



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA

FELIPE CREPALDI DUARTE

***Staphylococcus aureus* SENSÍVEL A OXACILINA, *mecA*
POSITIVO, ISOLADOS DE INFECÇÃO DE CORRENTE
SANGUÍNEA EM UM HOSPITAL DO SUL DO BRASIL:
ANÁLISE EPIDEMIOLÓGICA, MOLECULAR E
CARACTERIZAÇÃO CLÍNICA DOS PACIENTES**

Londrina
2023

FELIPE CREPALDI DUARTE

***Staphylococcus aureus* SENSÍVEL A OXACILINA, *mecA*
POSITIVO, ISOLADOS DE INFECÇÃO DE CORRENTE
SANGUÍNEA EM UM HOSPITAL DO SUL DO BRASIL:
ANÁLISE EPIDEMIOLÓGICA, MOLECULAR E
CARACTERIZAÇÃO CLÍNICA DOS PACIENTES**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Fisiopatologia Clínica e Laboratorial, da Universidade Estadual de Londrina - UEL, como requisito para a obtenção do título de Doutor em Fisiopatologia Clínica e Laboratorial.

Orientador: Profa. Dra. Márcia Regina Eches Perugini.

Coorientador: Profa. Dra. Sueli Fumie Yamada-Ogatta.

Londrina
2023

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

D966s Duarte, Felipe Crepaldi.

Staphylococcus aureus sensível a oxacilina, mecA positivo, isolados de infecção de corrente sanguínea em um hospital do sul do Brasil : análise epidemiológica, molecular e caracterização clínica dos pacientes. / Felipe Crepaldi Duarte. - Londrina, 2023.
88 f. : il.

Orientador: Marcia Regina Eches Perugini.

Coorientador: Sueli Fumie Yamada-Ogatta.

Tese (Doutorado em Fisiopatologia Clínica e Laboratorial) - Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências da Saúde, Programa de Pós-Graduação em Fisiopatologia Clínica e Laboratorial, 2023.

Inclui bibliografia.

1. Staphylococcus aureus - Tese. 2. Infecção estafilocócica - Tese. 3. Epidemiologia molecular - Tese. 4. Sepsis - Tese. I. Perugini, Marcia Regina Eches. II. Yamada-Ogatta, Sueli Fumie. III. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências da Saúde. Programa de Pós-Graduação em Fisiopatologia Clínica e Laboratorial. IV. Título.

CDU 61

FELIPE CREPALDI DUARTE

***Staphylococcus aureus* SENSÍVEL A OXACILINA, *mecA*
POSITIVO, ISOLADOS DE INFECÇÃO DE CORRENTE
SANGUÍNEA EM UM HOSPITAL DO SUL DO BRASIL:
ANÁLISE EPIDEMIOLÓGICA, MOLECULAR E
CARACTERIZAÇÃO CLÍNICA DOS PACIENTES**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Fisiopatologia Clínica e Laboratorial, da Universidade Estadual de Londrina - UEL, como requisito para a obtenção do título de Doutor em Fisiopatologia Clínica e Laboratorial.

BANCA EXAMINADORA

Orientador: Profa. Dra. Eliana Carolina Vespero
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Profa. Dra. Gilselena Kerbauy Lopes
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Profa. Dra. Jaqueline Dario Capobiango
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Profa. Dra. Marcia R. E. Perugini
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Profa. Dra. Zuleica Naomi Tano
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Londrina, 15 de dezembro de 2023.

Jesus e Maria

Dedico este trabalho a Jesus e Maria, em primeiro lugar, pois sem sua destra nada disso seria possível.

Aos meus pais

Cleunice e Nilton, não poderia deixar de dedicar esse trabalho a vocês, pois sem o seu carinho e apoio incondicional não seria possível realizá-lo.

Profa. Dra. Marcia Regina Eches Perugini

Exemplo de pessoa, ser humano e profissional para todos que tem o prazer de sua convivência.

AGRADECIMENTOS

À Orientadora

Profa Dra. Marcia Regina Eches Perugi, não há palavras para expressar a imensa honra de ter estado sob sua tutela como estagiário de biomedicina, orientando de especialização, mestrado e doutorado. Obrigado pelo apoio incondicional, por ter acreditado em mim, quando nem mesmo eu acreditava, e por estar sempre por perto como orientadora, amiga e mãe científica. A senhora fez, faz e sempre fará parte da minha vida.

À Coorientadora

Profa. Dra. Sueli Fumie Yamada-Ogatta, muito obrigado pela honra de ter me aceitado como seu orientando. Obrigado por ter aberto as portas de seu laboratório, pelos ensinamentos e pelo fundamental apoio.

Ao corpo docente do Programa de Pós-graduação em Fisiopatologia Clínica e Laboratorial

Agradeço, de maneira especial, a todos os docentes que colaboram com o meu conhecimento. Os senhores sempre estiveram dispostos a fornecer seu conhecimento e nos mostrar o caminho a ser trilhado, obrigado pelo carinho e ensinamentos.

Aos Docentes e Servidores do Laboratorio de Microbiologia, HU-Uel

Agradeço, imensamente, as docentes: Professora Doutora Eliana Carolina Vespero; Florister E. Carrara-Marroni; Marsileni Pelisson; Marcia R. E. Perugini e aos técnicos e auxiliares, em especial: Claudineia; Emílio; Fabio; Gerusa; Lourdes (*in memoriam*); Maura; Sidney por terem me acolhido, ensinado e auxiliado ao longo desses anos. Obrigado pelo carinho e companheirismo.

Aos docentes e servidores do CCB, departamento de microbiologia

Agradeço a profa Dra. Lucy Megumi Yamauchi Lioni e profa Dra. Sueli Fumie Yamada-Ogatta por terem aberto as portas de seu laboratório, NIP-5. Obrigado pelo acolhimento,

ensinamentos e carinho ao longo da jornada. Agradeço, também, ao prof. Dr. Eliandro R. Tavares e Jussevania P. S. R. de Sá por todo companheirismo e aprendizado ao longo do caminho.

Aos Colegas de Pós-graduação e IC's

Agradeço a todos os colegas pelo apoio, discussões, conversas e risadas que fizeram o caminho ser mais leve. Agradeço, de forma especial, a Anna Paula Silva Olak e a Stefani Lino Cardim pelo apoio, auxílio e carinho. Sem vocês a realização desse trabalho não seria possível.

Aos meus amigos e familiares

Agradeço aos meus pais, Cleunice Crepaldi e Nilton R. Micheletti por sempre estarem junto de mim, acreditando quando eu não acreditava e dando força quando eu não mais a tinha. Obrigado por serem meu porto seguro e fortaleza. Aos familiares e amigos, agradeço, pois sempre estiveram ao lado apoiando, dando forças e deixando o caminho mais suave. Sem a força e carinho de vocês eu não teria conseguido chegar até aqui.

A banca examinadora

Profa Dra. Eliana Carolina Vespero; Gilselena Kerbauy Lopes; Jaqueline Dario Capobiango, Marcia Regina Eches Perugini e Zuleica Naomi Tano é uma imensa honra tê-las nessa banca examinadora. As senhoras são grande exemplo acadêmico e profissional, muito obrigado por terem aceitado a tarefa de examinar este trabalho e auxiliar na construção da minha carreira.

Aos órgãos de fomento

Agradeço a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – CAPES, pelo apoio financeiro para realização deste trabalho.

“...Tenho-vos dito isto, para que em mim tenhais paz; no mundo tereis aflições, mas tende bom ânimo, eu venci o mundo.” **João 16:3**

DUARTE, Felipe Crepaldi. ***Staphylococcus aureus* sensível a oxacilina, *mecA* positivo, isolados de infecção de corrente sanguínea em um hospital do sul do Brasil**: análise epidemiológica, molecular e caracterização clínica dos pacientes. 2023. 88 p. Tese (Programa de Pós-Graduação em Fisiopatologia Clínica e Laboratorial) Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2023.

RESUMO

Staphylococcus aureus possui elevada importância clínica e epidemiológica, seja pela sua capacidade de colonizar pacientes saudáveis ou de ocasionar processos infecciosos, que podem ser restritos aos tecidos superficiais ou invasivos, como é nas pneumonias, sepse e endocardite. O objetivo desse estudo foi avaliar a frequência e epidemiologia molecular de isolados *Oxacillin-Sensible Methicillin Resistant S. aureus* (OS-MRSA) isolados de hemocultura, bem como, avaliar os aspectos clínicos de pacientes com infecção de corrente sanguínea ocasionada por OS-MRSA. A identificação dos isolados, bem como a determinação do perfil de sensibilidade aos antimicrobianos, foi realizada por metodologia manual, de acordo com o CLSI, 2021, e automatizada utilizando os sistemas Vitek® 2 (bioMérieux-USA), Phoenix® (Becton, Dickinson) e Microscan® (Siemens-Califórnia). A concentração inibitória mínima para vancomicina, linezolida, teicoplanina, daptomicina e oxacilina foi determinada utilizando tiras de e-test® (bioMérieux-USA). A formação de biofilme foi avaliada por técnica de cristal violeta, e o DNA total dos isolados, extraído por protocolo enzimático, foi utilizado para pesquisa dos genes *mecA*, *vanA*, *nuc*, *icaA*, *pvl* e *tst-1*, além da análise dos Complexos Clonais (CC) e *Sequence Typing* (ST). Avaliamos 801 isolados de *S. aureus*, provenientes de infecções de corrente sanguínea, coletados de pacientes internados em um hospital do sul do Brasil entre janeiro de 2011 a dezembro de 2020. Desses, 96 isolados foram identificados como sensíveis a meticilina. Todos os isolados foram identificados, molecularmente, através da amplificação do gene *nuc*. Quanto ao gene *mecA*, 27% (26/96) dos isolados foram positivos, sendo caracterizados como OS-MRSA. O gene *vanA* não foi encontrado nessa pesquisa. O gene *pvl* foi encontrado em 92% (24/26) dos isolados e o gene *tst-1* estava presente em 61% (16/26) dos isolados. Ainda, todos os isolados foram positivos para o gene *icaA* e, ao teste fenotípico, foram caracterizados como forte formadores de biofilme. Quanto aos elementos *SCCmec*, o tipo I foi o mais prevalente, presente em 46% (12/26) dos isolados, seguido pelo tipo IV 23% (6/26) e tipo II 4% (1/26). Ainda, 27% (7/26) foram caracterizados como não tipáveis. Quanto aos CC e ST, os isolados foram categorizados em 6 CC's diferentes, sendo mais prevalente o CC5 41% (9/22) e 11 ST's, prevalecendo o ST99 41% (9/22). Quanto ao desfecho da infecção 19/26 pacientes (73%) receberam alta hospitalar e 7/26 (27%) evoluíram para óbito. Com esse estudo foi possível observar elevada prevalência de isolados OS-MRSA, entre os *S. aureus* causadores de infecção de corrente sanguínea, em um hospital do sul do Brasil. A identificação destes isolados é importante, pois eles podem representar dificuldades clínicas no tratamento dos pacientes, uma vez que são falsamente caracterizados como sensíveis, e podem induzindo ao de-escalamento, errôneo, na terapia antimicrobiana com oxacilina. Os OS-MRSA se mostraram virulentos e epidemiologicamente diversos, tanto pela análise dos *SCCmec*, quanto dos CC's.

Palavras-chave: OS-MRSA; *Staphylococcus aureus*; Sepsis; Epidemiologia Molecular; Infecção Estafilocócica.

DUARTE, Felipe Crepaldi. ***Staphylococcus aureus* sensitive to oxacillin, *mecA* positive, isolated from a bloodstream infection in a hospital in southern Brazil: epidemiological, molecular analysis and clinical characterization of patients.** 2023. 88 p. Thesis (Postgraduate Program in Clinical and Laboratory Pathophysiology) State University of Londrina, Londrina, 2023.

ABSTRACT

Staphylococcus aureus has high clinical and epidemiological importance, whether due to its ability to colonize healthy patients or to cause infectious processes, which can be restricted to superficial or invasive tissues, such as pneumonia, sepsis and endocarditis. The aim of this study was to evaluate the frequency and molecular epidemiology of Oxacillin-Sensible Methicillin-Resistant *S. aureus* (OS-MRSA) isolated from blood cultures, as well as to evaluate the clinical course of patients with bloodstream infection caused by OS-MRSA. The identification of isolates, as well as the determination of the sensitivity profile to antimicrobials, was carried out using manual methodology, according to CLSI, 2021, and automated by the Vitek® 2 (bioMérieux-USA), Phoenix® (Becton, Dickinson) and Microscan® systems. (Siemens-California). The minimum inhibitory concentration for vancomycin, linezolid, teicoplanin, daptomycin and oxacillin was determined using e-test® strips (bioMérieux-USA). Biofilm formation was evaluated using the crystal violet technique and the total DNA of the isolates, extracted using an enzymatic protocol, was used to research the *mecA*, *vanA*, *nuc*, *icaA*, *pvl* and *tst-1* genes, in addition to the analysis of the Clonal Complexes (CC) and Sequence Typing (ST). 801 *S. aureus* isolates were evaluated, originating from bloodstream infections, collected from patients admitted to a hospital in southern Brazil between January 2011 and December 2020. Of these, 96 isolates were identified as sensitive to methicillin. All isolates were molecularly identified through amplification of the *nuc* gene. As for the *mecA* gene, 27% (26/96) of the isolates were positive, being characterized as MRSA. The *vanA* gene was not found in this research. The *pvl* gene was found in 92% (24/26) of the isolates and the *tst-1* gene was present in 61% (16/26) of the isolates. Furthermore, all isolates were positive for the *icaA* gene and, after phenotypic tests, were characterized as strong biofilm formers. As for SCC*mec* elements, type I was the most prevalent, present in 46% (12/26) of the isolates, followed by type IV 23% (6/26) and type II 4% (1/26). Furthermore, 27% (7/26) were characterized as untippable. Regarding CC and ST, the isolates were categorized into 6 different CC's, the most prevalent being CC5 41% (22/09) and 11 ST's, with ST99 prevailing 41% (22/09). Regarding the outcome of the infection, 19/26 patients (73%) were discharged from hospital and 7/26 (27%) died. With this study, it was possible to observe a high prevalence of OS-MRSA isolates, among *S. aureus* that cause bloodstream infections, in a hospital in southern Brazil. The identification of these isolates is important, as they can represent clinical difficulties in the treatment of patients, as they are falsely characterized as sensitive, which can lead to erroneous de-escalation of the therapy with oxacillin. OS-MRSA proved to be virulent and epidemiologically diverse, both by analysis of SCC*mec* and CC's.

Key-words: OS-MRSA; *Staphylococcus aureus*; Sepsis; Molecular Epidemiology; Staphylococcal infection.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 -	Elementos que compõe o Cassete Cromossômico Estafilocócico	20
Figura 2 -	Representação esquemática dos diferentes tipos de elementos SCC <i>mec</i> , tipo I ao XIV	22
Figura 3 -	Fluxograma de coleta, processamento e análise amostral	34
 Trabalho 1		
Figura 1 -	Distribuição dos Complexos Clonais e <i>Sequence Typing</i> presente em 22 isolados OS-MRSA.....	52
 Trabalho 2		
Figura 1 -	Linha do tempo paciente I.R.S.....	69
Figura 2 -	Linha do tempo Paciente R.S.....	71

LISTA DE TABELAS

Trabalho 1

- Tabela 1** - Avaliação comparativa de dados demográficos, laboratoriais e clínicos de isolados MSSA, MRSA e OS-MRSA 48
- Tabela 2** - Distribuição entre comorbidades, uso de dispositivos invasivos e tratamento, entre 81 pacientes, alocados em três grupos: MSSA; MRSA e OS-MRSA 49
- Tabela 3** - Características moleculares e concentração inibitória mínima de 26 isolados identificados como OS-MRSA quanto ao desfecho clínico 50
- Tabela 4** - Características da CIM de 26 isolados OS-MRSA quanto ao desfecho clínico: óbito 51

LISTA DE QUADROS

Trabalho 2

Quadro 1 - Dados laboratoriais e moleculares de isolados OS-MRSA coletados de corrente sanguínea	71
---	----

LISTA DE ABREVIATURAS

ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
CC	Complexo Clonal
<i>ccr</i>	cassette chromosome recombinase
CDC	Center of Diseases Control
CIM	Concentração Inibitória Mínima
CLSI	Clinical and Standards Laboratory Institute
ECDC	European Centre for Disease Prevention and Control
HRM-PCR	High Resolution Melting - Polimerase Chain Reaction
<i>icaA</i>	operon codificador da formação de biofilme
ICS	Infecção de Corrente Sanguínea
J1; J2 e J3	Regiões Internas dos Elementos <i>SCCmec</i>
MLST	Multi Locus Sequence Type
MRSA	Methicillin-resistant Staphylococcus aureus
PBP	Penicillin Biding Proteins
<i>pvl</i>	Panton-Valentine Leukocidin
RTq	PCR-Reação em Cadeia da Polimerase em Tempo Real
<i>SCCmec</i>	Staphylococcal Chromosome Cassette <i>mec</i>
SNP	Single-Nucleotide Polymorphisms
ST	Sequence Type
<i>tst-1</i>	Toxic Shock Syndrome Toxin

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	16
1.1	Gênero <i>Staphylococcus</i>	16
1.2	Infecção de corrente sanguínea.....	17
1.3	Resistência	18
1.4	Virulência	26
2	EPIDEMIOLOGIA	28
3	OBJETIVOS.....	32
3.1	Objetivo geral	32
3.2	Objetivos específicos	32
4	MATERIAIS E MÉTODOS	33
4.1	Desenho do estudo e amostras	33
4.2	Identificação de <i>S. aureus</i>	35
4.3	Formação de biofilme	35
4.4	Determinação da sensibilidades aos antimicrobianos	35
4.5	Determinação da concentração inibitória mínima (CIM) pelo método de <i>e-test</i> ®	36
4.6	Identificação de isolados hVISA através da análise do perfil populacional (PAP)	36
4.7	Extração do ácido nucleico	36
4.8	Detecção do gene <i>mecA</i> e tipagem <i>SCCmec</i>	36
4.9	Detecção dos genes de resistência à vancomicina (<i>vanA</i> e <i>vanB</i>)	37
4.10	High-Resolution Melting (HRM).....	37
4.11	Avaliação clínica	37
4.12	Avaliação estatística	37
4.13	Locais de realização do estudo	37

4.13.1	Coleta das amostras	37
4.13.2	Análise molecular	38
5	ASPECTOS ÉTICOS	39
6	RESULTADOS	40
6.1	Trabalho 1	41
6.2	Trabalho 2	64
7	CONSIDERAÇÕES FINAIS	77
8	CONCLUSÃO	78
	REFERÊNCIAS	79
	ANEXO	85
	ANEXO A - Parecer de Aprovação do Comitê de Ética.....	85

1. INTRODUÇÃO

1.1 Gênero *Staphylococcus*

Staphylococcus aureus é uma bactéria Gram-positiva, pertencente ao filo Firmicutes, descrita pela primeira vez pelo cirurgião Escocês Alexander Ogston no ano de 1880. Na microscopia de luz, apresenta-se como cocos que podem formar arranjos aglomerados; possui, aproximadamente, 0,8 micrometros de diâmetro. Esta espécie bacteriana é classificada como anaeróbia facultativa, fermentadora de lactose e do ágar manitol, com crescimento ideal em temperaturas de 37⁰C ($\pm 2^0$ C) e pH de 7,4; produz beta-hemólise em ágar sangue; não forma esporos nem apresenta flagelos, entretanto possui cápsula polissacarídica que tem como função proteger a célula bacteriana de agentes agressores; característico da espécie; apresentam atividade de desoxirribonuclease e coagulase (Guo *et al.*, 2020).

A espécie *S. aureus* é um patógeno extremamente versátil. Está distribuído de forma ampla na natureza e pode ser encontrada como colonizante de pele e partes e moles, glândulas, trato gastrointestinal, urinário e respiratório em seres humanos e animais. Pode ser transmitido em ambientes hospitalares ou comunitários. Ocasiona desde infecções simples e superficiais, restritas a pele, até infecções sistêmicas e complicadas como as bacteremias, pneumonias e osteomielites (Kluytmans, 2010; Turner *et al.*, 2019).

Entre os principais sítios de colonização por *S. aureus* é possível destacar a narina anterior, sendo responsável por 20-30% da taxa de colonização total. Tal taxa pode variar entre países, de acordo com os grupos demográficos e risco ocupacional. Contudo, essa colonização, por si só, constitui um fator de risco para aquisição de infecções estafilocócicas, sejam elas de origem comunitária ou relacionadas à assistência à saúde. Em condições de quebra da barreira física da pele, ou imunodeficiência, esses reservatórios são importantes fontes de patógenos potencialmente infecciosos (Kateete *et al.*, 2019).

A habilidade, e o sucesso, patogênico relacionada ao *S. aureus* é notável. O que favorece sua capacidade infectante são os mais variados mecanismos de

patogenicidade que possibilitam escapar do sistema imune, coagular o plasma, formar biofilme, invadir tecidos, bem como a sua grande capacidade de se tornar resistente aos tratamentos com antimicrobianos. Com sua capacidade de adquirir genes relacionados a virulência e resistência o patógeno tem se destacado, seja no contexto clínico como epidemiológico (Tasneem *et al.*, 2022).

1.2 Infecção de Corrente sanguínea

São inúmeros os sítios infecciosos que podem ser acometidos por *S. aureus*, contudo, as infecções sistêmicas possuem maior relevância quanto aos desfechos desfavoráveis. As Infecções de Corrente Sanguínea (ICS) ocasionadas por estafilocócos, principalmente aquelas relacionadas aos isolados resistentes a meticilina (*Methicillin-Resistant S. aureus* - MRSA), são mais difíceis de tratar e possuem maior percentual de mortalidade (20% a 25%), quando comparadas com as ocasionadas por isolados sensíveis a meticilina (*methicillin-sensible S. aureus* - MSSA) (Tong *et al.*, 2020; Kawasuji *et al.*, 2023). Segundo Minejima e colaboradores (2020) as bacteremias estafilocócicas acometem cerca de 100 mil pessoas anualmente, com índices de mortalidade podendo chegar aos 57%, sendo que, um terço dos pacientes, mesmo após terem sido efetivamente tratados da bacteremia, continuam colonizados por *S. aureus*.

Conforme descrito por Otto e colaboradores (2021), a incidência de bacteremia estafilocócica, nos Estados Unidos, no ano de 2012, foi de 20-50 casos a cada 100 mil habitantes, com taxa de mortalidade de até 30%. No ano de 2017, o total de mortes relacionadas a infecções de corrente sanguínea, por *S. aureus*, foi de 20 mil/ 100 mil habitantes. O maior número de mortes foi notado entre pacientes que possuíam comorbidades como: imunodeficiência, tuberculose e hepatites virais. (Cheung; Bae; Otto, 2021).

É extremamente importante que se faça a distinção entre os termos bacteremia, Infecção de corrente sanguínea e sepse, que pode ser entendida como uma disfunção orgânica, secundária a um patógeno, que culmina com uma resposta imune exacerbada (Laura *et al.*, 2021). A bacteremia pode ser entendida como a presença de microrganismo no sangue. Essa, não necessariamente acarretará manifestações

clínicas e é limitada, com duração máxima de 3 dias. A infecção de corrente sanguínea, entretanto, ocorre quando a resposta inflamatória se torna mais intensa e específica. Nesse quadro, a clínica do paciente encontra dois caminhos possíveis: a resolução da infecção ou uma resposta acentuada mediada por células Th1, com liberação de TNF- α , IL-1 β , IL-6 e INF- γ . Quando há esse aumento expressivo de citocinas pró inflamatórias e disfunção orgânica associada é possível afirmar que o quadro de Sepsis está instalado (Lisowska-Łysiak; Lauterbach; Międzobrodzki, 2021; Minejima *et al.*, 2020).

Entre os fatores de risco para que haja o desenvolvimento das ICS estafilocócicas é possível citar os extremos de idade (com maior risco para crianças e idosos), pacientes renais, diabéticos, cardiopatas, quebra de barreiras íntegras e presença de dispositivos médicos invasivos (Kwiecinski; Horswill, 2021).

As manifestações clínicas apresentadas pelos pacientes com ICS estafilocócica, bem como a severidade do caso, dependerão, portanto, das características do patógeno, como seu perfil de sensibilidade e virulência, assim como das comorbidades apresentadas pelos pacientes. Alguns pacientes conseguem ter seus quadros infecciosos solucionados na utilização do primeiro esquema terapêutico, enquanto outros falham nessa fase e precisam de esquemas com espectro mais ampliado de terapia. Há de se considerar que: quanto mais persistir o quadro de infecção de corrente sanguínea, mais intenso é o processo inflamatório apresentado pelo paciente, o que piora o prognóstico e aumenta o risco de morte (Wozniak *et al.*, 2021; Kouijzer; Fowler; Oever, 2023).

1.3 Resistência

O século 20 é tido como era de ouro no desenvolvimento e uso de agentes antimicrobianos, havendo a descoberta de inúmeros fármacos. Contudo, sua utilização excessiva e indiscriminada, têm sido apontada como o principal fator relacionado ao surgimento da resistência bacteriana (Diallo; Baron, 2020).

Antes do advento dos antimicrobianos, os isolados de *S. aureus* eram considerados os principais agentes infecciosos, com mortalidade associada, que podia

chegar até 82% dos pacientes, e geravam grande preocupação clínica principalmente quando isolados de infecções graves, como no caso das ICS. Contudo, após a descoberta da penicilina por Alexander Fleming, em 1928, novas perspectivas para o tratamento de pacientes com essa grave doença infecciosa foram traçados (Smith; Jarvis, 1999; Moellering; Weinberg, 1971).

Após extensas pesquisas e modificações na molécula da penicilina, para que ela se tornasse estável, o fármaco começou a ser utilizado em ampla escala. Contudo, em meados da década de 40, surgiram isolados de *S. aureus* apresentando resistência ao antimicrobiano. Esse fenômeno se dava pela aquisição de um plasmídeo que continha o gene *blaZ*. A expressão desse gene resulta na formação de uma enzima, denominada penicilinase, que possui, por objetivo, clivar o grupo funcional ativo do antimicrobiano, conhecido como anel beta-lactâmico. Após a clivagem desse elemento, o antimicrobiano se torna inativo e o tratamento ineficaz (Novick; Bouanchaud, 1971; Lobanovska; Pilla, 2017; Olsen; Christensen; Aarestrup, 2006; Pereira, *et al.*, 2014).

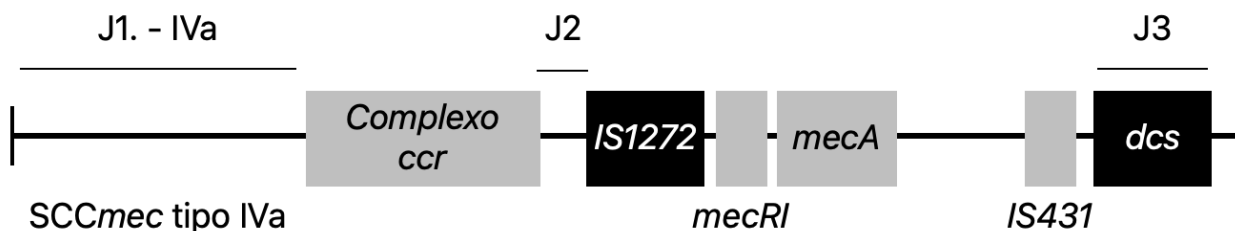
Diante dessa dificuldade, a indústria farmacêutica concentrou seus esforços no desenvolvimento de uma penicilina semissintética, que recebeu o nome de meticilina, adicionando um radical no carbono alfa do grupo funcional do anel beta-lactâmico. Dessa forma, a enzima penicilinase não era mais ativa contra o antimicrobiano. A utilização, de fato, desse novo fármaco se deu no início da década de 60, contudo, isolados apresentando resistência ao novo antimicrobiano foram reportados em 1961 (Jevons, 1961; Harkins *et al.*, 2017; Lobanovska; Pilla, 2017).

Entretanto, apenas no ano de 1981, foi descoberto o mecanismo de resistência a meticilina. Foi demonstrado que tais isolados conduziam o gene *mecA* que, diferente do gene *blaZ*, codifica a produção de uma proteína ligadora de penicilina (*penicillin-binding protein* - PBP) modificada, denominada PBP-2a, que apresenta baixa afinidade a meticilina. Após os primeiros casos serem descritos na Inglaterra, isolados com esse perfil se espalharam, sendo reportados também na Austrália e Estados Unidos. Surgiam, assim, os isolados MRSA, que a partir da década de 80 vêm sendo responsáveis por ocasionar grande número das infecções estafilocócicas ao redor do globo. No Brasil, o

primeiro caso de isolados MRSA foi descrito no Rio de Janeiro, no ano de 1987 (Reichmann; Pinho, 2017; Sassine *et al.*, 2017; Andrade *et al.*, 2020).

O gene *mec* está inserido em elemento geneticamente móvel denominado Cassete Cromossômico Estafilocócico (*Staphylococcal Chromosomal Cassette mec* – SCC*mec*). Dentro desse cassete existem algumas regiões importantes de estudo, são elas: o elemento *cassete chromosome recombinase (ccr)* responsável pela mobilidade do cassete; a região onde está contida o gene *mec*; as regiões de nucleotídeos repetidos ao final e início da sequência, necessários para o deslocamento do cassete e a região *downstream common sequence (dcs)* localizada na extremidade 3' do cassete, compreendida como sequência terminal. Ainda, outro elemento chave no cassete é conhecido como a região J. Essa, que é dividida em três regiões: J1; J2 e J3, pode conter genes que são responsáveis pela expressão de variados fatores de virulência e resistência a outros grupos de fármacos que não beta-lactâmicos. A região J1 está localizada entre a porção inicial do cassete e o complexo *ccr*; J2 está localizada entre o complexo *ccr* e o gene *mec* e a região J3 está localizada entre o gene *mec* e a porção final do cassete (figura 1) (Chanayat *et al.*, 2021; Uehara, 2022).

Figura 1 - Elementos que compõe o Cassete Cromossômico Estafilocócico



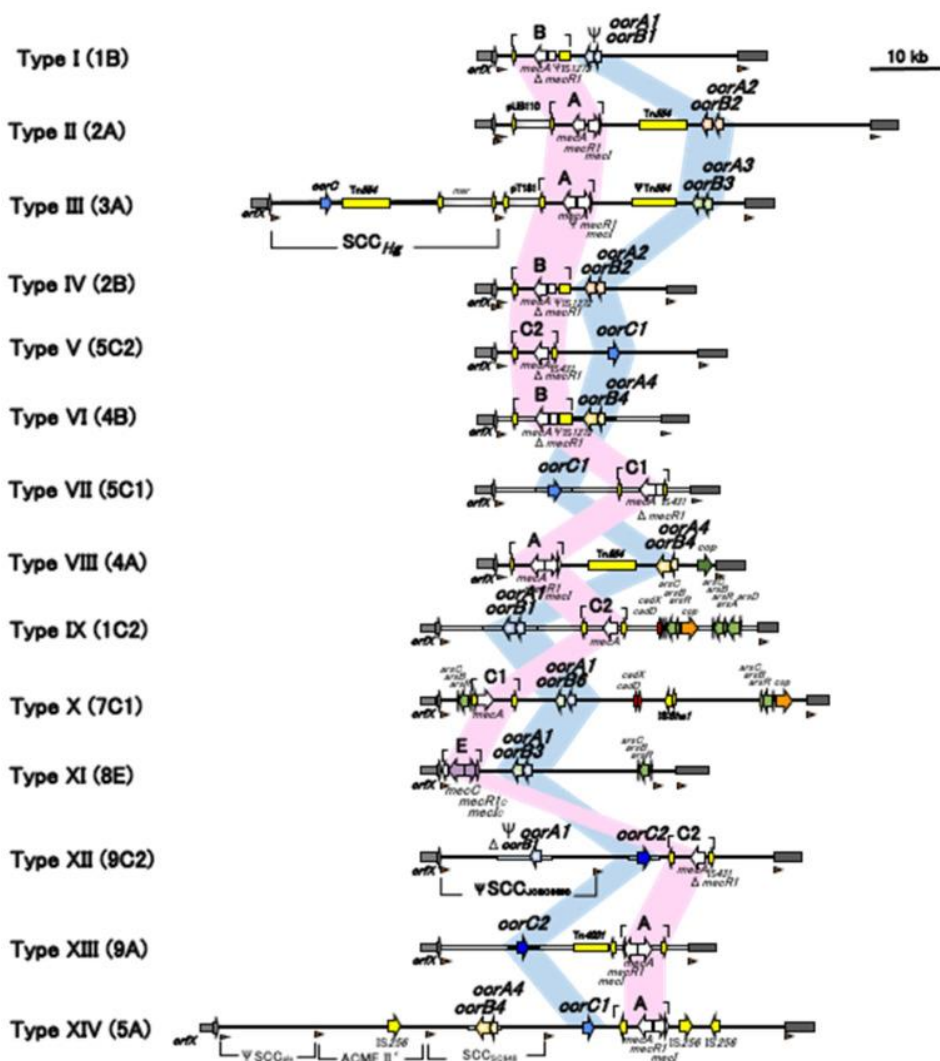
Fonte: Adaptado de Milheiriço; Oliveira e Lencastre (2007)

Além do gene *mecA*, predominante na expressão da resistência aos fármacos beta-lactâmicos, outros genes da família *mec* estão descritos na literatura. No ano de 2011, na Irlanda, foi reportado um homólogo do *mecA*, denominado *mecC*, relacionado aos *Livestock Associated*- MRSA (LA-MRSA). De acordo com Shore e colaboradores

(2011) e García-Álvarez colaboradores (2011), que primeiro detalharam esse fenômeno, o gene variante apresenta 70% de homologia com o *mecA* produzindo uma PBP com 63% de similaridade à PBP 2a. Há, também, relatos dos genes *mecB* e *mecD*, que são descritos com menor frequência do que o gene anterior, e são mais facilmente encontrados em *Micrococcus caseolyticus*. Quanto ao sistema de regulação, dentro do cassete, o *mecC* depende dos genes *mecI-mecRI*, assim como ocorre para o *mecA* (Silva *et al.*, 2021).

Dessa forma fica evidente que, com as diferentes combinações, há diversidade nos tipos de elementos *SCCmec*. Até o momento, o *International Working Group on the Classification of Staphylococcal Cassette Chromosome Elements* (IWG-SCC) já catalogou 13 diferentes tipos de *SCCmec*, contudo, em recente trabalho publicado por Urushibara e colaboradores (2019) foi descrito o elemento *SCCmec* de número XIV (figura 2). Importante ressaltar que, além de conduzir à resistência a meticilina, o cassete *SCCmec*, por estar em um elemento geneticamente móvel, pode ser transferido entre isolados de *Staphylococcus* spp., o que corrobora a importância de se conhecer quais os tipos de *SCCmec* prevalentes em cada serviço (Kang; Hwang, 2021).

Figura 2 - Representação esquemática dos diferentes tipos de elementos SCCmec, tipo I ao XIV.



Fonte: Uehara (2022).

Há ainda, a descrição de isolados de *S. aureus*, *mecA* positivos, que expressam resistência heterogênea a oxacilina. Estes isolados apresentam Concentração Inibitória Mínima (CIM) para oxacilina que varia da faixa sensível ($\leq 2 \mu\text{g/mL}$) a moderadamente alta ($2 - 16 \mu\text{g/mL}$), ou extremamente alta ($\geq 256 \mu\text{g/mL}$). Devido a esse fenômeno, o *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI) trouxe em seu mais recente

documento a seguinte definição: aqueles isolados que apresentam o gene *mecA* e/ou CIM para oxacilina \geq a 4 $\mu\text{g/mL}$ devem ser definidos como MRSA (CLSI, 2021).

Não obstante a esses mecanismos de resistência, mais comumente apresentados por isolados de *S. aureus*, foi descrito, em um estudo realizado com isolados provenientes de swab nasal, coletados de trabalhadores de saúde de três hospitais localizados na Alemanha, entre os anos de 1995 e 1996, um tipo diferente de MRSA. No início, os pesquisadores o classificaram como sendo um MRSA “dormente”, pois, embora, inicialmente, fossem sensíveis a oxacilina, após 4 dias de exposição ao antimicrobiano esses se tornavam resistentes. Surgiu, assim, o termo *Oxacillin-Susceptible MRSA* (OS-MRSA) (Pournaras *et al.*, 2015).

Após isso, em estudo conduzido por Petinaki, Kontos e Maniatis (2002) foram relatados isolados de *S. aureus*, de materiais clínicos diversos, oriundos de pacientes internados em um hospital universitário de Thessalia (Grécia) que, embora apresentassem CIM para oxacilina variando entre 0,5 e 1,0, foram positivos para o gene *mecA*. Ainda em 2002, em outro estudo realizado com *S. aureus* coletados de pacientes internados em quatro diferentes hospitais de Taiwan, foram descritos isolados MSSA que apresentavam o gene *mecA* (Chen *et al.*, 2009).

Saaed e colaboradores (2014) descreveram isolados com as características OS-MRSA em um estudo multicêntrico conduzido em sete hospitais do Reino Unido. Forbes e colaboradores (2008) encontraram isolados OS-MRSA coletados de materiais clínicos de pacientes internados em um hospital dos EUA. Andrade-Figueiredo; Leal-Balbino (2016) foram os primeiros a descrever a presença de OS-MRSA no Brasil, assim como Duarte e colaboradores (2019) descreveram a presença dessa bactéria em um hospital universitário do sul do Brasil.

Embora vários estudos tenham relatado a presença de isolados OS-MRSA em diversos serviços de saúde ao redor do mundo, não se sabe ao certo qual o seu mecanismo de resistência. Entre as hipóteses mais aceitas estão a presença de mutações em genes da família *femXAB*; há ainda teorias que esses isolados, em seu cassete cromossômico, apresentam um repressor não funcional do gene responsável por produzir a enzima beta-lactamase (*blaI*) além de mutação na porção N-terminal de

seu repressor (*blaR1*). Outros autores descrevem uma substituição de nucleotídeos (-7G para T e -33C para T) na sequência promotora do gene *mecA* em isolados OS-MRSA. Ainda, além do gene *mecA* a falta da PBP4, alta atividade da enzima Fem e mutações nos genes associados a RNA polimerase e RNAt foram descritas como potenciais mecanismos para o surgimento de OS-MRSA (Boonsiri *et al.*, 2020; Liu *et al.*, 2020; Pournaras *et al.*, 2015).

Diante dos diferentes mecanismos de resistência apresentados por *S. aureus* aos fármacos beta-lactâmicos outras opções terapêuticas precisaram ser pensadas para tratar pacientes com infecções ocasionadas por MRSA. No ano de 1980 a vancomicina, bem como a teicoplanina, antimicrobianos da classe dos glicopeptídeos, começaram a ser empregadas para o tratamento de pacientes graves internados em ambiente hospitalar. O fármaco, que tem afinidade ao alvo D-alanil-D-alanina (D-ala-D-ala), aminoácidos finais da cadeia de peptídeo-glicano da célula bacteriana, se complexa a D-alanina, seu local de ação, e impede a síntese de parede celular do microrganismo (Unni; Siddiqui; Bidaisee, 2021).

De acordo com Cong, Yang e Rao (2020) os isolados de *S. aureus*, que apresentam redução em sua sensibilidade a vancomicina podem ser classificados da seguinte forma: os que apresentam CIM para vancomicina $\leq 2 \mu\text{g/ml}$ são classificados como *vancomycin-susceptible S. aureus* (VSSA); os que apresentam CIM entre 4–8 $\mu\text{g/ml}$ são denominados *vancomycin intermediate S. aureus* (VISA) e aqueles com CIM $\geq 16 \mu\text{g/ml}$ são tidos como *vancomycin resistant S. aureus* (VRSA). Ainda, isolados são classificados como VRSA quando apresentam, por técnicas moleculares, amplificação do operon *van*.

Após ser amplamente utilizada para o tratamento de infecções graves ocasionadas por MRSA os primeiros relatos de sensibilidade reduzida a vancomicina começaram a surgir. Hiramatsu e colaboradores (1997), foi o primeiro pesquisador que, no Japão, descreveu isolados MRSA com baixa sensibilidade a vancomicina. Atualmente, isolados VRSA já foram reportados em diversos países nos continentes Americano, Africano, Europeu e Asiático (Shahid *et al.*, 2021)

Houve então grande preocupação da comunidade científica, pois surgiu a teoria de que isolados *S. aureus* estariam herdando genes de resistência de *Enterococcus* spp..

Entretanto, um ano após a descrição do primeiro isolado com resistência diminuída a vancomicina, evidenciou-se que esse fenômeno ocorrera não pela aquisição do operon *van*, principal hipótese a época, mas sim pela hiperprodução de resíduos de Ácido N-Acetil Murâmico (NAM). Assim, isolados com a característica VISA ocorrem por produzir uma parede celular mais espessa do que as células padrão, o que gera uma maior concentração final de D-ala-D-ala, alvo do antimicrobiano na parede celular (Hiramatsu, 1998).

No ano de 2002, entretanto, foi descrita em Michigan (EUA) o primeiro isolado VRSA. No mesmo ano, outro isolado foi detectado no estado da Pensilvânia (EUA) e, desde então, outros 52 isolados foram descritos em toda literatura, sendo 14 nos EUA, 16 na Índia, 11 no Iran, 9 no Paquistão, 1 no Brasil e em Portugal. Como dito anteriormente, a resistência total a vancomicina (VRSA) se dá pela aquisição e expressão do operon *van*. Esse operon modifica o aminoácido final na síntese do peptídeo-glicano bacteriano de D-ala-D-ala para D-alanina-D-lactato (D-ala-D-lac) ou D-alanina-D-serina (D-ala-D-ser). Ao todo foram descritos 11 operons *van*, dos quais *vanA*, *vanB*, *vanD*, *van F*, *vanI*, e *vanM* modificam o alvo para D-ala-D-lac e conferem altos níveis de resistência a vancomicina (CIM > 256 mg/ml) e *vanC*, *vanE*, *vanG*, *vanL* e *vanN*, que modificam o alvo para D-ala-D-ser e promovem baixos níveis de resistência ao fármaco (CIM 8–16 mg/ml) (Cong; Yang; Rao, 2020).

A permeabilidade da membrana celular parece ter importante papel na resistência aos antimicrobianos. Quanto menor for a permeabilidade menor será a captação de substâncias externas, inclui-se os antimicrobianos. Fato esse, visto na sensibilidade reduzida de *S. aureus* aos aminoglicosídeos por espessamento de parede celular. Ainda, os microrganismos podem apresentar bombas de efluxo, onde as proteínas de membrana: QacA, NorA, e Sm possuem relevância quanto ao fenômeno de resistência em *S. aureus*, principalmente a proteína QacA. Essas proteínas trabalham às custas de ATP e funcionam como bombas de prótons trocadoras de H⁺. Sua principal função é trocar o íon do ambiente externo para dentro da célula e, em contrapartida, expulsar o antimicrobiano do interior para o meio externo (Guo *et al.*, 2020)

1.4 Virulência

Os fatores de virulência são de extrema importância para infectividade e sucesso patogênico de *S. aureus*. Esses fatores auxiliam o microrganismo no ataque e invasão ao tecido alvo, bem como na evasão dos mecanismos de defesa do hospedeiro ou de agentes químicos que tentam desestabilizar a célula. A produção de exotoxinas e enzimas, como collagenases, proteases, lipases e nucleases é notadamente presente nos isolados de *S. aureus*. Algumas exotoxinas, como é o caso da *Panton-Valentine Leukocidin* (PVL), possuem a capacidade de lisar as células de defesa, promovendo extravasamento de seu conteúdo. Há ainda a classe de toxinas superantigênicas, como é o caso da *Toxic Shock Syndrome Toxin-1* (TSST). Essa toxina tem a capacidade de induzir a proliferação de células T, ocasionando exacerbação da reação inflamatória (Tasneem *et al.*, 2022).

O gene responsável por codificar a leucocidina PVL (*lukF-PV* e *lukS-PV*) é conhecido por ter característica binária, ou seja, precisa que os dois componentes sejam ativos e expressos para que haja formação da toxina. Sua identificação inicial se deu em 1932, e, atualmente, tem sido usualmente identificado em amostras oriundas do trato respiratório inferior e infecções de pele e partes moles, ocasionando abscessos e pneumonia necrotizante. Ainda, a identificação do gene que codifica PVL, parece estar relacionado aos clones oriundos da comunidade, denominados *community-acquired MRSA* (CA-MRSA). Essa toxina tem a capacidade de formar poros na membrana das células de defesa e gerar extrusão de seu conteúdo, o que contribui para o aumento do padrão inflamatório e, conseqüente, diminuição da efetividade da resposta imune. Ainda, quanto aos pacientes com infecção de corrente sanguínea estafilocócica, a presença da PVL, embora, diretamente, não aumente a mortalidade, está relacionada ao prolongamento do quadro febril (Da *et al.*, 2022; Hasan; Jasim, 2021).

A síndrome do choque tóxico, relacionada a expressão do gene que codifica TSST, é uma grave condição clínica sistêmica, que ocasiona alterações fisiológicas importantes nos pacientes. O antígeno produzido pelo microrganismo gera ampliação da resposta inflamatória mediada por células T, após estímulo do receptor CD28, presentes no complexo maior de histocompatibilidade 2 (*major histocompatibility complex* - MHC-2). Essa ativação intensa culmina na liberação, exacerbada, de citocinas

pró-inflamatórias como TNF- α e IL-1 que, clinicamente, cursam com choque, hipotensão, hipertermia, distúrbio gastrointestinal, rash erimatoso e sintomas neurológicos, como letargia e irritabilidade. Assim, é importante ressaltar a associação da produção dessa toxina, principalmente nas ICS estafilocócicas, com elevados índices de morbimortalidade (Abuzneid *et al.*, 2021; Gossack-keenan; Kam; Kam, 2017).

Aliado a produção de moléculas superantigênicas e leucocidinas, isolados de *S. aureus* são, notadamente, reconhecidos por sua capacidade de formar biofilmes. A formação dessa comunidade bacteriana, segundo dados do *National Institute of Health* (NIH), é responsável por até 80% das infecções nosocomiais relacionadas ao patógeno (Harapanahalli *et al.*, 2015).

Os biofilmes, envoltos por uma matriz polimérica extracelular, em geral composta por *polysaccharide intercellular adhesion* (PIA), proteínas, ácido teicóico e fragmentos de DNA, formam o ambiente ideal para que haja proliferação do microrganismo, fora do alcance das células de defesa ou dos agentes antimicrobianos. A formação do biofilme, que ocorre em três fases (maturação, proliferação e lise) está, intimamente, relacionada a utilização de próteses e dispositivos invasivos como sondas e cateter, que facilitam a adesão e proliferação do biofilme. Ainda, proteínas de ancoragem celular, presentes na superfície das células, facilitam a formação do biofilme em superfícies humanas (Cheung; Bae; Otto, 2021). A síntese, e acúmulo dessa matriz, dependente de PIA, ocorre pela expressão do operon *ica*, em *S. aureus*, com a expressão do *icaA* sendo fortemente associada a formação do biofilme (Ghasemzadeh; Najafpour; Mohammadi, 2021; Harapanahalli *et al.*, 2015; Kivanç *et al.*, 2017; Qiao *et al.*, 2021).

2. EPIDEMIOLOGIA

Staphylococcus aureus é um dos microrganismos mais prevalentes nas infecções humanas. Fato esse, que pode ser explicado por esse ser um microrganismo residente da microbiota normal, estando presente em 20-30% dos indivíduos saudáveis. Ao romper as barreiras fisiológicas e/ ou, nos estados de imunodeficiência, tais microrganismos conseguem invadir tecidos e ocasionar as mais variadas infecções, como abscessos, pneumonia, infecção de corrente sanguínea, endocardite, osteomielite, entre outras. A rápida aquisição de genes de resistência, bem como sua presença na microbiota, são importantes fatores de risco nas infecções estafilocócicas. Há estimativas de que a mortalidade, decorrente de infecções ocasionadas por microrganismos multirresistentes, irá acometer cerca de 10 milhões de pessoas, anualmente, até 2050 (Ahmad-Mansour *et al.*, 2021).

É notável a modificação epidemiológica cujos isolados de *S. aureus* vêm passando ao longo do tempo. Essa alteração se deve, entre outros, aos mais variados mecanismos de resistência aos antimicrobianos, bem como, aos diversos fatores de virulência, que o tornam um patógeno de elevado interesse clínico. Ainda, é possível inferir que: o uso indiscriminado de agentes antimicrobianos, características populacionais, aglomerações e subdiagnóstico de doenças têm grande influência em sua transformação epidemiológica (Romero, 2021).

Uma tentativa de auxiliar na identificação epidemiológica dos isolados foi sua distinção entre *healthcare-associated* -MRSA (HA-MRSA), *community-associated*-MRSA (CA - MRSA) e *livestock-associated* – MRSA (LA - MRSA). Tal classificação é realizada de acordo com o perfil de resistência exibido pelos isolados, bem como a presença de genes de virulência e tipificação do cassete cromossômico. Contudo, existe uma tendência de esses isolados se movimentarem de um ambiente para outro, o que pode dificultar a distinção entre eles (Pimentel *et al.*, 2021).

Por muito tempo os isolados de *S. aureus* que continham os cassetes cromossômicos dos tipos I, II e III foram relacionados com infecções adquiridas no ambiente hospitalar, sendo esses classificados como HA-MRSA. Já aqueles isolados que apresentavam os cassetes dos tipos IV e V, que possuem como característica:

menor tamanho e presença de menos genes de resistência, foram, notadamente, associadas às infecções adquiridas na comunidade, sendo classificados em CA-MRSA. Porém, com a integração do ambiente hospitalar e comunitário, bem como com a dispersão dos microrganismos, essa distinção tem se tornado cada vez mais difícil de ser feita (Cohen *et al.*, 2021).

Além dos cassetes cromossômicos é possível entender a epidemiologia de *S. aureus* através do Complexo Clonal (CC). Definidos pelo *Multilocus Sequence Typing* (MLST) os CC's com maior prevalência são: CC1, CC5, CC8, CC22, CC30, CC45, CC59 e CC80. Entre eles, os clones pertencentes ao CC30 possuem grande impacto na saúde global, tendo sido relacionados a três ondas pandêmicas: MSSA tipo 80/81 (sequence type 30 [ST30] -MSSA), MRSA-16 epidêmico (EMRSA-16) (ST36 MRSA SCC*mec* type II [ST36-MRSA-II]) e clone do sudeste do pacífico (ST30-MRSA-IV). Ainda, a aquisição dos genes que codificam PVL e TSST, nos isolados pertencentes ao CC30, reforçam a relevância clínico-epidemiológica de tais isolados (Di gregorio *et al.*, 2021).

Igualmente, isolados pertencentes ao CC5 têm sido, particularmente, importantes nas infecções de corrente sanguínea persistentes e choque séptico. Outro ponto de interesse é a sua elevada prevalência em infecções ao redor do globo, bem como a associação do complexo a falta de regulação do complexo *Agr*, um operon importante para síntese de fatores de virulência, como produção de toxinas, formação de biofilme e expressão do gene *mecA* (Chen *et al.*, 2021; Fernández-hidalgo *et al.*, 2018; Lee *et al.*, 2021).

Não obstante os mecanismos de resistência e virulência apresentados pelo patógeno, estimativas apontam que, aproximadamente, 21% das infecções de corrente sanguínea possuem como agente etiológico *S. aureus*. Essas infecções que podem ter como fonte, tanto uma escovação de dentes mais vigorosa, como serem associadas a procedimentos e dispositivos médicos, necessitam de um diagnóstico rápido e assertivo, devido a sua rápida progressão e gravidade clínica. A incidência de infecções de corrente sanguínea, ocasionadas por *S. aureus*, é de cerca de 20-50 por 100 mil habitantes, com mortalidade estimada de 10-30% dos casos (Smith *et al.*, 2021).

Quanto a resistência aos antimicrobianos, sua identificação, em laboratórios clínicos, rotineiramente, é realizada por testes de sensibilidade, seja de forma manual,

utilizando disco de difusão, ou empregando os sistemas automatizados. Contudo, após o surgimento dos isolados OS-MRSA essa rotina de identificação se tornou ineficiente. Embora tais isolados apresentem CIM para oxacilina na faixa do sensível ($\leq 2\mu\text{l/mL}$), sendo identificados, fenotipicamente, como MSSA, eles contêm o gene *mecA*, e possuem a capacidade de se tornarem altamente resistentes aos fármacos beta lactâmicos quando expostos a ele, ou mesmo a mupirocina (Liu *et al.*, 2021; Liu *et al.*, 2020).

A primeira descrição de isolados OS-MRSA veio de um estudo conduzido na Alemanha, com isolados coletados entre anos de 1995 e 1996, da região nasal e orofaringe de 447 trabalhadores da área da saúde. Nesse estudo, seis isolados foram caracterizados como OS-MRSA. Já o segundo relato veio de um estudo conduzido na Grécia em 2001, onde de um total de 225 isolados MSSA, 25 foram considerados OS-MRSA. Em outro estudo, conduzido no território de Taiwan, em 26 hospitais, entre os anos de 2002 e 2008, encontrou como prevalência 21,4% (58/271) isolados OS MRSA (Pournaras *et al.*, 2015).

Desde então, outros autores têm descrito achados de isolados OS MRSA, porém sua prevalência é extremamente variável. Uma série de fatores estão envolvidos em sua epidemiologia, como: dificuldade de identificação, isolados oriundos da comunidade ou do ambiente promotor de saúde, além da variedade de sítios infecciosos de onde os isolados são captados. Assim, estudos apontam que a epidemiologia de OS-MRSA pode variar entre 1,25 a 52% (Andrade-Figueiredo; Leal-Balbino, 2016; Duarte *et al.*, 2018; Liu *et al.*, 2021).

Em revisão de literatura realizado por Ma e colaboradores (2021) é possível entender essa diversidade epidemiológica entre os isolados OS-MRSA. Entre os estudos avaliados pelos autores, houve variação entre 1,6%, em estudo conduzido com trabalhadores da área da saúde, e 11% em outro estudo realizado com pacientes internados em um hospital grego. Em outro estudo, conduzido por He e colaboradores (2013), em nove cidades chinesas, com 1588 isolados de diferentes sítios, foram detectadas as maiores prevalências nas cidades de Guangzhou (30%); em Pequim (18,3%); em Wuhan (15,1%) e Hangzhou (13,3%). (He *et al.*, 2013; Ma *et al.*, 2021).

Além de uma prevalência distinta entre as diversas regiões do globo, a presença do cassete cromossômico, bem como os genes de virulência presentes em tais isolados também é bastante variável. Em estudo conduzido por Liu e colaboradores (2021), isolados que continham o SCC*mec* tipo IV, ST 59, e o gene *pvl* foram os mais prevalentes. Também, Liu e colaboradores (2020), que estudaram isolados clínicos coletados em 10 hospitais de Shanghai, encontram com maior prevalência de isolados que continham o cassete cromossômico tipo IV, contudo, diferente do primeiro estudo, o gene *pvl* apenas foi detectado em um isolado (Liu; *et al.*, 2021).

Boonsiri e colaboradores (2020), após avaliarem 43 isolados OS-MRSA, oriundos de diferentes materiais clínicos, identificaram maior prevalência de isolados apresentando o SCC*mec* tipo V, com os ST's 121, 59 e 89, além do cassete tipo IV, com o ST tipo 8.

Portanto, a diversidade epidemiológica apresentada pelos isolados OS-MRSA é notável, assim como a grande importância dos *S. aureus* ocasionando infecção de corrente sanguínea. Desse modo, esse estudo pretende descrever a frequência de isolados OS-MRSA, provenientes de ICS, de pacientes internados em um hospital universitário do sul do Brasil, bem como, avaliar as suas características moleculares e dados clínicos relacionados a internação.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Determinar a frequência, e a epidemiologia molecular, de isolados OS-MRSA, de pacientes com infecção de corrente sanguínea, internados em um hospital universitário do Sul do Brasil, entre 2011 e 2020, bem como estabelecer sua correlação com os aspectos clínicos do paciente.

3.2 Objetivos Específicos

- Avaliar o perfil de sensibilidade aos antimicrobianos de *S. aureus* isolados de hemocultura.
- Determinar a CIM para oxacilina, vancomicina, teicoplanina, daptomicina e linezolida.
- Detectar os genes de resistência *mecA* e *vanA*, relacionados a resistência aos antimicrobianos beta-lactâmicos e glicopeptídeos, por técnicas moleculares.
- Determinar a relação clonal entre os isolados por técnica de *High-Resolution Melting* (HRM)/ RTq-PCR
- Avaliar o desfecho clínico (alta ou óbito) para pacientes com infecção de corrente sanguínea ocasionada por isolados OS-MRSA.
- Comparar variáveis demográficas, clínicas e relacionadas ao internamento de pacientes com infecção por isolados MSSA; MRSA e OS-MRSA.
- Descrever a evolução de clínica de pacientes com infecção de corrente sanguínea ocasionada por isolados OS-MRSA.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Desenho do Estudo e Amostras

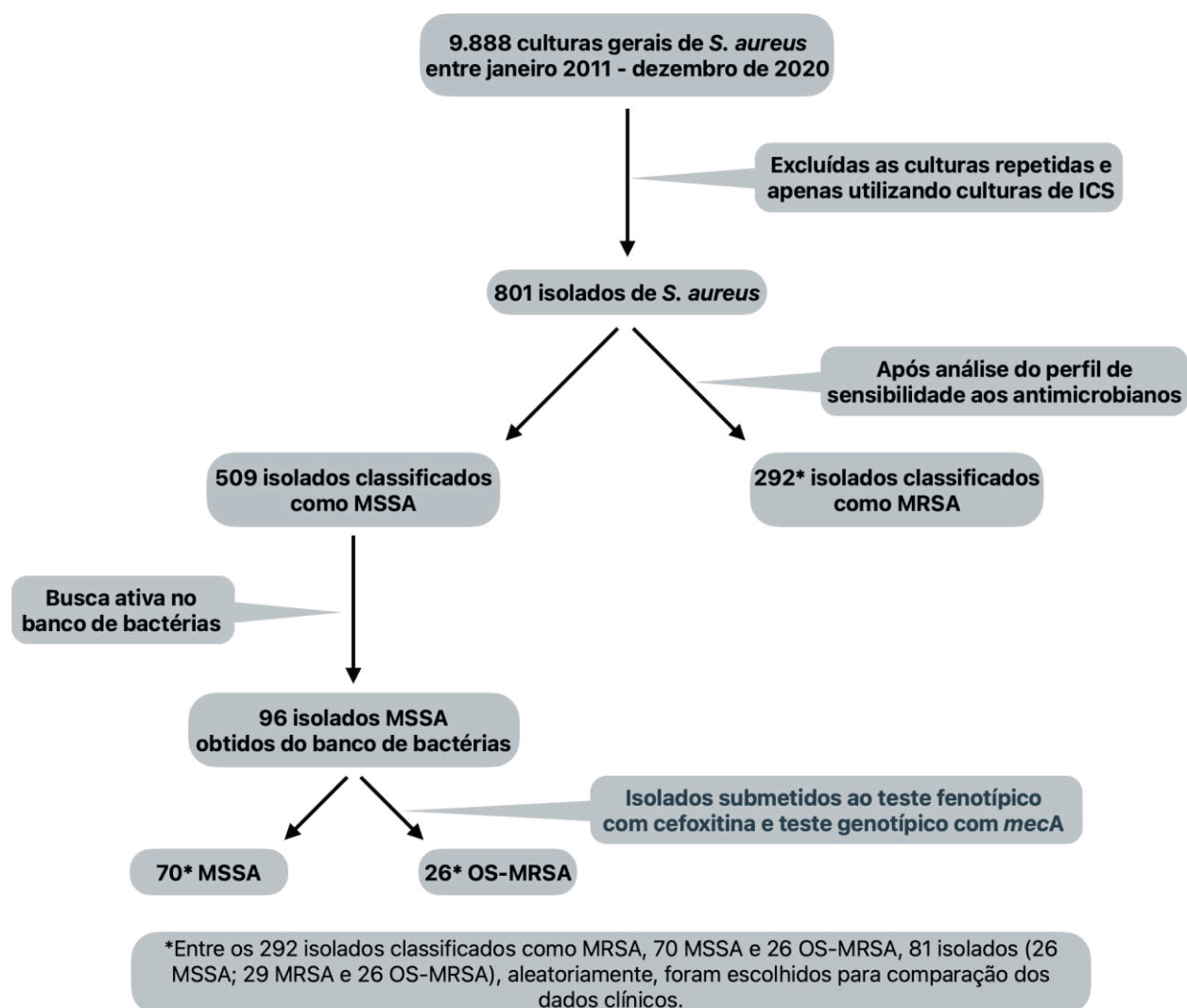
Trata-se de um estudo retrospectivo, transversal, descritivo e observacional de *S. aureus*, isolados de hemocultura, coletadas de pacientes internados em um hospital do Sul do Brasil, entre 2011 e 2020, diagnosticados com Infecção de Corrente sanguínea, de acordo com os protocolos vigentes, cujas amostras estavam estocadas no banco de bactérias do laboratório de análises clínicas, setor de microbiologia, do hospital.

Neste período foram identificadas 9.888 culturas de *S. aureus* de diversos materiais clínicos. Avaliando apenas uma amostra, de material clínico hemocultura, por paciente, chegamos a um número de 801 amostras. Desses, 509 foram identificados, fenotipicamente, como MSSA e 292 como MRSA. Avaliando, apenas, isolados definidos como MSSA, para uma prevalência descrita em literatura de 25%, de acordo com Pournaras e colaboradores (2015) e Duarte e colaboradores (2018), com erro amostral de 5% e intervalo de confiança de 95%, para relevância estatística epidemiológica, esse estudo deveria, no mínimo, conter uma população de estudo de 73 amostras. Assim, tendo em mente tal informação, foi possível resgatar do banco de bactérias 96 amostras, que foram incluídos e avaliados neste trabalho.

Como critérios de exclusão, os isolados repetidos não foram avaliados nesse estudo.

Ainda, entre os 801 isolados, 81, por conveniência, foram selecionados para caracterização clínica e comparação entre grupos (26 MSSA; 29 MRSA e 26 OS-MRSA).

Figura 3 - Fluxograma de coleta, processamento e análise amostral



Legenda: MSSA – *Methicillin Sensible Staphylococcus aureus*; MRSA – *Methicillin Resistant S. aureus*; OS-MRSA – *Oxacillin Sensible – Methicillin Resistant*.

4.2 Identificação de *S. aureus*

Os isolados foram identificados utilizando metodologia Manual, de acordo com Jorsensen (2015) e automatizada, utilizando os sistemas Phoenix[®] (Becton, Dickinson), Microscan[®] (Siemens-Califórnia) e Vitek[®] 2 (bioMeri  ux-USA). Os isolados, retirados do estoque, novamente, foram identificados por metodologia manual e pela amplifica  o de seq  ncias conservadas n  o amb  guas do DNA de *S. aureus* (Lourdes *et al.*, 2004; Martineau *et al.*, 1998)

4.3 Forma  o de Biofilme

A capacidade de forma  o de biofilme dos isolados cl  nicos foi determinada utilizando placas de poliestireno de fundo chato, 96 po  os, de acordo com Stepanovic e colaboradores (2007), com modifica  es. As c  lulas foram cultivadas em TSB a 37  C por 24 horas, semeadas em   gar Columbia e incubadas sob as mesmas condi  es. Para a forma  o do biofilme, o in  culo foi ajustado na escala 0,5 de McFarland (1×10^8 UFC/mL) e 20   L foram acrescentados aos po  os contendo 180   L de meio TSB (concentra  o final de c  lulas = 1×10^6 UFC/mL) e a placa foi incubada novamente sob as mesmas condi  es, sem agita  o. A leitura foi realizada em espectrofot  metro (Synergy TM HT, Biotek[®]) utilizando o software *Gen5 Data Analysis*, com a mensura  o da densidade   ptica (DO) em comprimento de onda a 570 nm.

4.4 Determina  o da Sensibilidades aos Antimicrobianos

A determina  o da sensibilidade aos antimicrobianos foi realizada por t  cnica de disco de difus  o (CLSI 2021) e por microdilui  o automatizada (Phoenix[®] [Becton, Dickinson], Microscan[®] [Siemens-Calif  rnia] e Vitek[®] 2 [bioMeri  ux-USA]), de acordo com cada per  odo. Os antimicrobianos utilizados, bem como os pontos de corte utilizados, foram os contidos no CLSI (2021).

4.5 Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) pelo método de *e-test*[®]

A determinação da CIM para oxacilina, vancomicina, teicoplanina, daptomicina e linezolida, foi realizada por metodologia *e-test*[®] (BioMérieux-USA) segundo as recomendações do fabricante e de acordo com o descrito no documento CLSI (2021).

4.6 Identificação de isolados hVISA através da Análise do Perfil Populacional (PAP)

Em placas de ágar BHI, acrescidos de vancomicina, nas concentrações 0,5; 1,0; 2,0; 4,0; 6,0 e 8,0µg/mL foram adicionados 10µL de inóculo bacteriano, ajustado na concentração $1,5 \times 10^6$ UFC/mL. Após distribuir o inóculo em cada uma das placas com as diferentes concentrações de antimicrobiano, as placas foram incubadas em estufa bacteriológica ($37^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$) por 24h. Após contagem do número de colônias, que se desenvolveram em cada uma das diferentes concentrações, foi feito um gráfico, em escala semi-logaritmica, utilizando o programa GraphPad-Prism 5, para a calcular a área sob a curva (AUC). Os dados obtidos foram comparados com o resultado das cepas padrão (*S. aureus* ATCC[®] 700698 Mu3 (hVISA) e *S. aureus* ATCC[®] 700699 Mu50 (VISA), classificando em hVISA aqueles isolados que apresentam valor de $\text{AUC} \geq 0,9$ e $< 1,3$ e em VISA os isolados com $\text{AUV} \geq 1,3$ (Wootton *et al.*, 2007).

4.7 Extração do Ácido Nucleico

A extração do DNA total foi realizada de acordo com metodologia descrita em Sambrook, Russel e Maniatis 1989, com modificações.

4.8 Detecção do gene *mecA* e Tipagem *SCCmec*

As reações de PCR para a detecção do gene *mecA* foram realizadas conforme os parâmetros descritos por Milheiriço e colaboradores (2007). A amplificação dos elementos *SCCmec* foi feita conforme descrito por Boyle e colaboradores (2007). Em todas as reações realizadas foram utilizadas linhagens de referência internacional, como controle positivo (*S. aureus* ATCC 33591) e negativo (*S. aureus* ATCC 25923).

4.9 Detecção dos genes de Resistência à Vancomicina (*vanA* e *vanB*)

As reações de PCR para a detecção dos genes *vanA* e *vanB* foram realizadas conforme os parâmetros descritos por Clark e colaboradores (1993).

4.10 High-Resolution Melting (HRM)

As reações de HRM foram realizadas para determinação do *Clonal Complex* (CC) e *Sequence Typing* (ST) dos isolados deste estudo conforme descrito por Lilliebridge e colaboradores (2011).

4.11 Avaliação clínica

A caracterização clínica dos pacientes foi realizada pela busca ativa em prontuários clínicos e avaliação das fichas de notificação de infecção da Comissão de Controle de Infecção Hospitalar (CCIH) do HU-UEL.

4.12 Avaliação Estatística

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. Foram tidos como resultados significativamente estatísticos aqueles que apresentaram valor de $p \leq 0,05$, com intervalo de confiança fixado em 95%.

4.13 Locais de Realização do Estudo

4.13.1 Coleta das Amostras

O processamento das amostras, identificação e avaliação do perfil de sensibilidade aos antimicrobianos, foi realizada no laboratório de análises clínicas, setor de microbiologia, do HU-UEL.

4.13.2 Análise Molecular

A caracterização genotípica dos isolados, bem como a pesquisa dos genes de resistência aos antimicrobianos, virulência e análise de expansão clonal foi realizada no laboratório de Biologia Molecular de Microrganismos do Núcleo Integrado em Pesquisa (NIP-5), localizado no Centro de Ciências Biológicas (CCB) da Universidade Estadual de Londrina.

5. ASPECTOS ÉTICOS

O estudo foi analisado pelo Comitê de Ética em Pesquisa envolvendo seres humanos da Universidade Estadual de Londrina (CEP/ UEL), tendo sido aprovado em 22 de junho de 2021, sob o parecer: 4.796.146.

6. RESULTADOS

Inicialmente, 9.988 *S. aureus* isolados de amostras clínicas, de pacientes internados em um hospital universitário do sul do Brasil, entre os períodos de janeiro de 2011 a dezembro de 2020, foram incluídos nesse estudo. Desses, excluindo as culturas repetidas, e apenas avaliando uma amostra por paciente, material clínico hemocultura, restaram 801 isolados, classificados como: 292 MRSA e 509 MSSA. Finalmente, dos *S. aureus* considerados sensíveis a meticilina, 96 isolados, estocados em freezer -20°C no banco de bactérias no laboratório de patologia, análises clínicas e toxicológicas, setor de microbiologia, de um hospital universitário do sul do Brasil foram selecionados para os testes subsequentes.

Para todos os isolados, inicialmente, a identidade da espécie foi confirmada por PCR utilizando como alvo o gene *nuc*. Todos os isolados continham a sequência pesquisada. Posteriormente, a sensibilidade a cefoxitina foi determinada por técnica de disco de difusão, confirmando a sua classificação como MSSA. Posteriormente, a pesquisa do gene *mecA* revelou que 27% (26/96) dos isolados apresentaram o gene em seu genoma, sendo classificados como OS-MRSA. Nenhum isolado foi positivo para a presença dos genes *vanA* ou *vanB*.

Para os isolados OS-MRSA (n=26), a CIM de oxacilina, variou de 0,125 - 0,5µg/ml; vancomicina de 0,5 - 4,0 µg/ml; Teicoplanina de 0,75 – 4,0 µg/ml; Daptomicina de 0,38 – 1,0 µg/ml e Linezolida de 0,75 – 3,0 µg/ml.

Quanto aos genes de virulência (*icaA*, *pvl* e *tst*), estes foram identificados, respectivamente, em 26 (100%), 24 (92,3%) e 16 (61,53%) genomas. A biomassa dos biofilmes, formados em superfície de poliestireno, foi analisada após coloração com cristal violeta, resultando em valores de densidade óptica variando de 0,61 a 2,03. Todos os isolados foram classificados como fortemente formadores de biofilmes nesta superfície analisada.

Os elementos *SCCmec* também foram caracterizados para os isolados OS-MRSA. O *SCCmec* tipo I foi detectado em 42,30% (11/26) dos isolados, seguido do tipo

IV 23,07% (6/26) e tipo II 3,84% (1/26). Em 30,76% (8/26) dos isolados não foi possível tipificar o elemento *SCCmec*.

A análise dos *Clonal Complex* (CC), bem como dos *Sequence Typing* (ST) foi realizada utilizando a técnica de *High Resolution Melting* PCR. Entre os ST, 11 diferentes tipos foram identificados, sendo os mais prevalentes os ST 99 (9/26 - 34,61%) e ST 32 (2/26 - 7,69%). Quanto aos CC, os isolados foram distribuídos em 6 complexos distintos, sendo os prevalentes o CC 5 (9/26 - 34,61%) e CC15 (6/26 - 23,07%).

Em relação as características clínicas da população estudada, 46,15% (12/26) eram do sexo feminino e 53,85% (14/26) do sexo masculino. A idade variou entre 0 e 82 anos. Quanto ao desfecho clínico, 69,23% (18/26) tiveram alta hospitalar e 23,07% (6/26) evoluíram para óbito. A infecção foi caracterizada como hospitalar em 61,53% (16/26) e como comunitária em 30,76% (8/26) dos casos.

Os resultados desta tese serão discutidos com mais detalhes nos dois trabalhos apresentados a seguir:

6.1 Trabalho 1.

Características fenotípicas e genotípicas de *Staphylococcus aureus* sensível a oxacilina, *mecA* positivo, isolados de pacientes com infecção de corrente sanguínea em um hospital terciário do Sul do Brasil.

Resumo

S. aureus são microrganismos responsáveis por ocasionar uma gama de processos infecciosos, sejam simples, restritos a pele, ou infecções invasivas como bacteremia. O surgimento dos isolados *Oxacillin Sensible – Methicillin Resistant S.aureus* (OS-MRSA) impôs dificuldades ao tratamento de pacientes com infecção estafilocócica, visto que tais isolados podem ser erroneamente classificados como sensíveis e induzir a uma falha na terapia empregada. Assim, o propósito desse estudo é avaliar a prevalência, e características fenotípicas e genotípicas, de isolados OS-MRSA, provenientes de

infecção de corrente sanguínea, coletados de pacientes internados em um hospital do sul do Brasil, bem como avaliar o tratamento empregado. Para isso, 801 isolados únicos de *S. aureus*, coletados de hemocultura, entre janeiro de 2011 a dezembro de 2020, foram avaliados. Desses, 96 isolados foram classificados como sensíveis a oxacilina. Os isolados foram identificados e tiveram seu perfil de sensibilidade realizado por metodologia manual e automatizada. A concentração inibitória mínima para vancomicina, daptomicina, oxacilina, linezolida e teicoplanina foi realizada por *e-test*. Os genes *mecA*, *vanA*, tipagem dos elementos *SCCmec*, bem como a pesquisa dos genes de virulência *icaA*, *tst-1* e *pvl* foram realizadas por PCR. A formação de biofilme foi realizada por técnica de cristal violeta. O *Sequence Type* (ST), bem como o *Clonal Complex* (CC) dos isolados foi avaliado por RTq-PCR. As características clínicas dos pacientes foram avaliadas através de busca ativa em prontuários. Após pesquisa do gene *mecA* 27,1% (26/96) dos isolados foram considerados OS-MRSA, desses, o *SCCmec* tipo I foi o mais prevalente, 46,1% (12/26). Entre os isolados avaliados, 41% (9/22) foram incluídos no CC5 e ST9. Quanto a virulência, todos isolados foram positivos para o gene *icaA* e caracterizados como forte formadores de biofilme. O gene *pvl* foi encontrado em 92,3% (24/26) dos isolados e a toxina da síndrome do choque tóxico estava presente em 61,5% dos isolados (16/26). Todos foram negativos para a presença do gene *vanA*. Quanto ao desfecho clínico, 73% (19/26) dos pacientes receberam alta hospitalar e 27% (7/26) evoluíram para óbito. Com esse estudo, foi possível observar, elevada frequência de isolados OS-MRSA ocasionando infecções de corrente sanguínea. Ainda, tais isolados contém variados genes de virulência, o que pode contribuir para um pior desfecho clínico.

Palavras-chave: OS-MRSA; Sepsis; Virulência; Resistência Bacteriana; Infecção Estafilocócica.

Phenotypic and genotypic characteristics of *mecA*-positive oxacillin-sensitive *Staphylococcus aureus* isolated from patients with bloodstream infection in a tertiary hospital in southern Brazil.

Abstract

S. aureus are extremely important microorganisms, either from an epidemiological point of view or as a pathogen, responsible for causing a series of infectious processes, whether simple, restricted to the skin, or invasive infections such as bacteremia. The appearance of *S. aureus* Oxacillin Sensitive-Methicillin Resistant (OS-MRSA) isolates has imposed difficulties in the treatment of patients with staphylococcal infection, as such isolates can be mistakenly classified as sensitive and lead to failure of the therapy used. Thus, the objective of this study is to evaluate the prevalence, and genotypic and phenotypic characteristics, of OS-MRSA isolates, from bloodstream infections, collected from patients admitted to a hospital in southern Brazil, as well as to evaluate the treatment employed. For this, 801 unique isolates of *S. aureus*, collected from blood cultures, between January 2011 and December 2020 were evaluated. Of these, 96 isolates were classified as sensitive to oxacillin. The isolates were identified and had their sensitivity profile performed by manual and automated methodology. The minimum inhibitory concentration for vancomycin, daptomycin, oxacillin, linezolid and teicoplanine was performed by e-test. The *mecA*, *vanA* genes, typing of the *SCCmec* elements, as well as the search for the *icaA*, *tst-1* and *pvl* virulence genes were performed by PCR. Biofilm formation was performed using the crystal violet technique. The Sequence Type (ST), as well as the Clonal Complex (CC) of the isolates was evaluated by the RTq-PCR. The clinical characteristics of the patients were evaluated through an active search in medical records. After researching the *mecA* gene, 27.1% (26/96) of the isolates were considered OS-MRSA, with *SCCmec* type I being the most prevalent, 46.1% (12/26). Among the evaluated isolates, 41% (9/22) were included in CC5 and ST9. As for virulence, all isolates were positive for the *icaA* gene and characterized as strong biofilm formers. The *pvl* gene was found in 92.3% (24/26) of the isolates and the toxic shock syndrome toxin was present in 61.5% of the isolates (16/26). All were negative for the presence of the *vanA* gene. As for the clinical outcome, 73% (19/26) of the patients were discharged from the

hospital and 27% (7/26) died. With our study, it was possible to observe a high frequency of OS-MRSA isolates causing bloodstream infections. Furthermore, such isolates contain several virulence genes, which may contribute to a worse clinical outcome.

Keywords: OS-MRSA; Sepsis; Virulence; Bacterial resistance; Staphylococcal Infection.

1. Introdução

Staphylococcus aureus é notadamente um patógeno de grande importância clínica, podendo ocasionar uma variedade de infecções, que se manifestam desde casos assintomáticos, infecções de tecidos superficiais, até infecções profundas, como osteoartrite, piomiosite, celulite, endocardite e bacteremia. Esta versatilidade pode ser explicada, em parte, pela adaptação em diferentes ambientes e a presença de um arsenal de fatores de virulência (Enger *et al.*, 2022).

Além disso, isolados de *S. aureus* estão, comumente, associados com resistência a múltiplos agentes antimicrobianos, o que justificou sua inserção no grupo ESKAPE (*Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa*, e *Enterobacter* spp.). Este microrganismo é reconhecido por sua capacidade de ocasionar processos infecciosos de difícil tratamento devido à grande variedade de mecanismos de resistência a diferentes classes de antimicrobianos (Mlynarczyk-Bonikowska *et al.*, 2022).

Em geral, *Methicillin resistant S. aureus* (MRSA) carregam o gene *mecA*, que expressa uma *Penicillin Binding Protein* (PBP) modificada, denominada PBP 2a, que apresenta baixa afinidade aos fármacos beta-lactâmicos, resultando em Concentração Inibitória Mínima (CIM) para oxacilina $\geq 4 \mu\text{g/mL}$. Contudo, o surgimento de isolados *oxacillin-susceptible mecA-positive Staphylococcus aureus* (OS-MRSA) trouxe novas dificuldades à interpretação clínica da resistência aos beta-lactâmicos, bem como das formas de tratamento para pacientes infectados por *S. aureus* (Liu *et al.*, 2020).

Isolados OS-MRSA geram dificuldade de identificação nos laboratórios clínicos, pois, são equivocadamente reportados como sensíveis à meticilina, por técnicas

fenotípicas de rotina. O emprego de técnicas moleculares, para detecção do gene *mecA*, ou a proteína MecA, são fundamentais para definição de OS-MRSA, entretanto essas ferramentas não estão disponíveis em grande parte dos laboratórios clínicos. Crucialmente, durante o tratamento clínico com fármacos beta-lactâmicos, OS-MRSA tendem a desenvolver resistência ao antimicrobiano, ocasionando falha na terapia guiada por cultura (Boonsiri *et al.*, 2020; Song *et al.*, 2017).

Relatos de isolados OS-MRSA têm surgido ao redor do mundo, porém, sua real epidemiologia ainda é incerta, bem como real mecanismo de resistência, virulência, expansão clonal e sua relação com o tratamento clínico de pacientes infectados por essas bactérias (Brahma *et al.*, 2019; Conceição *et al.*, 2015; Duarte *et al.*, 2018; Mistry *et al.*, 2016). Assim, o propósito desse estudo foi avaliar a prevalência de isolados OS-MRSA, provenientes de infecção de corrente sanguínea, coletados de pacientes internados em um hospital do sul do Brasil, bem como avaliar o tratamento empregado, além de comparar os dados de internação e características de pacientes infectados por isolados MSSA; MRSA e OS-MRSA.

2. Métodos

2.1 Seleção das amostras

Foram selecionados, para o levantamento epidemiológico e comparação entre grupos *Methicillin Susceptible Staphylococcus aureus* (MSSA), MRSA e OS-MRSA, 801 isolados, únicos, de *S. aureus* provenientes de hemocultura, coletados de pacientes internados em um hospital do sul do Brasil, no momento da identificação da infecção de corrente sanguínea, entre janeiro de 2011 e dezembro de 2020.

Previamente identificados como MSSA, pelos métodos de rotina, 96 isolados foram selecionados para o seguimento do estudo e pesquisa do gene *mecA*, que codifica resistência a metilicina.

2.2 Identificação dos isolados

A identificação dos isolados, bem como o teste de sensibilidade aos antimicrobianos, foi realizada, fenotipicamente, utilizando metodologia automatizada Phoenix[®] (BD Biosciences); Microscan[®] (Dade/Microscan) ou Vitek 2[®] (bioMérieux), dependendo do período de análise, seguindo as recomendações do fabricante. Após liberação do laudo da cultura, os isolados de interesse foram estocados em caldo *Tryptice Soya Broth* (TSB) acrescidos de 30% de glicerina e armazenados em freezer - 20°C.

No momento do estudo, 96 isolados MSSA foram reativados do estoque, tendo sua identificação confirmada por metodologia manual, de acordo com Jorgensen (2015) e teste de sensibilidade de acordo com o documento *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI -2021).

2.3 Comparação clínica

Para comparação dos dados clínicos 82 isolados, gerais, de *S. aureus* provenientes de hemocultura, coletados de pacientes com infecção de corrente sanguínea, entre jan. de 2011 e dez. de 2020, foram separados, por conveniência, em três grupos distintos: MSSA; MRSA e OS-MRSA para avaliação das características demográficas, clínicas e laboratoriais.

2.4 Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) aos antimicrobianos

Os valores de CIM para vancomicina; oxacilina; linezolida; teicoplanina e daptomicina foram determinados por metodologia *e-test*[®] (BioMérieux, Marcy l'Étoile, France), de acordo com as recomendações do fabricante.

2.5 Biofilme

O teste de formação de biofilme, por metodologia cristal violeta, foi realizado em microplacas de poliestireno contendo 96 poços de acordo com o descrito por Stepanovic e colaboradores (2007).

2.6 Testes moleculares

A extração de DNA dos 96 isolados MSSA foi realizada de acordo com o descrito por Sambrook e Fritsch (1990), com modificações.

A identidade dos isolados foi confirmada pela amplificação do gene *nuc* que codifica uma termonuclease (Brakstad; Aasbakk; Maeland, 1992). O gene *mecA* foi identificado de acordo com o descrito por Milheiriço, Oliveira e Lencastre (2007). A tipagem dos elementos *SCCmec*, bem como a detecção dos genes *icaA* (codifica *N*-acetilglucosaminiltransferase), *tst-1* (codifica toxina da síndrome do choque tóxico) e *lukF-PV* e *lukS-PV* (codifica Leucocidina de Panton Valentine) foram realizados de acordo com o descrito, respectivamente, por Boye e colaboradores (2007) e Campbell e colaboradores (2008).

A detecção dos genes *vanA* e *vanB*, que resultam em resistência aos glicopeptídeos, foi realizada de acordo com o descrito por Clark e colaboradores (1993). As análises dos *Clonal Complex* (CC) bem como dos *Sequence Typing* (ST) foram realizadas de acordo com o descrito por Lilliebridge e colaboradores (2011).

2.6 Análise de prontuário clínico

As informações clínicas dos pacientes foram coletadas pela busca ativa em prontuário clínico, fichas de notificação de infecção relacionada a assistência à saúde e dados presentes no sistema de informação LABHOS/ MEDVIEW®.

2.7 Análise estatística

A análise estatística foi realizada utilizando o programa IBM SPSS *Statitics* 20.0®. Foram realizados testes de homogeneidade de variância e para os dados com distribuição normal foram realizados testes *t-student* e ANOVA, com os dados sendo representados como média e desvio padrão. Para os dados não paramétricos foram utilizados testes de *Mann Whitney* e *Kruskal Wallis*, com os dados sendo expressos como mediana e intervalo interquartil. Ainda, para as variáveis qualitativas foram utilizados os testes *Qui-quadrado* e *Exato do Fisher*, quando necessário. Os dados foram considerados significativamente estatísticos quando o valor de p obtido foi $\leq 0,05$, intervalo de confiança de 95%.

O estudo foi aprovado pelo comitê de ética em pesquisa envolvendo seres humanos, da Universidade Estadual de Londrina (CEP/UUEL) em 22 de julho de 2021, e responde ao parecer: 4.796.146.

3. Resultados

Entre os 96 isolados provenientes de hemocultura, 26 (27%) foram positivos para amplificação do gene *mecA*, sendo caracterizados como OS-MRSA. Para comparação das características clínicas, 81/801 isolados, entre MSSA; MRSA e OS-MRSA, foram avaliados (Tabela 1.).

Tabela 1 - Avaliação comparativa de dados demográficos, laboratoriais e clínicos de isolados MSSA, MRSA e OS-MRSA (n=81).

Características Demográficas	(n)	MSSA (26)	freq. (%)	MRSA (29)	freq. (%)	OS-MRSA (26)	freq. (%)	p valor
Idade		37 (IQ: 41)	—	61 (IQ: 27)	—	54 (IQ:43)	—	0,009
Sexo	Fem. (31)	6	23,1	12	41,4	13	50	0,151
Dados Laboratoriais	(n)	MSSA (26)	freq. (%)	MRSA (29)	freq. (%)	OS-MRSA (26)	freq. (%)	p valor
CIM Vancomicina		0 (IQ: 1,6)	—	2,0 (IQ: 0,8)	—	1,5 (IQ: 1,0)	—	0,008
PCR		150,55 (IQ:204)	—	196,4 (IQ: 138,5)	—	101 (IQ: 226,6)	—	0,750
Leucócitos Totais		11.240 (IQ: 10.465)	—	12.530 (IQ: 9.720)	—	9.820 (IQ: 7.630)	—	0,346
Plaquetas		190.000 (IQ: 183.750)	—	254.000 (IQ: 90.000)	—	211.000 (IQ: 186.000)	—	0,204
Dados Internação	(n)	MSSA (26)	freq. (%)	MRSA (29)	freq. (%)	OS-MRSA (26)	freq. (%)	p valor
Dias Internação		20 (IQ: 20)	—	28 (IQ: 23)	—	11 (IQ: 19)	—	0,004
Desfecho	Óbito (27)	6	22,2	10	37,1	11	40,8	0,578
Óbito em 30 dias	(19)	6	31,6	3	15,8	10	52,6	0,059
Óbito relacionado	(26)	6	23,1	9	34,6	11	42,3	0,109
Tipo de Infecção	Hosp. (62)	22	35,5	24	38,7	16	25,8	0,064
UTI prévia	(18)	5	27,8	11	61,1	2	11,1	0,075

Legenda: MSSA - *Methicillin Sensible Staphylococcus aureus*; MRSA - *Methicillin Resistant S. aureus*; OS-MRSA - *Oxacillin-Sensible Methicillin Resistance S. aureus*; freq. – Frequência; IQ – Intervalo Inter-Quartil; Fem- Feminino; CIM Vancomicina – Concentração Inibitória Mínima Vancomicina; Hosp. – Relacionado com Hospital; PCR – Proteína – C - Reativa.

Como avaliado na tabela 1, há diferença estatística entre os grupos quanto as variáveis: idade, sendo o grupo com maior idade o OS-MRSA com mediana de 54 anos (IQ:43); dias de internação, com o grupo MRSA apresentando número superior de dias sob cuidados hospitalares, com mediana de 28 dias (IQ: 23), em relação aos demais grupos, e CIM para vancomicina, com a maior valor de mediana no grupo MRSA, apresentando o valor de 2,0 µg/mL para vancomicina (IQ: 0,8).

Tabela 2 - Distribuição entre comorbidades, uso de dispositivos invasivos e tratamento, entre 81 pacientes, alocados em três grupos: MSSA; MRSA e OS-MRSA.

Comorbidades	(n)	MSSA (26)	freq. (%)	MRSA (29)	freq. (%)	OS-MRSA (26)	freq. (%)	p valor
Pulmonar	(11)	2	18,2	6	54,5	3	27,3	0,171
Cardiovascular	(22)	8	36,4	6	27,2	8	36,4	0,177
Renal	(11)	5	45,5	2	18,2	4	36,3	0,093
Neurológico	(16)	3	18,7	9	56,3	4	25	0,104
Neoplasia	(8)	2	25	2	25	4	50	0,175
HIV	(1)	1	100	0	—	0	—	0,054

Dispositivos Invasivos	(n)	MSSA (26)	freq. (%)	MRSA (29)	freq. (%)	OS-MRSA (26)	freq. (%)	p valor
Cateter Venoso Central	(33)	10	30,3	11	33,3	12	36,4	0,264
Sonda Vesical de Demora	(31)	6	19,3	14	45,2	11	35,5	0,137
Tubo Orotraqueal	(29)	5	17,2	15	51,7	9	31,1	0,07
Cirurgia prévia	(13)	5	38,5	3	23	5	38,5	0,267

Tratamento	(n)	MSSA (26)	freq. (%)	MRSA (29)	freq. (%)	OS-MRSA (26)	freq. (%)	p valor
Oxacilina	(13)	4	30,8	2	15,4	7	53,8	0,022
Vancomicina	(n8)	6	33,3	8	44,5	4	22,2	0,111
Linezolida	(6)	1	16,7	4	66,6	1	16,7	0,12
Teicoplanina	(5)	1	20	0	—	4	80	0,012
Daptomicina	(1)	0	—	0	—	1	100	0,058
Piperacilina + Tazobactam	(11)	3	27,3	7	63,6	1	9,1	0,087
Sulfametoxazol + Trimetopima	(4)	1	25	1	25	2	50	0,717

Legenda: MSSA - *Methicillin Sensible Staphylococcus aureus*; MRSA - *Methicillin Resistant S. aureus*; OS-MRSA - *Oxacillin-Sensible Methicillin Resistance S. aureus*; freq. – frequência; HIV - *Human Immunodeficiency Virus*.

Em relação as comorbidades, não houve diferença estatística entre os grupos, com tendência para a varável HIV, onde apenas 1 paciente, incluso no grupo MSSA, foi diagnosticado com o vírus. Quanto ao tratamento, houve diferença estatística entre os grupos para os fármacos oxacilina, teicoplanina e daptomicina. Vale observar que o grupo OS-MRSA foi que mais recebeu esses fármacos. Quanto aos dispositivos

invasivos não foi observado diferença estatística entre os grupos. Tais fatos comprovam a homogeneidade entre grupos analisados.

Partindo de 96 isolados MSSA, coletados de hemoculturas de pacientes com diagnóstico infecção de corrente sanguínea, após confirmação fenotípica da sensibilidade e pesquisa molecular do gene *mecA*, foi possível estimar que a frequência de isolados OS-MRSA foi de 27% (26/96). A tabela 3. traz os resultados da avaliação molecular para os 26 isolados identificados como OS-MRSA, relacionando as características genéticas quanto ao desfecho do processo infeccioso (alta/ óbito).

Tabela 3 - Características moleculares e concentração inibitória mínima de 26 isolados identificados como OS-MRSA quanto ao desfecho clínico.

	Resultado	Alta (19)	Freq. (%)	Óbito (7)	Freq. (%)	p valor
<i>vanA</i>	Pos	0	0,00	0	0,00	0,014
	Neg	19	100,00	7	100,00	
<i>mecA</i>	Pos	19	100,00	7	100,00	0,014
	Neg	0	0,00	0	0,00	
<i>nuc</i>	Pos	19	100,00	7	100,00	0,014
	Neg	0	0,00	0	0,00	
<i>icaA</i>	Pos	19	100,00	7	100,00	0,014
	Neg	0	0,00	0	0,00	
<i>pvl</i>	Pos	17	89,47	7	100,00	0,043
	Neg	2	10,53	0	0,00	
<i>tst-1</i>	Pos	11	57,89	5	71,43	0,062
	Neg	8	42,11	2	28,57	
Biofilme	Forte Formador	19	100,00	7	100,00	0,014
	Fraco Formador	0	0,00	0	0,00	
SCC <i>mec</i>	tipo I	10	52,63	2	28,57	0,172
	tipo II	0	0,00	1	14,29	
	tipo IV	5	26,32	1	14,29	
	Não Tipável	5	26,32	2	28,57	

Legenda: Pos – Positivo; Neg – Negativo; Freq. – frequência; *vanA* – gene promotor de resistência aos glicopeptídeos; *mecA* - gene promotor de resistência aos beta-lactâmicos; *NUC*- gene para confirmação da espécie *S. aureus*; *icaA* – gene que codifica expressão do biofilme; *pvl* – gene codificador da leucocidina de panton valentine; *tst-1* – gene codificador da toxina da síndrome do choque tóxico; SCC*mec* – *Staphylococcal Chromosomal Cassette mec*.

A tabela 4. mostra a variação de CIM para os principais antimicrobianos na comparação dos grupos.

Tabela 4 – Características da CIM de 26 isolados OS-MRSA quanto ao desfecho clínico: óbito.

	Antimicrobiano	Alta (19)	IQ	Óbito (7)	IQ	p valor
MIC µg/mL	Vancomicina	1,5	0,9	1,75	1,6	0,298
	Teicoplanina	1	0,75	1,25	1,75	0,305
	Daptomicina	0,6	0,3	0,6	0,6	0,744
	Linezolida	2	0,75	2,25	1,69	0,999
	Oxacilina	0,25	0,18	0,25	0,18	0,299

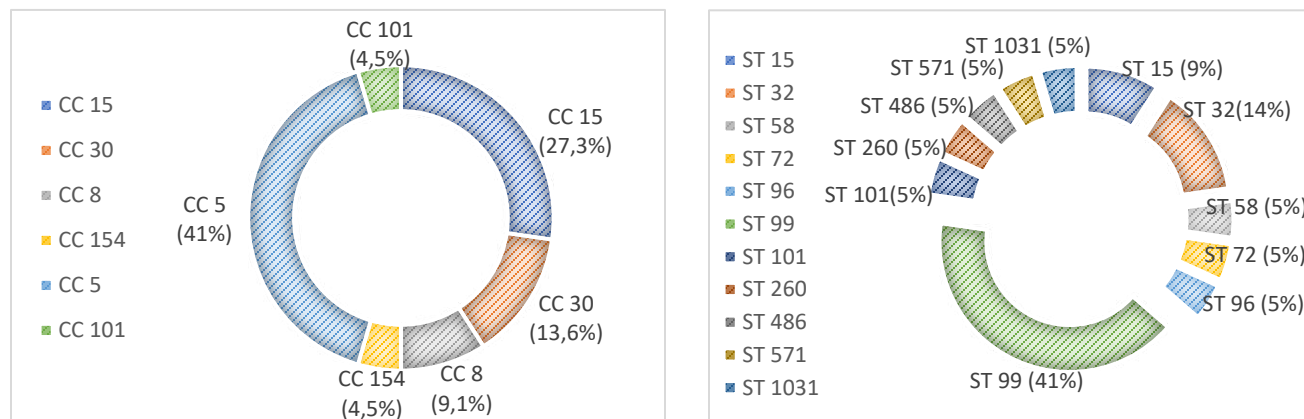
Legenda: MIC- *Minimum Inhibitory Concentration*; IQ – Intervalo Inter-Quartil.

Quanto as características dos pacientes OS-MRSA, é possível avaliar que as únicas variáveis que não apresentaram diferença estatística foram a presença do gene *tst-1* e a tipagem dos elementos *SCCmec*.

Em relação aos *Sequence Type*, 22 isolados OS-MRSA foram divididos em 11 diferentes tipos de ST, sendo o mais prevalente o ST 99 (9/22).

Entre os Complexos Clonais o mais prevalente foi o CC5, presente em 41% dos isolados (9/22), seguido pelo CC 15 com 27,3% (6/22), CC 30 com 13,6% (3/22). CC 8 com 9,1% (2/22) e CC's 154 e 101 com 4,5 % cada (1/22). Já entre os *Sequence Type* temos como mais prevalente o ST 99 com 41% dos isolados (9/22), seguido pelo ST32 com 14% (3/22), ST 15 com 9% (2/22). Os ST's 58, 72, 101, 260, 486, 571 e 1031 foram identificados em um isolado cada (5% - 1/22), Figura 1.

Figura 1 - Distribuição dos *Clonal Complex* e *Sequence Typing* presente em 22 isolados OS-MRSA



Legenda: CC – Complexo Clonal; ST – Sequence Type.

4. Discussão

Entre os 96 isolados de *S. aureus*, provenientes de infecção de corrente sanguínea, previamente classificados como MSSA, no período de 10 anos, 27% (26/96) continham o gene *mecA*, sendo assim identificados como OS-MRSA. Em estudo realizado por Liu e colaboradores (2021), com isolados coletados de pacientes internados em 10 hospitais da China a prevalência de OS-MRSA relatada foi de 4,5% (17/377). Já Balbino; Figueiredo (2016), em estudo realizado com 89 isolados provenientes de amostras clínicas, em Recife -PB- Brasil, descreverem que desses 58 isolados foram caracterizados como MSSA e 30 (52%) foram positivos para o gene *mecA* (OS-MRSA). Ainda, de acordo com uma revisão de literatura, publicada por Pournaras e colaboradores (2015) a prevalência de isolados OS-MRSA, ao redor do mundo, variou entre 3% e 47,6%.

Diante deste cenário, é necessário que tenhamos técnicas eficazes para identificar OS-MRSA e que se conheça, de fato, o mecanismo de resistência dessa bactéria. O documento *Clinical and Laboratory Standard Institute* (CLSI – 2021) recomenda que a cefoxitina, por ser forte indutor de resistência, seja utilizada, in vitro, para detecção de isolados MRSA. Contudo, isolados OS-MRSA induzem a uma identificação clínica errônea, uma vez que são identificados como sensíveis a meticilina, quando testes de

produção de PBP2a ou a detecção do gene *mecA* não é feita rotineiramente (Liang *et al.*, 2021).

Até o momento, o mecanismo envolvido na emergência de isolados OS-MRSA, não foi totalmente elucidado. Contudo, há a sugestão de que mutações em regiões promotoras do gene *mecA*, bem como os genes *gryA/ grlA* e do complexo FemXAB, que estão relacionados a produção da parede celular bacteriana e ligados a resistência *borderline* estejam presentes nos isolados OS-MRSA, assim como genes relacionados a RNA polimerase (*rpoBC*), glicólise e síntese de tRNA (*pykA* e *lysS*). Outro ponto de estudo, seria mutações nas sequências regulatórias e indutoras dos genes *bla* e *mecA*, que, surpreendentemente, não foram encontradas nos estudos sobre o tema (Boonsiri *et al.*, 2020; Giannouli *et al.*, 2010; Pournaras *et al.*, 2015; Pu *et al.*, 2014).

Outro ponto de interesse, para avaliação epidemiológica dos isolados, é a classificação dos elementos SCC*mec*, ST e CC. Desde seu primeiro registro, no início dos anos 2000, com os SCC*mec* tipo I; II e III, os elementos SCC*mec* vêm sendo utilizados para demonstrar a epidemiologia molecular de *S. aureus*. Tais elementos podem ser classificados de acordo com seus tipos e subtipos, pela análise molecular de seus constituintes, gene *mec*, complexo *ccr*, necessários para incorporação de novos elementos no cassete, e regiões J, que apresentam genes não essenciais ao cassete, como genes de resistência e virulência. As combinações de tais elementos, entre outros genes presentes no cassete, dão origem aos 14 diferentes tipos de SCC*mec* descritos atualmente (Uehara, 2022).

Isolados MRSA que carregam SCC*mec* tipo I; II e III, normalmente, estão associados as infecções adquiridas no ambiente hospitalar, sendo classificados como *healthcare-associated* – MRSA (HA-MRSA). Já aqueles isolados que carregam os elementos IV e V estão mais associados aos processos infecciosos oriundos da comunidade, sendo classificados como *community-associated* – MRSA (CA-MRSA). Isolados HA-MRSA tendem a apresentar resistência a várias classes de antimicrobianos, como beta-lactâmicos, quinolonas, aminoglicosídeos e macrolídeos. Por outro lado, isolados CA-MRSA, geralmente, são sensíveis a vários agentes antimicrobianos e

tendem a apresentar vários genes de virulência, como é o caso da toxina esfoliativa PVL (Harada *et al.*, 2018; Nakano *et al.*, 2022).

Dados parecidos com os descritos em literatura foram encontrados nesse trabalho, pois, entre os isolados OS-MRSA, 17/26 (65,4%) foram considerados de infecções relacionadas ao ambiente hospitalar e, desses, 10/26 (38,5%) apresentaram SCCmec tipo I ou II. Entretanto, 9/26 (34,6%) isolados foram considerados originários de infecções comunitárias, contudo, apenas 2/26 (7,7%) apresentaram o SCCmec tipo 4, com 3/26 (11,5%) isolados carregando o SCCmec tipo I. Tal dado demonstra a divergência epidemiológica dos isolados e a sua capacidade de tramitar entre os ambientes hospitalar e comunitário.

Para facilitar a avaliação epidemiológica e evolução clonal de *S. aureus*, nos anos 2000 foi publicada a técnica conhecida como *Multilocus Sequence Typing* (MLST). Dessa forma, através da amplificação de sete genes *housekeeping* seria possível identificar bactérias cujos ST estivessem relacionados. Assim, isolados que exibem a mesma sequência de nucleotídeos para cada um dos genes estariam alocados num mesmo ST, já aqueles isolados que apresentam variação de um único ou dois nucleotídeos (*single - double polymorphism variant/* SNP - DNP), estariam alocados em um mesmo CC. Os primeiros CC's relatados foram: CC8, relacionado ao clone MRSA arcaico, CC5, cujos complexo abriga a maioria dos isolados *Vancomycin Intermediate S. aureus* (VISA) e os complexos CC 22, 30 e 45 cujos clones originários foram o UK EMRSA-15, UK EMRSA-16 e MRSA epidêmico de Berlim, respectivamente (Lakhundi; Zhang, 2018; Robinson; Enright, 2004).

De acordo com revisão realizada por Lakhundi e Zhang (2018) isolados MRSA, desde seu primeiro relato em 1959, têm se espalhado ao redor do mundo e produzido clones diferentes. Entre esses, os mais frequentes podem ser alocados nos CC5, CC8, CC22, CC30 e CC45. Contudo, a epidemiologia global mostra que os clones mais relatados são os pertencentes ao CC5 e CC8, com apenas mutações pontuais diferindo entre os dois. Indo de encontro com essa revisão, 40,9% (9/22) dos isolados descritos neste estudo pertencem ao CC5, 13,6% (3/22) pertencem ao CC30 e 9,1% (2/22) estão alocados no CC8.

No presente trabalho analisamos a presença de genes de virulência na caracterização dos isolados OS-MRSA. Tais fatores, como a produção de toxinas, biofilme e adesinas, auxiliam os microrganismos a evadir dos mecanismos de defesa do hospedeiro, bem como, a ação dos agentes quimioterápicos, resultando em maior efetividade para ocasionar doenças invasivas, como é o caso da sepse (Pimentel *et al.*, 2021).

A produção da *Leucocidina de Pantón Valentine* (PVL) ocorre pela expressão de dois genes, *lukF/lukS -PV*, que conduzem a produção de duas unidades proteicas, responsáveis pela formação de uma proteína formadora de poros na superfície dos leucócitos polimorfonucleares (Chenouf *et al.*, 2021). A formação da PVL é de extrema importância nas afecções invasivas, conferindo maior toxicidade aos isolados e agravando, ainda mais, o quadro infeccioso. Historicamente, isolados CA-MRSA apresentam com maior frequência esses genes (Bai *et al.*, 2021; Otto, 2013; Tsouklidis *et al.*, 2020).

Contudo, de acordo com dados publicados por Zhao e colaboradores (2022), não podemos avaliar tal evidência de forma incisiva. Em seu estudo, 40,9% dos isolados pesquisados que continham o gene PVL foram classificados como isolados HA-MRSA. Zhao e colaboradores (2022), em estudo com isolados provenientes de pacientes hospitalizados no sudeste da China, demonstrou que 35,7% de seus isolados HA-MRSA continham os genes que codificam PVL. Neste estudo, 92% (24/26) dos isolados, classificados como OS-MRSA, continham os genes *lukF/lukS - PVL* desses, 62,5% (15/24) foram relacionados com microrganismos provenientes do ambiente hospitalar e 37,5% (9/24) da comunidade.

A produção da Toxina da Síndrome do Choque tóxico é outra fonte de virulência, presente em *S. aureus*, que possui papel fundamental na fisiopatologia do processo infeccioso. Pela expressão de *tst-1* os isolados são capazes de produzir um “superantígeno” que promove aumento na proliferação de células T e exacerba o processo inflamatório. Em geral, a presença desse gene está associado aos isolados pertencentes aos clones CC5, 22 e 30 (Laceb *et al.*, 2022).

A síndrome do choque tóxico produz grave risco a saúde do paciente, sendo necessário um rápido e assertivo diagnóstico. Segundo publicação do *Center for Diseases Control* (CDC) o diagnóstico dos pacientes com a síndrome pode ser feito através de sinais clínicos, como febre, *rash*, descamação epitelial, hipotensão e desordem sistêmica gastrointestinal ou elevação das enzimas hepáticas (SUZUKI et al., 2022). Infecções ocasionadas por *S. aureus* produtores de *tst-1* podem ser potencialmente fatais, além de gerar grande morbi-mortalidade nos pacientes (Danelli et al., 2020).

A epidemiologia de isolados *S. aureus tst-1* positivos é variável. Em estudo realizado por Wang e Zhang (2022), com isolados provenientes de materiais clínicos diversos, coletados de pacientes internados em um hospital chinês, encontrou 2,7% de isolados carregando o gene. Já em estudo conduzido por Da Silva e colaboradores (2022), com isolados provenientes de amostras clínicas, coletadas de pacientes internados em um hospital terciário, mostrou que 57,1% de seus isolados eram *tst-1* positivos. No presente estudo, 61,5% (16/26) dos isolados foram caracterizados, geneticamente, como positivos para o gene.

A formação de biofilme é outra forma de os isolados escaparem dos mecanismos de defesa, bem como, adquirir genes que conduzem à resistência ou virulência. Estima-se que 80% das infecções em humanos são relacionadas a capacidade do microrganismo formar biofilme (Penesyan; Gillings; Paulsen, 2015). *S. aureus* são conhecidos por sua elevada capacidade de formar biofilme, seja em superfícies bióticas ou abióticas. Nesses isolados, a produção do biofilme ocorre pelo reconhecimento de proteínas de adesão celular, como a *fibrinogen-binding proteins* (FnBPs), *fibrinogen-binding clumping factors* (Clfs), *elastin-binding protein* (EbpS) e a produção uma adesina intracelular polissacarídica (*polysaccharide intercellular adhesin* – PIA), sintetizada pela expressão do operon *icaA*. Neste estudo, todos dos isolados foram positivos para o gene *icaA*, bem como, foram capazes de formar biofilme em superfície de poliestireno (Silva et al., 2021; Xinlong et al., 2022).

Conhecer a epidemiologia, bem como os fatores de virulência e resistência, apresentados por *S. aureus* são ferramentas muito importantes na rápida detecção e

enfrentamento de moléstias ocasionadas pelo patógeno. Tal fato se torna ainda mais importante quando se trata de bacteremia, pois *S. aureus* são frequentemente associados as infecções de corrente sanguínea, sejam adquiridas na comunidade ou no ambiente hospitalar, com uma incidência de 20 á 30 casos a cada 100 mil habitantes e uma mortalidade associada, em 90 dias, próximo de 30% (Vaart *et al.*, 2022).

Para que haja sucesso na terapia, é necessário que o diagnóstico e tratamento de pacientes com sepse seja o mais rápido e acertado possível. A vancomicina têm sido muito utilizada como primeira escolha no tratamento empírico de pacientes com bacteremia por MRSA, contudo em 30% dos casos, o emprego deste antimicrobiano não têm se mostrado efetivo (Zasowski *et al.*, 2022).

Ainda, guidelines, e programas como *stewardship* sustentam a teoria de que, com resultados de cultura, o tratamento de pacientes com bacteremia deve ser reavaliado, escalonando o tratamento, utilizando antimicrobianos de maior espectro, ou de-escalando, administrando fármacos de menor espectro de ação, com o fim de evitar pressão seletiva e fenômenos de resistência bacteriana aos antimicrobianos (Id *et al.*, 2022).

Tal recomendação se torna perigosa quando estamos frente a microrganismos que se mostram sensíveis nos testes in vitro, fenotípicos, como é o caso dos OS-MRSA, que contém o gene de resistência aos fármacos beta-lactâmicos e o expressa ao longo da terapia, ocasionando falha terapêutica ao de-escalonar a terapia empírica empregada, de vancomicina para oxacilina, conduzindo o paciente a um pior prognóstico (Liu *et al.*, 2021).

Em revisão publicada por Rose e colaboradores (2022) o uso de daptomicina e ceftaroline foi comparado com a vancomicina no tratamento de pacientes com infecções invasivas. Dos 942 pacientes avaliados, quando tratados apenas com ceftarolina ou daptomicina, a mortalidade em 30 dias foi de 14,5% contra 10,7% respectivamente. Já para aqueles pacientes que trataram com vancomicina e aqueles que tiveram sua terapia alterada para daptomicina no terceiro dia a mortalidade ficou em 17,4% e 8,3%. Quando avaliados os pacientes que trataram apenas com vancomicina, ou daptomicina, o índice

de mortalidade em 30 dias foi consideravelmente menor no grupo que tratou apenas com daptomicina, em relação à vancomicina (0,9%/ 10,9%) (Rose *et al.*, 2022).

Resultado parecido foi encontrado em estudo conduzido por Schweizer e colaboradores (2022) com 124 pacientes diagnosticados com bacteremia estafilocócica, internados no hospital dos veteranos, entre 2007 e 2014. Segundo o autor, após análises multivariáveis, a mudança de terapia de vancomicina para daptomicina, no terceiro dia pós uso de vancomicina foi significativamente associada com redução na mortalidade em 30 dias dos pacientes estudados. Ainda, segundo os autores, tal evidência não foi visualizada na modificação de terapia após três dias de tratamento inicial com vancomicina.

Nichols e colaboradores (2021) avaliaram 286 pacientes hospitalizados com bacteremia estafilocócica entre 2011 e 2019. Nesse estudo os autores avaliaram a eficiência de monoterapia com daptomicina, vancomicina ou ceftarolina versus a combinação de daptomicina e ceftarolina. Interessantemente, não houve diferença estatística de mortalidade ou readmissão entre os pacientes tratados com monoterapia ou aqueles que utilizaram apenas um dos antimicrobianos propostos (Nichols *et al.*, 2021).

Um número maior de amostras seria necessário para avaliarmos, de fato, a melhor forma de terapia, bem como, aos desfechos relacionados ao tratamento empregado. Ainda, quanto a daptomicina, apenas um paciente fez uso do fármaco em nosso período de estudo, o que não colabora para avaliação dos dados quanto ao antimicrobiano.

5. Conclusão

Portanto, com esse estudo foi possível observar elevada frequência de isolados OS-MRSA (27%). Esses isolados continham o elemento SCCmec tipo I como o mais prevalente 42% (11/26) e estão alocados, principalmente, no CC 5 e ST 99. Quanto ao desfecho clínico, comparando-se os três grupos, MSSA; MRSA e OS-MRSA, é possível observar que o grupo OS-MRSA exibe os maiores percentuais de desfecho óbito 42,3% (11/26); óbito em 30-dias 47,6% (10/21) e óbito relacionado ao processo infeccioso

52,3% (11/21) em comparação aos outros grupos, o que evidencia a importância de se conhecer a epidemiologia de isolados OS-MRSA. Não há dados na literatura que compare as características de pacientes com isolados OS-MRSA, MSSA e MRSA, assim, somos pioneiros em tal caracterização.

Considerações.

Conhecer as características e a epidemiologia dos isolados OS-MRSA, bem como as formas de tratamento é fundamental para que haja sucesso na terapia dos pacientes com bacteremia estafilocócica. A dispersão genética desses isolados, bem como as formas ideais de tratamento dos pacientes são variáveis a serem exploradas, um consenso ainda não foi descrito na literatura. Com este estudo foi possível avaliar a epidemiologia dos isolados OS-MRSA em um hospital universitário do sul do Brasil, bem como correlacionar dados clínicos de pacientes infectados com esses isolados com aqueles infectados por isolados MSSA e MRSA. Embora mais estudos sejam necessários para entender de fato a terapia que deva ser empregada e qual o real impacto no prognóstico dos pacientes, foi possível observar que pacientes infectados com isolados OS-MRSA apresentaram maiores índices de mortalidade em 30 dias e maior percentual de mortalidade relacionada ao processo infeccioso em comparação com pacientes infectados por MSSA e MRSA.

Referências

BAI, Z. et al. Identification of Methicillin-Resistant Staphylococcus Aureus From Methicillin-Sensitive Staphylococcus Aureus and Molecular Characterization in Quanzhou, China. **Frontiers in Cell and Developmental Biology**, v. 9, n. January, p. 1–12, 2021.

BOONSIRI, T. et al. Identification and characterization of mutations responsible for the β - lactam resistance in oxacillin - susceptible mecA - positive Staphylococcus aureus. **Scientific Reports**, n. 0123456789, p. 1–22, 2020a.

BOONSIRI, T. et al. Identification and characterization of mutations responsible for the β -lactam resistance in oxacillin-susceptible mecA-positive Staphylococcus aureus. **Scientific Reports**, v. 10, n. 1, p. 1–22, 2020b.

BRAHMA, U. et al. Decreased expression of femXAB genes and fnbp mediated biofilm pathways in OS-MRSA clinical isolates. **Scientific Reports**, p. 1–8, 2019.

BRAKSTAD, O. D. D. G.; AASBAKK, K.; MAELAND, J. A. Detection of Staphylococcus

aureus by Polymerase Chain Reaction Amplification of the nuc Gene. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 30, n. 7, p. 1654–1660, 1992.

CHENOUF, N. S. et al. Detection of methicillin-resistant coagulase-negative staphylococci and PVL / mecA genes in ceftazidime-susceptible *Staphylococcus aureus* (t044 / ST80) from unpasteurized milk sold in stores in Djelfa , Algeria. **Journal of Dairy Science**, v. 10, p. 2684–2692, 2021.

CONCEIÇÃO, T. et al. Frequent occurrence of oxacillin-susceptible mecA -positive *Staphylococcus aureus* (OS-MRSA) strains in two African countries: Table 1. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 70, n. 12, p. dkv261, 27 ago. 2015.

DANELLI, T. et al. Nasal carriage by *Staphylococcus aureus* among healthcare workers and students attending a university hospital in Southern Brazil: Prevalence, phenotypic, and molecular characteristics. **Interdisciplinary Perspectives on Infectious Diseases**, v. 2020, 2020.

DUARTE, F. C. ET AL. Fatal sepsis caused by mecA -positive oxacillin-susceptible *Staphylococcus aureus* : First report in a tertiary hospital of southern. **Journal of Infection and Chemotherapy**, 2018.

ENGER, H. et al. A tale of two STs: molecular and clinical epidemiology of MRSA t304 in Norway 2008–2016. **European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases**, v. 41, n. 2, p. 209–218, 2022.

GIANNOULI, S. et al. Detection of mutations in the FemXAB protein family in oxacillin-susceptible mecA-positive *Staphylococcus aureus* clinical isolates. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 65, n. February, p. 626–633, 2010.

HARADA, D. et al. Change in genotype of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) affects the antibiogram of hospital-acquired MRSA *. **Journal of Infection and Chemotherapy**, p. 1–7, 2018.

ID, R. Y. et al. Prospective audit and feedback implementation by a multidisciplinary antimicrobial stewardship team shortens the time to de-escalation of anti-MRSA agents. **PLOS ONE**, p. 1–14, 2022.

J. SAMBROOK, E. F. FRITSCH, AND T. M. 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.

LACEB, Z. M. et al. Genetic Diversity and Virulence Profile of Methicillin and Inducible Clindamycin-Resistant *Staphylococcus aureus* Isolates in Western Algeria. **Antibiotics**, v. 11, n. 7, 2022.

LAKHUNDI, S.; ZHANG, K. Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*: Molecular Characterization, Evolution, and Epidemiology Sahreena. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 31, n. 4, p. 1–103, 2018.

LIANG, B. et al. Active Surveillance , Drug Resistance , and Genotypic Profiling of *Staphylococcus aureus* Among School-Age Children in China. **frontiers in Medicine**, v. 8, n. August, p. 1–8, 2021.

LIU, R. et al. Clonal Diversity , Low-Level and Heterogeneous Oxacillin Resistance of Oxacillin Sensitive MRSA. p. 661–669, 2021.

LIU, J. et al. Current status of oxacillin-susceptible mecA - positive *Staphylococcus aureus* infection in Shanghai , China : A multicenter study. **Journal of Microbiology, Immunology and Infection**, n. xxxx, 2020.

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.

MISTRY, H. et al. Prevalence and Characterization of Oxacillin Susceptible mecA - Positive Clinical Isolates of *Staphylococcus aureus* Causing Bovine Mastitis in India. **PLOS ONE**, p. 1–10, 2016.

MLYNARCZYK-BONIKOWSKA, B. et al. Molecular Mechanisms of Drug Resistance in *Staphylococcus aureus*. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 23, n. 15, 2022.

NAKANO, Y. et al. Journal of Global Antimicrobial Resistance Clinical characteristics and factors related to infection with SCC mec type II and IV Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in a Japanese secondary care facility : a single-center retrospective study. **Journal of Global Antimicrobial Resistance**, v. 31, p. 355–362, 2022.

NICHOLS, C. N. et al. Clinical Outcomes With Definitive Treatment of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Bacteremia With Retained Daptomycin and Ceftaroline Combination Therapy vs De-escalation to Monotherapy With Vancomycin , Daptomycin , or Ceftaroline. **Open Forum Infectious Diseases**, p. 1–8, 2021.

OTTO, M. Usability Cases in Education: Experiences, Challenges and Lessons Learned. **Association for Educational Communications and Technology 2009 Convention**, v. 303, n. 0, p. 324–330, 2013.

PENESYAN, A.; GILLINGS, M.; PAULSEN, I. T. Antibiotic discovery: Combatting bacterial resistance in cells and in biofilm communities. **Molecules**, v. 20, n. 4, p. 5286–5298, 2015.

PIMENTEL, F. et al. Journal of Global Antimicrobial Resistance *Staphylococcus aureus* clones causing osteomyelitis : a literature review. **Journal of Global Antimicrobial Resistance**, v. 26, p. 29–36, 2021.

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**, v. 21, n. 16, p. 2048–2053, 27 abr. 2015.

PU, W. et al. High Incidence of Oxacillin-Susceptible mecA-Positive *Staphylococcus aureus* (OS-MRSA) Associated with Bovine Mastitis in China. **PLoS ONE**, v. 9, n. 2, p. e88134, 11 fev. 2014.

ROBINSON, D. A.; ENRIGHT, M. C. Multilocus sequence typing and the evolution of

methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 10, n. 2, p. 92–97, 2004.

ROSE, W. et al. Approaching 65 Years : Is It Time to Consider Retirement of Vancomycin for Treating Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Endovascular Infections ? **Open Forum Infectious Diseases**, p. 1–6, 2022.

SILVA, V. et al. Biofilm formation of multidrug-resistant mrsa strains isolated from different types of human infections. **Pathogens**, v. 10, n. 8, 2021.

SONG, Y. et al. Characterisation of clinical isolates of oxacillin-susceptible mecA-positive *Staphylococcus aureus* in China from 2009 to 2014. **Journal of Global Antimicrobial Resistance**, v. 11, p. 1–3, 2017.

STEPANOVIC´, S. et al. Quantification of biofilm in microtiter plates : overview of testing conditions and practical recommendations for assessment of biofilm production by staphylococci. **APMIS**, p. 891–899, 2007.

SUZUKI, T. et al. Acute heart failure associated with toxic shock syndrome due to methicillin-susceptible *Staphylococcus aureus* during the postpartum period: case report and systematic literature review. **BMC Cardiovascular Disorders**, v. 22, n. 1, p. 1–17, 2022.

TSOUKLIDIS, N. et al. Understanding the Fight Against Resistance: Hospital-Acquired Methicillin-Resistant *Staphylococcus Aureus* vs. Community-Acquired Methicillin-Resistant *Staphylococcus Aureus*. **Cureus**, v. 12, n. 6, p. 1–10, 2020.

UEHARA, Y. Current Status of Staphylococcal Cassette Chromosome mec (SCCmec). **Antibiotics**, p. 1–12, 2022.

VAART, T. W. VAN DER et al. All-Cause and Infection-Related Mortality in *Staphylococcus aureus* Bacteremia , a Multicenter Prospective Cohort Study. **Open Forum Infectious Diseases**, v. 9, n. 12, p. 1–9, 2022.

XINLONG H., et al. Global Downregulation of Penicillin Resistance and Biofilm Formation by MRSA Is Associated with the Interaction between Kaempferol Rhamnosides and Quercetin. **Microbiology Spectrum**, v. 10, n. 6, p. 1–15, 2022.

ZASOWSKI, E. J. et al. Multicenter Cohort Study of Ceftaroline Versus Daptomycin for Treatment of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Bloodstream Infection. **Open Forum Infectious Diseases**, 2022.

6.2 Trabalho 2.

Aspectos clínicos da infecção de corrente sanguínea por *S. aureus* – *mecA* positivo – oxacilina sensível, com resistência intermediária a vancomicina: Relato de Casos.

Resumo

Staphylococcus aureus podem colonizar pessoas saudáveis ou desencadear infecções cujo espectro de apresentação varia de superficial leve a sistêmica grave. O surgimento de isolados *Oxacillin Sensible -Methicillin Resistant S. aureus* (OS-MRSA) têm imposto dificuldades no tratamento de pacientes com infecção ocasionada por *S. aureus*, principalmente naquelas consideradas graves, como é o caso das infecções de corrente sanguínea. Assim, esse estudo tem como objetivo relatar dois casos de infecção de corrente sanguínea, fatais, ocasionadas por isolados OS-MRSA. Os isolados, derivados de hemocultura, vieram de pacientes com infecção de corrente sanguínea, internados em um hospital do sul do Brasil no ano de 2015. Os isolados foram caracterizados fenotipicamente utilizando metodologia automatizada. A identificação genotípica dos isolados foi realizada através da amplificação do gene *nuc*. O gene *mecA* foi utilizado para caracterizar a resistência a oxacilina. O método *Modified Population Analysis Profile* (PAP) foi utilizado para caracterizar os isolados como hetero- *Vancomycin Intermediate S. aureus* (h-VISA). A Concentração Inibitória Mínima (CIM) foi determinada por metodologia *e-test* e os dados clínicos dos pacientes foram avaliados através da busca ativa de informações em prontuário clínico. Os isolados foram positivos para o gene *mecA*, considerados hVISA pelo PAP e apresentaram CIM para vancomicina entre 1,5 e 3,0 µg/ml e para oxacilina entre 0,125 e 0,5 µg/ml. Quanto a clínica, houve de-escalamento na terapia dos pacientes, após resultado de cultura e ambos evoluíram para óbito. Com esse relato de caso, é possível observar a importância de se conhecer a epidemiologia molecular dos isolados OS-MRSA e as formas de tratamento a serem empregadas para o manejo eficaz da terapia.

Palavras-Chave: Sepsis; OS-MRSA; *Staphylococcus aureus* Vancomicina-Intermediária; *S. aureus*; Infecções estafilocócicas

Clinical aspects of bloodstream infection by *S. aureus* – *mecA* positive – sensitive to oxacillin, with intermediate resistance to vancomycin: Case Report.

Abstract

Staphylococcus aureus can colonize healthy people or trigger infections whose spectrum of presentation varies from mild superficial to severe systemic. The emergence of Oxacillin- Sensitive Methicillin- Resistant *S. aureus* isolates (OS-MRSA) has imposed difficulties in treating patients with infections caused by *S. aureus*, especially those considered serious, such as bloodstream infections. Therefore, this study aims to report two cases of fatal bloodstream infection caused by OS-MRSA isolates. The isolates, derived from blood cultures, came from patients with bloodstream infections, admitted to a hospital in southern Brazil in 2015. The isolates were phenotypically characterized using an automated methodology. The genotypic identification of the isolates was carried out through amplification of the *nuc* gene. The *mecA* gene was used to characterize oxacillin resistance. The Modified Population Analysis Profile (PAP) method was used to characterize the isolates as hetero-Vancomycin Intermediate *S. aureus* (h-VISA). The Minimum Inhibitory Concentration (MIC) was determined using the e-test methodology and the patients' clinical data were evaluated through an active search for information in clinical records. The isolates were positive for the *mecA* gene, considered hVISA by PAP, and presented an MIC for vancomycin between 1.5 and 3.0 µg/ml and for oxacillin between 0.125 and 0.5 µg/ml. As for the clinic, there was a de-escalation in the patients' therapy, following the culture results and both died. With this case report it is possible to observe the importance of knowing the molecular epidemiology of OS-MRSA isolates and the forms of treatment to be used for effective therapeutic management.

Key words: Sepsis; OS-MRSA; Vancomycin Intermediate *Staphylococcus aureus*; *S. aureus*; Staphylococcal infections.

Introdução:

As infecções de corrente sanguínea ocasionadas por *Staphylococcus aureus* possuem grande relevância clínica, seja pela dificuldade de tratamento ou pela elevada morbimortalidade. Segundo uma revisão de literatura sobre o tema, Bai e colaboradores (2022), reportaram que a incidência de bacteremia estafilocócica varia entre 4,8 à 38,2 a cada cem mil pessoas, com uma mortalidade associada em 30 dias de 10-40% (Choi *et al.*, 2021).

Os procedimentos invasivos, assim como o uso de cateter venoso central, são um dos fatores de risco mais associados às bacteremias ocasionadas por *S. aureus*. Ainda, histórico de câncer, doença renal crônica, hospitalização pregressa e uso prévio de antimicrobianos também podem ser associados ao quadro (Ishikawa; Furukawa, 2021).

A bacteremia estafilocócica pode ser classificada em complicada e não complicada. De acordo com o descrito pelo *Infectious Diseases Society of America* (IDSA) bacteremia não complicada pode ser definida naqueles pacientes que apresentem hemocultura negativa pós 2-4 dias do diagnóstico inicial; normotermia pós 72 de efetivo tratamento antimicrobiano; ausência de dispositivos invasivos/ próteses; ausência de sinais de infecções em outros sítios e/ ou endocardite. Já a bacteremia complicada pode estar presente naqueles pacientes que apresentem outro foco infeccioso além da infecção de corrente sanguínea; hemoculturas positivas no seguimento; hipertermia persistente; presença de próteses ou dispositivos invasivos, além da indicação de hemodiálise. importante salientar que as bacteremias complicadas estão fortemente associadas a um pior prognóstico e morte (Kouijzer; Jr; Oever, 2022).

A presença de bacteremia pode levar ao fenômeno conhecido como *systemic inflammatory response to infection*. Neste caso, a resposta inflamatória é exacerbada e paradoxalmente, pode ocorrer junto de imunossupressão. O mecanismo supressor e pró-inflamatório desregulado gera danos ao tecido do hospedeiro, formando espécies reativas de oxigênio, dano endotelial, coagulação intravascular disseminada com plaquetopenia associada, diminuição na oxigenação tecidual, dificuldade na manutenção de níveis pressóricos e, em casos graves, falência de órgãos (Kwiecinski; Horswill, 2021). Portanto, esse relato tem como objetivo, descrever dois casos de infecção de corrente

sanguínea, ocasionados por isolados OS-MRSA com sensibilidade reduzida a vancomicina, que ocorreram em um hospital do sul do Brasil.

Materiais e métodos

A coleta de hemocultura foi realizada através de punção intravenosa, amostra pareada, sítio central e periférico. Para verificação da positividade utilizou-se o equipamento BACTEC® (BD). Após, as amostras foram plaqueadas em meios de cultura específicos e, aguardado crescimento bacteriano, a identificação dos isolados, bem como o perfil de sensibilidade aos antimicrobianos ocorreu, de forma automatizada, utilizando o equipamento Vitek® 2 (bioMérieux-USA). Os isolados foram estocados em freezer, -20°C até o momento das análises.

Os isolados foram resgatados do estoque, no laboratório de análises clínicas, setor de microbiologia do hospital, e identificados de forma manual, utilizando os critérios de Jorgensen e colaboradores (2015). A identificação genotípica foi realizada através da pesquisa do gene *nuc* (Brakstad; Aasbakk; Maeland, 1992) e a presença do gene *mecA*, bem como a tipagem dos elementos *SCCmec*, foram realizadas de acordo com o descrito, respectivamente, por Milheiriço e colaboradores (2007) e Boye e Colaboradores (2007).

A *Minimum Inhibitory Concentration* (MIC) para oxacilina, vancomicina, linezolida, daptomicina e teicoplanina foi determinada utilizando metodologia *e-test*® (BioMérieux-USA), adotando como padrão as recomendações do fabricante e os pontos de corte descritos no *Clinical and Laboratory Standard Institute* (CLSI, 2018). Ainda, para determinar a hetero resistência a vancomicina, foi utilizada técnica de *Population Analysis Profile* (PAP) modificado, de acordo com o descrito por Wootton e colaboradores (2001).

Os dados clínicos foram analisados de acordo com o descrito nos prontuários clínicos do paciente. O estudo foi aprovado pelo comitê de ética em pesquisa envolvendo seres humanos, da Universidade Estadual de Londrina, com parecer: 4.796.146.

Resultados:

Caso 1

Paciente I.R.S, sexo feminino, 71 anos, deu entrada no pronto socorro médico, encaminhada da Unidade de Pronto Atendimento (UPA), no dia 01/07/2014 devido à presença de úlcera necrosada em pé diabético. Paciente não apresentava pulsos periféricos, em membro inferior a esquerda, e foi classificada como (Insuficiência Arterial Periférica Crônica) IAPC IV, sendo indicada amputação e realizada colocação de prótese axilo-bi-femoral para revascularização. Paciente recebeu Piperacilina + Tazobactam (4g) e Vancomicina (1g) nos sete dias subsequentes, recebendo alta hospitalar após término de terapia.

No dia 19/01/2015 foi admitida no Pronto Socorro, lúcida, e orientada em tempo e espaço, corada, hidratada, anictérica, acianótica e eupneica. Havia hiperemia e coleção purulenta em região periférica, no trajeto da prótese, com edema (2+/4+) em membro inferior esquerdo, sendo realizada a drenagem no mesmo dia, além de início terapêutico com vancomicina (750mg – 12/12h), que perdurou até o dia 17/02/2015.

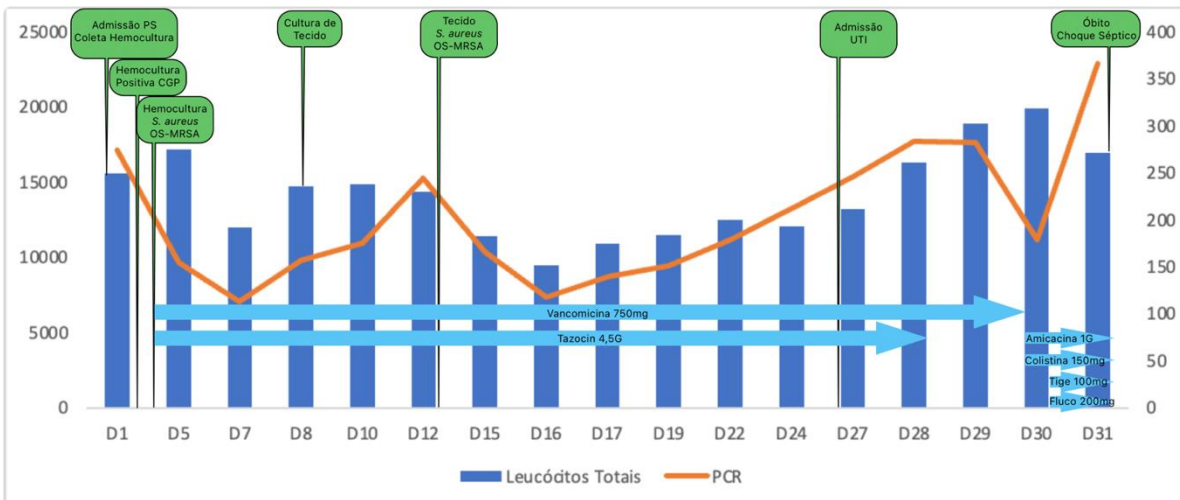
No dia 05/01/2015 foi iniciado Piperacilina+Tazobactam (4g – 6/6h), sendo retirado no dia 30/01/2015. Ainda, foram utilizados Meropenem (1g) de 12/12h e Amicacina (120mg) 1 vez ao dia até o dia 18/02/2015. Colistina (450) foi iniciada em 17/02 e, por fim, Tigeciclina (100mg – 12/12h) foi utilizada entre os dias 18 e 19/02/2015.

Quanto a hemocultura, coletada na admissão, houve identificação de *S. aureus*. O teste de sensibilidade aos antimicrobianos se mostrou sensível a todas os fármacos testados e a Concentração Inibitória Mínima (CIM) de vancomicina, determinada por e-test, foi de 3 ug/mL (quadro 1). A pesquisa molecular evidenciou o gene *mecA*, bem como, utilizando metodologia de *population analysis profile* (PAP), foi possível caracterizar tal isolado como sendo hVISA. A paciente apresentava Proteína C Reativa (PCR) de 274,10mg/dL (VR: 3,0 mg/dL) e não havia presença de leucócitos jovens no sangue periférico.

Quanto às comorbidades havia acometimento cardiovascular progressivo, bem como alterações no tecido conjuntivo/ ósseo por inserção de prótese femoral progressiva.

Paciente apresentava o escore de gravidade *Acute Physiology and Chronic Health Evaluation* (APACHE) igual a 24, bem como o índice *Sequential Sepsis-related Organ Failure Assessment* (SOFA) de 11. Quanto aos procedimentos invasivos houve uso de Catéter Venoso Central (CVC) por 7 dias, Catéter Vesical de demora (CVD) por 7 dias, Intubação Orotraqueal (TOT) por 3 dias e dreno de penrose por 7 dias. Portanto, o processo infeccioso foi relacionado ao sítio cirúrgico. O quadro clínico da paciente era considerado grave e, no dia 19/02/2015, foi constatado óbito por choque séptico de foco cutâneo, pela Comissão de Controle de Infecção Hospitalar (CCIH).

Figura 1 - Linha do tempo paciente I.R.S.



Legenda: PS- Pronto Socorro; CGP – Cocos Gram Positivos; OS-MRSA – *Methicillin Sensible Oxacillin Resistant S. aureus*; UTI: Unidade de Terapia Intensiva; Tige: Tigeciclina; Fuco: Fluconazol; D: dias de internação; PCR: Proteína C Reativa.

Caso 2.

Paciente R.S, sexo masculino, 25 anos, deu entrada no pronto socorro no dia 28/01/2015, encaminhada de serviço secundário, para investigação de quadro pancitopênico, queixando-se de letargia, astenia e hipertermia há 2 meses.

Negava comorbidades prévias, ao exame físico se apresenta em bom estado geral, lúcido e orientado em tempo e espaço, descorado (2+/4+), hidratado, taquipneico (FR: 24) e icterico (1+/4+). Foram administradas duas bolsas de concentrado de

hemácias e o paciente foi encaminhado ao setor de hematologia para investigação, sendo diagnosticada Leucemia Linfóide Aguda e iniciado ciclo de quimioterapia.

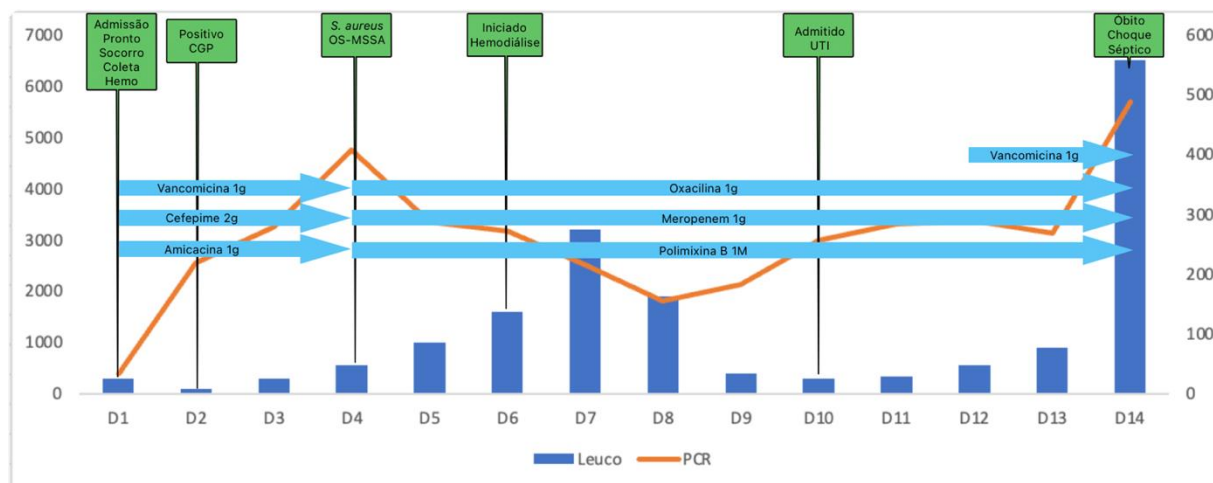
No dia 15/02/2015, após último ciclo de quimioterapia, paciente se sentiu mal e procurou atendimento no pronto socorro médico. No momento de sua entrada estava febril, apresentava disúria, dor abdominal difusa e vômito, descorado (3+/4+) e com ausência de sinais meníngeos. Foi coletada hemocultura para rastreio infeccioso, positiva para *S. aureus*. No antibiograma, apenas foi detectada resistência para o antibiótico penicilina (Quadro 1).

No momento de sua entrada no serviço de saúde a PCR era de 32,60 mg/dL (VR: 3,0 mg/dl) e não foram detectadas células jovens no sangue periférico. O paciente não apresentava comorbidades pregressas. Seu índice APACHE era de 10 e escore SOFA 5. Como procedimentos invasivos houve uso de CVC por 5 dias, CVD por 6 dias e TOT por 6 dias.

Foi utilizada Vancomicina (1g - 8/8) com início em 16/02/15 e término em 18/02/2015, além de Polimixina B (1g - 12/12), com início em 18/02/2015 e término em 28/02/2015.

No dia 28/02/2015 o quadro clínico do paciente decaiu consideravelmente, evoluindo para óbito devido à choque séptico refratário. Como não havia dados de internação prévia e o paciente, no momento de sua entrada, apresentou hemocultura positiva, a origem infecciosa foi considerada comunitária.

A CIM de vancomicina foi de 1,5 ug/mL e, posteriormente, foi detectada a presença do gene *mecA*, bem como a caracterização de isolado hVISA, de acordo com o teste de Perfil de Análise Populacional (PAP).

Figura 2 - Linha do tempo Paciente R.S.

Legenda: Hemo: Hemocultura; CGP – Cocos Gram Positivos; OS-MRSA – *Methicillin Sensible Oxacillin Resistant S. aureus*; UTI: Unidade de Terapia Intensiva; D: dias de internação; Leuco: Leucócitos; PCR: Proteína C Reativa.

Quadro 1 - Dados laboratoriais e moleculares de dois isolados OS-MRSA coletados de corrente sanguínea.

Paciente	ANTIBIO	MIC Vanco	MIC Teico	MIC Dapto	MIC Line	MIC Oxa	<i>mecA</i>	PAP/AUC
Caso 1	A	3,0 µg/ml	2,0 µg/ml	0,5 µg/ml	3,0 µg/ml	0,125 µg/ml	Pos	hVISA/ 0,98
Caso 2	B	1,5 µg/ml	1,5 µg/ml	0,5 µg/ml	3,0 µg/ml	0,5 µg/ml	Pos	hVISA/ 1,09

Legenda: Antibio: Antibiotipo (A: sensível a oxacilina, penicilina, eritromicina, clindamicina, ciprofloxacino, gentamicina, sulfametoxazol+trimetropima, rifampicina, linezolida e tigeclicina; B: sensível a oxacilina, eritromicina, clindamicina, ciprofloxacino, gentamicina, sulfametoxazol+trimetropima, rifampicina, linezolida e tigeclicina, Resistente a Penicilina); MIC: minimum inhibitory concentration; Vanco: Vancomycin; Teico: Teicoplanin; Dapto: Daptomycin; Line: Linezolid; *mecA*: gene that encodes production of altered proteins binding penicillin; PAP: population analysis profile; Pos: Positive; hVISA: Heterogeneous Vancomycin Intermediate *Staphylococcus aureus*.

Discussão

Isolados classificados como *Methicillin Resistat S. aureus* (MRSA), em geral, possuem resistência a uma gama de antimicrobianos, como aqueles pertencentes as classes das penicilinas, cefalosporinas, aminoglicosídeos, quinolonas, sulfonamidas, entre outros. Fato esse que torna o patógeno uma bactéria de extremo interesse clínico e, por vezes, prolonga e dificulta o tratamento de pacientes. Dessa forma, os MRSA são, notadamente, um dos maiores responsáveis pelos acometimentos infecciosos ao redor do mundo (Guo *et al.*, 2020).

Sabe-se que a resistência aos beta-lactâmicos, em isolados MRSA, ocorre pela produção de uma *penicillin-binding protein* (PBP) modificada, PBP2a, codificada pelo gene *mecA*. Contudo, isolados que possuem o gene, mas são fenotipicamente sensíveis a oxacilina, in vitro, começaram a ser identificados, sendo denominados *Oxacillin-Sucseptible* – MRSA (OS-MRSA). Tais microrganismos possuem MIC para oxacilina $\leq 2,0 \mu\text{g/mL}$, inseridos na faixa sensível, mas possuem o gene *mecA* e passam a expressar resistência aos fármacos beta lactâmicos ao serem expostos a eles ou a mupirocina (Liu; *et al.*, 2021).

Assim se faz necessário que a terapia para pacientes com infecção de corrente sanguínea por MRSA seja a mais efetiva possível. De acordo com os mais recentes guidelines do *Infectious Diseases Society of America* (IDSA), o tratamento de escolha preconizado para pacientes com bacteremia por MRSA deve ser feito com vancomicina ou daptomicina (Mahjabeen *et al.*, 2022).

Tal recomendação é reforçada por outros institutos como *Ubicin Outcomes Registry and Experience* (CORE-US) e *European Cubicin Outcomes Registry and Experience* (EU-CORE; *Europe, Latin America, and Asia*) que ratificam esse aconselhamento e ainda dizem: para que se evite fenômenos de resistência e diminua a pressão seletiva sobre microrganismos multirresistentes, é necessário que um regime com altas doses de daptomicina (8-10mg/kg/d) seja iniciado para pacientes com bacteremia por MRSA (Andrew Seaton *et al.*, 2016).

Murray e colaboradores (2013) realizaram um estudo de coorte em 4 hospitais de Detroit comparando o sucesso terapêutico ao se utilizar vancomicina e daptomicina em pacientes com infecção por MRSA. Sabe-se que, mesmo dentro da faixa de sensibilidade, isolados com CIM $\geq 1,5$ $\mu\text{g/mL}$ apresentam falha na terapia com vancomicina. Assim, para tal estudo, os pesquisadores incluíram pacientes com CIM para vancomicina acima de 1,0. Comparando aqueles que receberam vancomicina (17,6mg/Kg/d) e daptomicina (8,4mg/kg/d) para tratamento inicial, os autores encontraram menor falha na terapia com daptomicina, quando comparada com vancomicina (20/40%), bem como uma menor mortalidade em 30 dias no uso de daptomicina/ vancomicina (3,5%/ 12,9) (Mahjabeen *et al.*, 2022).

Portanto, é importante pensar nos programas de manejo eficiente dos antimicrobianos, como o caso do *Antimicrobial Stewardship*. De acordo com o guideline, é necessário que se escolha o medicamento correto, na dose acertada para determinado sítio e patógeno. Dessa forma, existe a preconização de se adequar a terapia empírica com base nos resultados de cultura, muitas vezes, de-escalando o antimicrobiano a fim de evitar fenômenos de resistência (Shrestha; Zahra; Cannady, 2022).

Porém, tal recomendação necessita ser clinicamente avaliada e pensada, pois, fenômenos de resistência como os isolados OS-MRSA e *Heterogeneous Vancomycin Intermediate S. aureus* (hVISA) dificultam a escolha terapêutica e ocasionam falhas na terapia com oxacilina e vancomicina, respectivamente (Pournaras *et al.*, 2015; Unni; Siddiqui; Bidaisee, 2021).

O surgimento de isolados com sensibilidade reduzida a vancomicina trouxe ainda mais dificuldades para o tratamento de pacientes com bacteremia estafilocócica. Em uma população de células a sensibilidade reduzida a vancomicina pode ocorrer em todas as células da cultura, sendo denominadas *vancomycin-intermediate S. aureus* (VISA) ou ocorrer em subpopulações, sendo denominadas de hVISA. Esses últimos, mais associados as falhas de tratamento e infecções persistentes. Não se sabe, ao certo, a fisiopatologia da formação de tais características, contudo, há relatos de espessamento da parede celular do microrganismo, com mutações nos genes *vraSR*, *graSR* e *walKR*,

responsáveis por regular a síntese da parede bacteriana (Kang et al., 2022; Srisrattakarn et al., 2021).

Assim, o tratamento de pacientes com bacteremia estafilocócica deve ser pensado empiricamente e após culturas. Há a predileção de se utilizar vancomicina em combinação com medicamentos anti-MRSA, como ceftarolina/ ceftobiprole, para terapia empírica. Contudo, somado aos fenômenos de resistência associados a vancomicina, bem como a frequência de toxicidade, a daptomicina passou a ser uma boa escolha para tratamento de pacientes com bacteremia estafilocócica, cujos agentes etiológicos apresentem CIM de vancomicina $\geq 2,0$ ug/mL. Ainda há a possibilidade de se utilizar linezolida, porém, além de interagir com outros medicamentos, aumentar níveis de ácido láctico e ser associada a mielossupressão em uso superior a duas semanas, maiores índices de mortalidade foram associados a terapia com linezolida, em bacteremias, quando comparado com daptomicina e vancomicina, que continuam sendo os agentes de escolha nas infecções de corrente sanguínea ocasionada por MRSA (Lam; Stokes, 2022; Mahmoud et al., 2020).

Mais estudos são necessários para avaliar a terapia mais eficaz a ser empregada no caso infecções ocasionadas por OS-MRSA.

Conclusão

Com o relato desses dois casos clínicos é possível observar a relevância dos isolados OS-MRSA. Os dois pacientes apresentados receberam terapia empírica com vancomicina, e tiveram seus isolados caracterizados como hVISA, bem como, para um dos pacientes, houve adequação farmacológica, para oxacilina, após resultado laboratorial. Tal decisão terapêutica pode ter sido fundamental no desfecho desfavorável apresentado pelos pacientes. Dessa forma, fazer a correta identificação dos isolados, utilizando técnicas moleculares em pacientes graves, pode auxiliar na adequação da terapia de forma efetiva, algo fundamental para que haja sucesso terapêutico.

Vale ressaltar que, no momento do diagnóstico, tais mecanismos de resistência eram desconhecidos do corpo clínico, apenas sendo identificados, inicialmente, três anos após internação dos pacientes citados.

Referências

- ANDREW SEATON, R. et al. Real-world daptomycin use across wide geographical regions: Results from a pooled analysis of CORE and EU-CORE. **Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials**, v. 15, n. 1, p. 1–11, 2016.
- BAI, A. D. et al. Staphylococcus aureus bacteremia mortality across country income groups: A secondary analysis of a systematic review. **International Journal of Infectious Diseases**, v. 122, p. 405–411, 2022.
- BOYE, K. et al. A new multiplex PCR for easy screening of methicillin-resistant Staphylococcus aureus SCCmec types I–V. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 13, n. 7, p. 725–727, 2007.
- BRAKSTAD, O. D. D. G.; AASBAKK, K.; MAELAND, J. A. Detection of Staphylococcus aureus by Polymerase Chain Reaction Amplification of the nuc Gene. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 30, n. 7, p. 1654–1660, 1992.
- CHOI, S. H. et al. Risk Factors for Recurrent Staphylococcus aureus Bacteremia. **Clinical Infectious Diseases**, v. 72, n. 11, p. 1891–1899, 2021.
- GUO, Y. et al. Prevalence and Therapies of Antibiotic-Resistance in Staphylococcus aureus. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 10, n. March, p. 1–11, 2020.
- ISHIKAWA, K.; FURUKAWA, K. Staphylococcus Aureus Bacteremia Due to Central Venous Catheter Infection : A Clinical Comparison of Infections Caused by Methicillin-Resistant and Methicillin-Susceptible Strains. v. 13, n. 7, 2021.
- KANG, Y. R. et al. Impact of vancomycin use trend change due to the availability of alternative antibiotics on the prevalence of Staphylococcus aureus with reduced vancomycin susceptibility : a 14 - year retrospective study. **Antimicrobial Resistance & Infection Control**, p. 1–10, 2022.
- KOUIJZER, I. J. E.; JR, V. G. F.; OEVER, J. guiding diagnostic and therapeutic management. **Journal of Infection**, n. xxxx, 2022.
- KWIECINSKI, J. M.; HORSWILL, A. R. Staphylococcus aureus bloodstream infections: pathogenesis and regulatory mechanisms. **Current Opinion Microbiology**, p. 51–60, 2021.
- LAM, J. C.; STOKES, W. The Golden Grapes of Wrath – Staphylococcus aureus Bacteremia : A Clinical Review. 2022.

LIU, R. et al. Clonal Diversity , Low-Level and Heterogeneous Oxacillin Resistance of Oxacillin Sensitive MRSA. p. 661–669, 2021.

MAHJABEEN, F. et al. An Update on Treatment Options for Methicillin-Resistant Staphylococcus aureus (MRSA) Bacteremia: A Systematic Review. **Cureus**, v. 2022, n. 11, p. 1–9, 2022.

MAHMOUD, E. et al. Ceftobiprole for Treatment of MRSA Blood Stream Infection : A Case Series. p. 2667–2672, 2020.

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**, v. 21, n. 16, p. 2048–2053, 27 abr. 2015.

SRISRATTAKARN, A. et al. Synergistic effect of vancomycin combined with cefotaxime, imipenem, or meropenem against Staphylococcus aureus with reduced susceptibility to vancomycin. p. 2150–2158, 2021.

UNNI, S.; SIDDIQUI, T. J.; BIDAISEE, S. Reduced Susceptibility and Resistance to Vancomycin of Staphylococcus aureus : A Review of Global Incidence Patterns and Related Genetic Mechanisms. **cereus**, v. 13, n. 10, 2021.

WOOTTON, M. 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, n. 4, p. 399–403, 1 abr. 2001.

7. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Após análise de 801 isolados, coletados de infecções de corrente sanguínea, de pacientes internados no HU-UDEL, entre os anos de 2011 e 2020, encontramos uma elevada prevalência de isolados OS-MRSA (27%). Tal dado possui extrema importância clínica, pois, esses isolados se mostram falsamente sensíveis nos testes fenotípicos, induzindo os clínicos, embasados pelos guidelines, a de-escalonar a terapia empregada, o que pode gerar falha na terapia antimicrobiana e conduzir a um pior prognóstico clínico.

Ainda, foi possível avaliar a diversidade epidemiológica dos isolados. Foi demonstrando os 6 diferentes complexos clonais e 11 *Sequence Type*, bem como os 3 tipos de elementos *SCCmec* e os genes de virulência. Foi avaliada a resistência aos principais antimicrobianos, com a CIM de vancomicina, linezolida, oxacilina, daptomicina e teicoplanina.

Assim, com este trabalho, demonstramos a importância de se conhecer a epidemiologia local dos microrganismos, bem como, lançamos luz a um grave fenômeno de resistência bacteriana. Outro ponto importante, é clara demonstração necessidade de implementação de estes moleculares, na rotina clínica, para identificação dos fenômenos de resistência, pouco convencionais, em pacientes com infecções graves. Mais estudos se fazem necessários, contudo, para entender, de fato, qual a melhor forma de tratamento a ser empregada para pacientes infectados por isolados OS-MRSA.

8. CONCLUSÃO

No presente trabalho foi decotada 27% de prevalência de isolados OS-MRSA, entre os isolados, inicialmente, caracterizados como sensíveis e meticilina, isolados de hemocultura. A média de idade dos pacientes infectados por MRSA e OS-MRSA foi maior do que a encontrada por MSSA. Pacientes infectados por OS-MRSA apresentaram frequência maior de mortalidade, em relação aos outros pacientes, sem que houvesse diferença de variáveis entre os grupos quanto à origem da infecção (comunitária ou hospitalar), internação em UTI, uso de dispositivos invasivos ou comorbidades. A maioria dos pacientes infectados OS-MRSA receberam oxacilina para seu tratamento clínico. Pacientes infectados por OS-MRSA apresentaram maiores índices de mortalidade em 30 dias e maior percentual de mortalidade relacionada ao processo infeccioso, quando comparados com pacientes infectados por MSSA ou MRSA.

Quanto a sensibilidade, a maioria dos isolados se mostrou sensível à clindamicina e sulfametoxazol + trimetropima. Elevações na Concentração Inibitória Mínima elevação para vancomicina foram detectadas em isolados OS-MRSA e MRSA.

Na avaliação molecular, a presença do gene *vanA* não foi encontrada em nenhum isolado testado, porém, todos foram positivos para os genes: *mecA*, *nuc* e *icaA*. Os genes *pvl* e *tst-1* foram encontrados em 92% e 61% dos isolados, respectivamente. Quanto aos SCC*mec* o prevalente foi o tipo I, seguido dos tipos IV e II. Ainda, quanto a caracterização epidemiológica molecular, de acordo com o MLST, encontramos 6 complexos clonais, sem o prevalente o CC 5 e 11 *sequence typing*, sendo o ST 99 com maior frequência. foi Todos os isolados foram caracterizados, fenotipicamente, como forte formadores de biofilme.

REFERÊNCIAS

ABUZNEID, Y. S. et al. Post-surgical staphylococcal toxic shock syndrome in pediatrics: A case report. **International Journal of Surgery Case Reports**, v. 89, n. November, p. 106587, 2021.

AHMAD-MANSOUR, N. et al. Staphylococcus aureus Toxins : An Update on Their Pathogenic Properties and Potential Treatments. **Toxins**, p. 1–22, 2021.

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.

ANDRADE, M. M. et al. The History of Methicillin-Resistant Staphylococcus aureus in Brazil. **Canadian Journal of Infectious Diseases and Medical Microbiology**, v. 2020, 2020.

BOONSIRI, T. et al. Identification and characterization of mutations responsible for the β - lactam resistance in oxacillin - susceptible mecA - positive Staphylococcus aureus. **Scientific Reports**, n. 0123456789, p. 1–22, 2020.

BOYE, K. et al. A new multiplex PCR for easy screening of methicillin-resistant Staphylococcus aureus SCCmec types I–V. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 13, n. 7, p. 725–727, 2007.

CHANAYAT, Y. et al. veterinary sciences The SCC mec Types and Antimicrobial Resistance among Methicillin-Resistant Staphylococcus Species Isolated from Dogs with Superficial Pyoderma. **veterinary sciences**, p. 1–10, 2021.

CHEN, Feng-Jui et al. Pantón–Valentine leukocidin (PVL)-positive methicillin-susceptible and resistant Staphylococcus aureus in Taiwan: identification of oxacillin-susceptible mecA-positive methicillin-resistant S. aureus. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v.65, p.351–357, 2009.

CHEN, H. et al. Drivers of methicillin-resistant Staphylococcus aureus (MRSA) lineage replacement in China. **Genome Medicine**, v. 13, n. 1, p. 1–14, 2021.

CHEUNG, G. Y. C.; BAE, J. S.; OTTO, M. Pathogenicity and virulence of Staphylococcus aureus ABSTRACT. **Virulence**, v. 12, n. 1, p. 547–569, 2021.

CLARK, N. C. et al. Characterization of Glycopeptide-Resistant Enterococci from U . S . Hospitals. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 37, n. 11, p. 2311–2317, 1993.

COHEN, R. et al. Molecular Epidemiology of Methicillin-Resistant Staphylococcus aureus Clinical Isolates during 7 . 5 Years in One Regional Hospital in Israel. v. 2021, 2021.

Clinical and laboratory Standards Institute - NCCLS, C. AND L. S. I. **Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing**. CLSI/ NCCLS documents M-100 [s.l: s.n.]. v. 26, 2022.

- CONG, Yanguang; YANG, Sijin; RAO, Xiancai. Vancomycin resistant *Staphylococcus aureus* infections: A review of case updating and clinical features. **Journal of Advanced Research**, v.21, p.169-176, 2020.
- DA, M. et al. Epidemiological and clinical features of Panton-Valentine Leukocidin positive *Staphylococcus aureus* bacteremia : A case- control study. **PLOS ON**, v. 17(3), p. 1–13, 2022.
- DI GREGORIO, S. et al. Genomic Epidemiology of CC30 Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Strains from Argentina Reveals Four Major Clades with Distinctive Genetic Features. **mSphere**, v. 6, n. 2, p. 1–17, 2021.
- DIALLO, O. O.; BARON, S. A. Antibiotic Resistance Surveillance Systems: A Review. **Integrative Medicine Research**, 2020.
- DUARTE, Felipe Crepaldi et al. Fatal sepsis caused by *mecA* -positive oxacillin-susceptible *Staphylococcus aureus* : First report in a tertiary hospital of southern Brazil. **J Infect Chemother**, v.25(4), p.293-297, 2019.
- FERNÁNDEZ-HIDALGO, N. et al. Impact of *Staphylococcus aureus* phenotype and genotype on the clinical characteristics and outcome of infective endocarditis. A multicentre, longitudinal, prospective, observational study. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 24, n. 9, p. 985–991, 2018.
- FORBES, Betty A. Unusual form of oxacillin resistance in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clinical strains. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v.61, p.387–395, 2008.
- GÁRCIA-ÁLVAREZ, Laura et al. Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* with a novel *mecA* homologue in human and bovine population in the UK and Demark: a descriptive study. **Lancet Infect Dis**. v. 11(8):595-603, 2011.
- GHASEMZADEH, F.; NAJAFPOUR, G. D.; MOHAMMADI, M. Antiinfective properties of ursolic acid-loaded chitosan nanoparticles against *Staphylococcus aureus*. **Turkish Journal of Chemistry**, v. 45, n. 5, p. 1454–1462, 2021.
- GOSSACK-KEENAN, K. L.; KAM, A. J.; KAM, A. Toxic Shock Syndrome Still a Timely Diagnosis ILLUSTRATIVE CASE. **Pediatric Emergency Care** •, v. 00, n. 00, p. 1–3, 2017.
- GUO, Y. et al. Prevalence and Therapies of Antibiotic-Resistance in *Staphylococcus aureus*. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 10, n. March, p. 1–11, 2020.
- HARAPANAHALLI, A. K. et al. Influence of adhesion force on *icaA* and *cidA* gene expression and production of matrix components in *Staphylococcus aureus* biofilms. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 81, n. 10, p. 3369–3378, 2015.
- HARKINS, Catriona P. et al. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* emerged long before the introduction of methicillin into clinical practice. **Genome Biology**, v.18:130, 2017.

- HASAN, N.; JASIM, A. K. Detection of Pantone-Valentine leukocidin and MecA Genes in Staphylococcus aureus isolated from Iraqi Patients. **Archives of Razi Institute**, v. 76, n. 4, p. 1054–1058, 2021.
- HE, W. et al. Prevalence and molecular typing of oxacillin-susceptible mecA-positive Staphylococcus aureus from multiple hospitals in China. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v. 77, n. 3, p. 267–269, nov. 2013.
- HIRAMATSU, K. et al. Methicillin-resistant Staphylococcus aureus clinical strain with reduced vancomycin susceptibility. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v.40, p/ 135-146, 1997.
- HIRAMATSU, Keiichi. The Emergence of Staphylococcus aureus With Reduced Susceptibility to Vancomycin in Japan. **THE AMERICAN JOURNAL OF MEDICINE**, v.104, 1998.
- SAMBROOK, J.; FRITSCH, E. F.; MANIATIS, T. M. 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, Patricia M. " Celbenin "-resistant Staphylococci. **British Medical Journal**, v.14, p. 124-125, 1961.
- KANG, J.; HWANG, C. One health approach to genetic relatedness in SCC mec between methicillin-resistant Staphylococcus isolates from companion dogs with pyoderma and their owners. **Veterinary Microbiology**, v. 253, n. December 2020, p. 108957, 2021.
- KATEETE, D. P. et al. Nasopharyngeal carriage , spa types and antibiotic susceptibility profiles of Staphylococcus aureus from healthy children less than 5 years in Eastern Uganda. **BMC Infectious Diseases**, p. 1–10, 2019.
- KAWASUJI, Hitoshi et al. Effectiveness and Safety of Linezolid versus Vancomycin, Teicoplanin, or Daptomycin against Methicillin Resistant Staphylococcus aureus Bacteremia: A Systematic review and Meta-Analysis. **Antibiotics**, v. 12(4), p.697, 2023.
- KIVANÇ, S. A. et al. Comparison of biofilm formation capacities of two clinical isolates of Staphylococcus epidermidis with and without icaA and icaD genes on intraocular lenses. **Türk Oftalmoloji Dergisi**, v. 47, n. 2, p. 68–73, 2017.
- 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.
- KOUIJZER, Ilse J.E.; FOWLER, Vence G. Jr.; OEVER, Jaap Ten. Redefining Staphylococcus aureus bacteremia: A structures approach guidin diagnostic and therapeutic management. **Journal of Infection**, v. 86, p.9-13, 2023.
- KWIECINSKI, J. M.; HORSWILL, A. R. Staphylococcus aureus bloodstream infections: pathogenesis and regulatory mechanisms. **Current Opinion Microbiology**, p. 51–60, 2021.

LAURA Evans. et al. Executive Summary: Surviving Sepsis Campaign: International Guidelines for the Management of Sepsis and Septic Shock 2021. **Critical Care Medicine**, v.49, n. 11, p. 1974 - 1982, 2021.

LEE, H. S. et al. Comparative study of the difference in behavior of the accessory gene regulator (agr) in USA300 and USA400 community-associated methicillin-resistant staphylococcus aureus (CA-MRSA). **Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 31, n. 8, p. 1060–1068, 2021.

LISOWSKA-ŁYSIAK, K.; LAUTERBACH, R.; MIĘDZOBRODZKI, J. Epidemiology and Pathogenesis of Staphylococcus Bloodstream Infections in Humans: a Review. **PoI J Microbiol**, v. 70, n. 1, p. 13–23, 2021.

LIU, R. et al. Clonal Diversity, Low-Level and Heterogeneous Oxacillin Resistance of Oxacillin Sensitive MRSA. **Infec Drug Resist**, p. 661–669, 2021.

LIU, J. et al. Current status of oxacillin-susceptible mecA - positive Staphylococcus aureus infection in Shanghai , China : A multicenter study. **Journal of Microbiology, Immunology and Infection**, n. xxxx, 2020.

LIU, J. et al. ScienceDirect Current status of oxacillin-susceptible mecA - positive Staphylococcus aureus infection in Shanghai , China : A multicenter study. **Journal of Microbiology, Immunology and Infection**, v. 54, n. 6, p. 1070–1077, 2021.

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, Mariya; PILLA, Giulia. Penicillin's Discovery and Antibiotic Resistance: Lessons for the Future? **YALE JOURNAL OF BIOLOGY AND MEDICINE**, v.90, p.135-145, 2017.

LOURDES, M. De et al. Comparison of Methods for the Identification of Coagulase-negative Staphylococci. v. 99, n. December, p. 855–860, 2004.

MA, M. et al. First report of oxacillin susceptible mecA-Positive staphylococcus aureus in a Children's Hospital in Kunming, China. **Infection and Drug Resistance**, v. 14, p. 2597–2606, 2021.

MARTINEAU, F. et al. Species-Specific and Ubiquitous-DNA-Based Assays for Rapid Identification of Staphylococcus aureus. **J. Clin Microb**, v. 36, n. 3, p. 618–623, 1998.

MILHEIRIC, C.; OLIVEIRA, D. C. Multiplex PCR strategy for subtyping the staphylococcal cassette chromosome mec type IV in methicillin-resistant Staphylococcus aureus : ' SCC mec IV multiplex '. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, n. April, p. 42–48, 2007.

MINEJIMA, E. et al. Defining the Breakpoint Duration of Staphylococcus aureus Bacteremia Predictive of Poor Outcomes. **Clinical Infectious Diseases**, v. 70, 2020.

NOVICK, Richard P.; BOUANCHAUDT, Daniel. Extrachromosomal nature of drug resistance in staphylococcus aureus. **The Public Health Research Institute of the**

City of New York, Inc. New York, N. Y. 10018, 1971.

OLSEN, John Elmerdahl; CHRISTENSEN, Henrik; AARESTRUP, Frank Møller. Diversity and evolution of blaZ from Staphylococcus aureus and coagulase-negative staphylococci. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**. v.57, p.450–460, 2006.

PEREIRA, Lynette 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.

PETINAKI, E.; KONTOS, F.; MANIATIS. A. N. Emergence of two oxacillin-susceptible mecA-positive Staphylococcus aureus clones in a Greek hospital. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v.50, p.1090–1091, 2002.

PIMENTEL, F. et al. Journal of Global Antimicrobial Resistance Staphylococcus aureus clones causing osteomyelitis : a literature review. **Journal of Global Antimicrobial Resistance**, v. 26, p. 29–36, 2021.

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**, v. 21, n. 16, p. 2048–2053, 27 abr. 2015.

QIAO, J. et al. Research on the biofilm formation of staphylococcus aureus after cold stress. **Microorganisms**, v. 9, n. 7, 2021.

REICHMANN, Nathalie T.; PINHO, Mariana G. Role of SCCmec type in resistance to the synergistic activity of oxacillin and ceftiofex in MRSA. **Scientific Reports**. v.7:6154, 2017.

ROMERO, L. C. Insights into the epidemiology of community-associated methicillin-resistant Staphylococcus aureus in special populations and at the community-healthcare interface. **Brazilian Journal of Infectious Diseases**, v. 25, n. 6, p. 101636, 2021.

SAAED, k. et al. Oxacillin- Susceptible Methicillin Resistant Staphylococcus aureus (OS-MRSA), a hidden resistance mechanism among clinically significant isolates in the Wessex region/ UK. **Infection**, v.42(5), p.843-847, 2014.

SASSINE, Jad et al. Functional redundancy of division specific penicillin-binding proteins in Bacillus subtilis. **Molecular Microbiology**, v.106(2), p. 304–318, 2017.

SHAHID, A. H. et al. Molecular detection of vancomycin and methicillin resistance in Staphylococcus aureus isolated from food processing environments. **One Health**, v. 13, p. 100276, 2021.

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**, v. 55, n. 8, p. 3765–3773, 2011.

- SILVA, V. et al. Antimicrobial Resistance and Genetic Lineages of *Staphylococcus aureus* from Wild Rodents : First Report of in Portugal. **Animals**, 2021.
- SMITH, J. T. et al. Genomic epidemiology of methicillin- resistant and -susceptible *Staphylococcus aureus* from bloodstream infections. p. 1–14, 2021.
- STEPANOVIC´, S. et al. Quantification of biofilm in microtiter plates : overview of testing conditions and practical recommendations for assessment of biofilm production by staphylococci. **APMIS**, p. 891–899, 2007.
- TASNEEM, U. et al. Methicillin resistant *Staphylococcus aureus* : A brief review of virulence. **J Pak Med Assoc**, v. 72, n. 3, p. 509–515, 2022.
- TONG, S. Y. C. et al. Effect of Vancomycin or Daptomycin With vs Without an Antistaphylococcal β -Lactam on Mortality, Bacteremia, Relapse, or Treatment Failure in Patients With MRSA Bacteremia A Randomized Clinical Trial. **JAMA**, p. 527–537, 2020.
- TURNER, N. A. et al. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: an overview of basic and clinical research. **Nature Reviews Microbiology**, v. 17, n. 4, p. 203–218, 8 abr. 2019.
- UEHARA, Y. Current Status of Staphylococcal Cassette Chromosome mec (SCCmec). **Antibiotics**, p. 1–12, 2022.
- UNNI, S.; SIDDIQUI, T. J.; BIDAISEE, S. Reduced Susceptibility and Resistance to Vancomycin of *Staphylococcus aureus* : A Review of Global Incidence Patterns and Related Genetic Mechanisms. **cereus**, v. 13, n. 10, 2021.
- URUSHIBARA, N. et al. Novel staphylococcal cassette chromosome mec (SCC mec) type XIV (5A) and a truncated SCC mec element in SCC composite islands carrying speG in ST5 MRSA in Japan. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, p. 1–5, 2019.
- WOOTTON, M. 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, n. 4, p. 399–403, 1 abr. 2001.
- WOZNIAK, J. M. et al. Mortality Risk Profiling of *Staphylococcus aureus* Bacteremia by Multi-omic Serum Analysis Reveals Early Predictive and Pathogenic Molecular Signatures. **Cell**, v. 182, n. 5, p. 1311–1327, 2021.

ANEXO**ANEXO A - Parecer de Aprovação do Comitê de Ética.****PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP****DADOS DO PROJETO DE PESQUISA**

Título da Pesquisa: Análise epidemiológica, molecular e caracterização clínica de pacientes com infecção ocasionada por *Staphylococcus aureus* Methicillin Resistant - Oxacilin Sensible em um hospital universitário do sul do Brasil.

Pesquisador: MARCIA REGINA ECHES PERUGINI

Área Temática:

Versão: 1

CAAE: 47298621.1.1001.5231

Instituição Proponente: CCS - Departamento de Patologia, Análises Clínicas e Toxicologias

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 4.796.146

Apresentação do Projeto:

Título da Pesquisa: Análise epidemiológica, molecular e caracterização clínica de pacientes com infecção ocasionada por *Staphylococcus aureus* Methicillin Resistant - Oxacilin Sensible em um hospital universitário do sul do Brasil. Pesquisador orientador Responsável: MARCIA REGINA ECHES PERUGINI e equipe (o verdadeiro pesquisador é o aluno de doutorado: FELIPE CREPALDI DUARTE Aluno). Vinculado ao Programa de Pós-Graduação em F. Clínica Laboratorial. Conforme o autor: "Trata-se de um estudo retrospectivo, transversal, observacional. Nele, será avaliado isolados de *S. aureus* provenientes de infecções de corrente sanguínea coletados de pacientes internados no Hospital Universitário de Londrina (HU-Uel) entre os anos de 2011 - 2020 e estocados no banco de bactérias do laboratório de análises clínicas e toxicológicas, setor de microbiologia do HU-Uel. (Bactérias da espécie *Staphylococcus aureus* são extremamente virulentas, resistentes aos agentes antimicrobianos e estão associadas a diversas infecções, tanto de origem comunitárias quanto hospitalares. Entre os isolados de *S. aureus*, aqueles resistentes a meticilina (Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* - MRSA), estão frequentemente associados aos processos infecciosos. Não obstante a dificuldade terapêutica ocasionada pelos isolados MRSA, ao redor do mundo, o aparecimento dos *S. aureus* resistente a meticilina (positivos para o gene *mecA*), porém sensíveis fenotipicamente à oxacilina (Oxacilin Sensible – Methicillin Resistant *Staphylococcus aureus* - OS- MRSA) vem dificultado o diagnóstico e tratamento de pacientes infectados por esses

Endereço: LABESC - Sala 14

Bairro: Campus Universitário

CEP: 86.057-970

UF: PR

Município: LONDRINA

Telefone: (43)3371-5455

E-mail: cep268@uel.br



Continuação do Parecer: 4.796.146

microrganismos. Há mais de uma década esses isolados vindo sendo descritos na literatura mundial e, até o momento, não há um consenso sobre as formas de tratamento e identificação eficazes do patógeno, ou dados sobre sua real prevalência. Portanto, com esse estudo retrospectivo, transversal e observacional de pacientes internados em um hospital universitário, localizado no sul do Brasil, diagnosticados com infecção estafilocócica invasiva, entre os anos de 2015 – 2019, espera-se encontrar a real prevalência das isolados OS-MRSA, bem como uma correlação positiva entre os genes envolvidos no processo de resistência e a falha terapêutica nessas infecções. Os achados laboratoriais/ moleculares serão comparados com a evolução clínica do paciente. Será proposta a prevalência desses isolados, envolvidos nas infecções invasivas, bem como, utilizando as bases genéticas, sua epidemiologia molecular e correlações entre o patógeno e o prognóstico da infecção).

METODOLOGIA: os pesquisadores Utilizarão amostras estocadas no banco de bactérias do Hospital Universitário de Londrina. Serão verificadas 135 amostras. Propõe-se como estudo multicêntrico.

Objetivo da Pesquisa:

Objetivo Geral:

Determinar a prevalência de isolados OS-MRSA, provenientes de infecções invasivas coletadas de pacientes internados no Hospital Universitário de Londrina (HU – UEL) entre os anos de 2011-2020, bem como a epidemiologia molecular e correlações com a evolução clínica do paciente.

Objetivo Secundário:

Avaliar o perfil de sensibilidade de *S. aureus* oriundas de infecções invasivas.

Determinar a CIM para oxacilina, vancomicina e ceftarolina.

Identificar o gene de resistência aos beta-lactâmicos por técnicas moleculares.

Determinar a relação clonal entre os isolados e a composição alélica de cepas relacionadas aos clones prevalentes.

Sequenciar o genoma de cepas OS-MRSA para avaliar possíveis mutações em regiões responsáveis pela transcrição de proteínas envolvidas em mecanismos de resistência aos antimicrobianos.

Verificar a expressão de proteínas envolvidas em mecanismos de resistência aos antimicrobianos nas cepas que apresentarem discrepância entre os métodos fenotípicos e genotípicos na detecção de resistência à oxacilina.

Correlacionar os genes de resistência aos fármacos beta-lactâmicos com o tratamento antimicrobiano utilizado e a evolução clínica do paciente.

Avaliar o prognóstico para pacientes com infecção por cepas OS-MRSA.

Endereço: LABESC - Sala 14

Bairro: Campus Universitário

UF: PR

Telefone: (43)3371-5455

Município: LONDRINA

CEP: 86.057-970

E-mail: cep268@uel.br



Continuação do Parecer: 4.796.146

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Riscos:

Este estudo não constitui risco para a integridade física e/ou saúde dos participantes e pesquisadores envolvidos, pois não serão realizadas coletas de material biológico diretamente nos pacientes. Utilizaremos amostras estocadas no banco de bactérias do Hospital Universitário de Londrina.

Benefícios:

Com este estudo conseguiremos propor a epidemiologia local dos isolados OS-MRSA, bem como descrever suas características fenotípicas e genotípicas. Assim, munidos dessas informações, esperamos que os clínicos tenham maior no manejo das infecções e tomada de decisão para uma terapia mais direcionada

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Pesquisa importante para os estudos da área, pois constitui revisão e investigação para as condutas médicas no controle de infecções.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Como se trata de pesquisa à banco de dados solicita dispensa de TCLE.

FOLHA DE ROSTO: preenchida com os dados da orientadora que se coloca como pesquisadora principal e assinada pela vice-coordenadora de Pós-Graduação /UEL - ok.

TSC: preenchido e assinado pela orientadora como pesquisadora principal. Os demais membros da equipe não apresentaram o mesmo doc, mas a responsabilidade da declarante é suficiente.

DOC COPARTICIPANTE: entregue e assinado pela responsável no HU (Viviane Feijó)

DOC PLATAFORMA BRASIL: Com as mesmas informações que os demais doc. Cronograma: ok.

Orçamento: financiamento próprio, ok

PROJETO: apresenta o aluno Felipe Crepaldi Duarte (Biomédico) como o autor de os estudos.

ESTUDO MULTICÊNTRICO: A autora descreve indevidamente que se trata como estudo multicêntrico, mas não se configura.

Recomendações:

1. Readequar na plataforma Brasil a descrição em estudo multicêntrico, uma vez que não foram apresentados documentos de vínculos com outras instituições (diversas da UEL) nesta pesquisa. Favor retirar a informação na PB.

Endereço: LABESC - Sala 14

Bairro: Campus Universitário

UF: PR

Município: LONDRINA

CEP: 86.057-970

Telefone: (43)3371-5455

E-mail: cep268@uel.br



Continuação do Parecer: 4.796.146

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Não há pendência, recomenda-se aprovação.

Considerações Finais a critério do CEP:

Prezado(a) Pesquisador(a),

Este é seu parecer final de aprovação, vinculado ao Comitê de Ética em Pesquisas Envolvendo Seres Humanos da Universidade Estadual de Londrina. É sua responsabilidade apresenta-Lo aos órgãos e/ou instituições pertinentes.

Ressaltamos, para início da pesquisa, as seguintes atribuições do pesquisador, conforme Resolução CNS 466/2012 e 510/2016:

A responsabilidade do pesquisador é indelegável e indeclinável e compreende os aspectos éticos e legais, cabendo-lhe:

- conduzir o processo de Consentimento e de Assentimento Livre e Esclarecido;
- apresentar dados solicitados pelo sistema CEP/CONEP a qualquer momento;
- desenvolver o projeto conforme delineado, justificando, quando ocorridas, a sua mudança ou interrupção;
- elaborar e apresentar os relatórios parciais e final;
- manter os dados da pesquisa em arquivo, físico ou digital, sob sua guarda e responsabilidade, por um período mínimo de 5 (cinco) anos após o término da pesquisa;
- encaminhar os resultados da pesquisa para publicação, com os devidos créditos aos pesquisadores e pessoal técnico integrante do projeto;
- justificar fundamentadamente, perante o sistema CEP/CONEP, interrupção do projeto ou a não publicação dos resultados.

Coordenação CEP/Uel.

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_1693099.pdf	26/05/2021 11:04:09		Aceito
Projeto Detalhado / Brochura	projetodouel2021enviarComitedeetica.docx	26/05/2021 11:02:51	MARCIA REGINA ECHES PERUGINI	Aceito

Endereço: LABESC - Sala 14

Bairro: Campus Universitário

CEP: 86.057-970

UF: PR

Município: LONDRINA

Telefone: (43)3371-5455

E-mail: cep268@uel.br