNDICE B

Dados gerais 74 amostras de *S. aureus* isolados de pacientes com diagnóstico de bacteremia e pneumonia internados no HUL durante o período de 2015-2016. Dados de genes de virulência (*icaA*, TSST e PVL), Complexo Clonal e Sequence type.

Tabela 1. Dados gerais de virulência e clonalidade de 74 amostras de *S. aureus* coletados de pacientes internados no HUL entre os anos de 2015-2016 com diagnóstico de bacteremia e pneumonia.

PSAM	<i>icaA</i>	TSST	PVL	CC	ST
362	Positivo	Positivo	Negativo	30	30
88	Positivo	Negativo	Negativo	1290	1290
469	Positivo	Negativo	Negativo	8	195
630	Positivo	Positivo	Negativo	30	30
596	Positivo	Negativo	Negativo	45	341
166	Positivo	Negativo	Positivo	5	5
360	Positivo	Negativo	Negativo	5	6
104	Positivo	Negativo	Negativo	1290	1290
549	Positivo	Negativo	Negativo	1	1
299	Positivo	Negativo	Negativo	5	835
646	Positivo	Negativo	Negativo	8	72
67	Positivo	Negativo	Negativo	8	72
37	Positivo	Negativo	Negativo	8	72
76	Positivo	Negativo	Negativo	657	657
645	Positivo	Negativo	Negativo	657	657
112	Positivo	Positivo	Negativo	1073	1073
184	Positivo	Negativo	Positivo	15	15
157	Positivo	Positivo	Positivo	5	9
416	Positivo	Positivo	Negativo	5	63
148	Positivo	Positivo	Negativo	5	99
80	Positivo	Positivo	Negativo	5	192
457	Positivo	Negativo	Negativo	5	5
412	Positivo	Negativo	Negativo	5	6
208	Positivo	Negativo	Negativo	5	6
400	Positivo	Negativo	Negativo	8	8
374	Positivo	Negativo	Positivo	5	9
332	Positivo	Negativo	Positivo	5	835
176	Positivo	Negativo	Positivo	5	835

165	Positivo	Negativo	Positivo	5	63
138	Positivo	Negativo	Positivo	5	835
631	Positivo	Negativo	Negativo	5	99
453	Positivo	Negativo	Negativo	5	1307
437	Positivo	Negativo	Negativo	5	5
419	Positivo	Negativo	Negativo	5	63
415	Positivo	Negativo	Negativo	5	5
413	Positivo	Negativo	Negativo	5	99
411	Positivo	Negativo	Negativo	5	6
369	Positivo	Negativo	Negativo	5	27
356	Positivo	Negativo	Negativo	5	9
353	Positivo	Negativo	Negativo	5	27
352	Positivo	Negativo	Negativo	5	6
219	Positivo	Negativo	Negativo	5	63
215	Positivo	Negativo	Negativo	5	63
211	Positivo	Negativo	Negativo	5	835
209	Positivo	Negativo	Negativo	5	5
198	Positivo	Negativo	Negativo	5	63
193	Positivo	Negativo	Negativo	5	63
185	Positivo	Negativo	Negativo	5	63
177	Positivo	Negativo	Negativo	5	63
160	Positivo	Negativo	Positivo	7	306
265	Positivo	Negativo	Negativo	7	306
110	Positivo	Negativo	Negativo	7	306
175	Positivo	Negativo	Negativo	80	1502
657	Positivo	Negativo	Negativo	445	445
578	Positivo	Negativo	Negativo	445	445
577	Positivo	Negativo	Negativo	445	445
492	Positivo	Negativo	Negativo	445	445
465	Positivo	Negativo	Negativo	1289	53
484	Positivo	Negativo	Negativo	1289	53
17	Positivo	Positivo	Negativo	5	109
117	Positivo	Positivo	Positivo	7	306
355	Positivo	Negativo	Positivo	7	306
68	Positivo	Positivo	Negativo	22	1095
382	Positivo	Negativo	Negativo	88	255
346	Positivo	Negativo	Positivo	317	317
624	Negativo	Negativo	Negativo	15	14
77	Negativo	Negativo	Negativo	101	101
523	Negativo	Negativo	Negativo	657	657
533	Negativo	Negativo	Negativo	657	657
530	Negativo	Negativo	Negativo	657	657
483	Negativo	Negativo	Negativo	445	445

163	Negativo	Positivo	Negativo	5	99
55	Negativo	Negativo	Negativo	5	6
83	Negativo	Negativo	Negativo	386	386

APÊNDICE C

Fluxograma com o número de amostras selecionadas para realização de cada um dos 4 estudos conduzidos nessa dissertação.

